

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成15年度採択研究代表者

笹川 千尋

(東京大学医科学研究所 教授)

## 「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」

### 1. 研究実施の概要

赤痢は大腸粘膜のM細胞から粘膜下へ侵入し、マクロファージへ感染し細胞を破壊して周囲の吸収上皮細胞へ侵入する。感染より炎症免疫反応が誘起されるが、赤痢菌は粘膜上皮内に定着し、最終的に炎症性下痢を引き