

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：病原細菌の粘膜感染と宿主免疫反応抑制機構の解明とその応用

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者： 笹川 千尋（東京大学医科学研究所 教授）

3. 研究内容及び成果

赤痢菌をはじめとする粘膜病原細菌は、粘膜上皮へ感染してさまざまな疾患を引き起こす。しかしそれらの感染機構や宿主免疫応答は、これまでの研究の進展にもかかわらず不明な点が多い。そこで、本研究では、赤痢菌をモデルに感染における病原因子と宿主との相互作用について、分子、細胞、組織、個体の各レベルで理解を深め、それをワクチンおよび感染モデル動物の開発へ応用することを目的とした。

### I. 赤痢菌の感染を促進するエフェクター群の機能解析

赤痢菌をはじめとする多くの病原細菌は、宿主のさまざまな細胞へ侵入し細胞内で増殖する。赤痢菌では極性化した腸上皮細胞の側底面に貪食様運動を誘発し細胞内へ侵入することが知られていたが、その分子機構はほとんどわかっておらず、細菌感染の中心的課題の一つとして残されていた。

そこで本研究では、赤痢菌の上皮細胞侵入において菌の III 型分泌装置（以下 TTSS と略す）から宿主細胞に対して分泌される、IpgB1 および VirA について、各々細胞侵入と細胞内拡散における役割を解析した。その結果、IpgB1 は ELMO-Dock180 と機能的な結合を行い、Rac1 の活性化を通じて大規模なラッフル膜を誘導するエフェクターとして、菌の侵入に中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、VirA は細胞内で運動する菌から TTSS を通じて分泌され、VirA の微小管崩壊活性を通じて、菌の移動に障害となる微小管を破壊して菌の円滑な移動を助けていることが明らかとなった。これら一連の研究により、赤痢菌の上皮細胞侵入と細胞間拡散の分子機構が明らかになった。

### II. 細胞内生存にかかわる免疫抑制およびオートファジー回避機構の解明

赤痢菌の感染により強い炎症応答が誘導される。赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌は、炎症応答を抑制するためにさまざまな因子（エフェクター、分泌性毒素等）を分泌してこれに対抗するが、その詳細は不明な点が多く残されていた。本研究では、赤痢菌が TTSS を通じて炎症抑制に関わるエフェクターを数多く分泌していることを見だし、そのなかの一つ、IpaH9.8 に焦点を絞りその役割を精査した。IpaH9.8 は、細胞質で IKK 複合体を標的に NEMO/IKK $\beta$  と結合する一方、核内ではスプライシングファクターの一つ（U2AF<sup>35</sup>）へ結合して、各々の機能を阻害して炎症性サイトカインを含む多数の遺伝子発現を抑制していた。IpaH9.8 の役割はマウス経鼻感染モデルでも示され、これらの結果を併せ、IpaH9.8 は炎症抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

赤痢菌とリステリア・モノシトゲネースは、アクチンを重合して細胞内を運動して周囲の細胞へ拡散する。いずれの菌も一旦はオートファジーにより認識されるが、それを巧みに回避し生存することができる。本研究では、赤痢菌およびリステリアのオートファジーによる認識とその回避に、各々の菌においてアクチン重合を誘導する VirG（赤痢菌）と ActA（リステリア）が重要な役割を果たしていることを示し、またオートファジー回避の分子機構を明らかにした。

### III. 感染宿主細胞維持機構の解明

腸上皮は数日の周期で再生と剥離を繰り返すことにより、病原体の粘膜への定着を阻止している。また、感染を受けた細胞は基底膜より速やかに剥脱し修復することにより、病原体に感染拡大を阻止している。しかし、赤痢菌をはじめとする粘膜病原細菌は、粘膜上皮を足場として効率よく感染・定着することができる。本研究では、赤痢菌の TTSS から分泌される IpaB は、腸前駆体細胞の核内へ移行し細胞周期調節を行なう APC-Cdh1 を負に抑制する Mad2L2 へ結合する結果、前駆体細胞の細胞周期の進行を遅延させ、細胞寿命を延長していることを明らかにした。または、ウサギループ試験により赤痢菌が腸上皮前駆体細胞の増殖を抑制し、それが菌の定着促進に重要であることを示した。

赤痢菌を上皮細胞へ感染させると、感染細胞は速やかにマトリックスから剥脱する。これは、宿主の感染拡大を阻止する方法の一つと考えられている。しかし、赤痢菌をはじめとする粘膜病原細菌は TTSS から分泌する OspE エフェクターにより、感染細胞のマトリックスへの接着を強化し、足場となる感染細胞の基底膜からの剥離を抑制して定着を促進させていることを明らかにした。

### IV. 赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用

赤痢菌は、M細胞直下の常在マクロファージへ侵入し、マクロファージの細胞死を伴う強い炎症を惹起する。この原因物質を精査した結果、リポDを含む画分にその炎症および細胞死の原因物質が含まれることが示唆された。しかし、このリポD画分により誘導される細胞死はTLR4に依存しない。そこで、IpaF1およびASCの関与について各々の欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いて精査した結果、ASC欠損マウスにおいては、炎症誘導(カスパーゼ-1の産生誘導)は消失したものの依然として細胞死が誘導され、新規なシグナル経路が細胞死誘導に関与していることが示唆された。

弱毒赤痢ワクチン株は一般に細胞侵入能を保持しており、したがってマクロファージに炎症および細胞死を誘導する結果、従来型ワクチンで認められた副作用(発熱と軽微な下痢)の主原因と推定されていた。そこでマクロファージへの侵入能は保持するが、食胞から離脱不能となった弱毒赤痢変異株を作成して、マウス経鼻感染モデルによりワクチン効果を調べた。その結果、当該弱毒赤痢変異株は低炎症性ながら高い防御効果を誘導することが示された。

マウス腸管自然感染モデルの開発を目指して、赤痢菌を、遺伝学的背景を異にするマウスの腸管へ経口的に投与し、腸管に対する自然感染の成立の有無を精査したが、いずれのマウスにおいても感染は成立しなかった。これに替わって、Kweonらのグループ(ソウル、International Vaccine Institute)との共同研究でモルモット直腸感染モデルを開発した。本モデルは種々の赤痢弱毒変異株に対する感受性試験でも極めて再現性よく病原性を反映することが示された。

## 4. 事後評価結果

### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表)、特許、研究を通じての新たな知見の取得後の研究成果の状況

赤痢菌をモデルとして、細菌の基本的な粘膜感染現象の発見、炎症・免疫応答抑制機構、宿主細胞内生存および感染細胞維持戦略の解明、さらにこれらの知見を基にワクチン開発に資する基礎的研究などの重要課題に対し、いくつもの新たな新知見を得、貴重な研究成果を挙げた。赤痢菌の感染成立に関与するエフェクター分子と宿主因子の相互作用を明らかにした本研究により、我々の理解が大きく進んだ。本研究成果は高く評価できる。

これらの研究成果は、論文発表(海外 22 件)、口頭発表(海外 30 件、国内 32 件)として発表されている。Cell

1 件、Science 2 件、Nat Cell Biol 1 件、Cell Host Microbe 3 件をはじめ、評価の高い国際誌や国際会議に多くの優れた研究成果を公表している。また本研究成果は、Nat Rev Microbiol、Curr Opin Microbiol、Curr Top Microbiol Immunol の国際総説誌へ招待され総説として発表した。特許は、慶応大学小安重夫教授との共同で 2 件出願した。

下記はそのなかでも特筆すべきものである。

- 1) 細菌の宿主細胞への侵入機構で中心的なメカニズムを明らかにした。この成果は、病原細菌の感染初期過程における最も重要なステップの解明につながるもので、このステップを標的にした新規薬剤開発へもつながる成果である。
- 2) 赤痢菌による炎症応答抑制およびオートファジー回避を明らかにした。これら二つの機能は、菌の感染の成立にとり極めて重要であることを示した。他の多くの病原細菌の炎症抑制システムの解明にもつながる成果である。また、細胞質内へ侵入した菌を排除するオートファジーとそれを回避する菌との関係をはじめ分子レベルで明らかにすることができた。この成果は、細菌のオートファジー回避機構のみならず、オートファジー誘導機構そのもののさらなる理解へつながる成果である。
- 3) 粘膜上皮の示す基本的バリアー機能の意義を病原細菌の感染を通じて明らかにした。菌が前駆体細胞内へ侵入して細胞周期の進行を抑制して細胞寿命を延ばす巧みな戦略を明らかにした。また、赤痢菌をはじめ多くの病原性細菌は、感染宿主細胞の細胞接着を強化して足場細胞の維持・強化を行なうために積極的に介入していることを明らかにした。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究は、赤痢菌の感染、拡大の分子機構の解明に成果を挙げ、治療薬開発への基盤を築いた。今後のより良いワクチン開発に向けた研究の進展を期待したい。また、本研究によって、細菌学と細胞生物学の境界領域の研究が大いに進展したことを高く評価したい。

本研究では、病原細菌が粘膜感染において普遍的な感染システムを明らかにした。また、感染成立の鍵となる、細菌の宿主免疫防御機構の克服および宿主細胞内生存に関する基本的な戦略も、本研究でモデルとして使用した赤痢菌を通じて、世界に先駆け解明できた。これらは、細菌感染成立と宿主応答という最も中心的な課題に対する貢献のみならず、細胞高次機能、自然免疫システムの理解の深化にも少なからず貢献するものである。

一方、マクロファージ感染における炎症と細胞死誘導の解明およびモルモット直腸感染モデルの開発は、これまで未解決であった低炎症かつ有効な弱毒ワクチンの基礎研究として貴重な知見を提供した。本研究は基礎的研究に留まる事なく、今後実用化を目指してさらなる研究の発展を期待したい。

#### 4-3. その他の特筆事項(受賞歴など)

本研究成果を踏まえて、鈴木敏彦博士が琉球大学大学院医学研究科感染制御医科専攻の教授に、また奥田潤博士が広島大学大学院薬学研究科準教授に就任した。三室仁美博士は 2008 年 10 月に講師に昇進した。

本研究期間中に、小川道永博士(2006 年 3 月)と三室仁美博士(2009 年 3 月)が細菌学会黒屋奨励賞を受賞した。研究代表者の笹川千尋教授が武田医学賞(2006 年 11 月)を受賞した。

以上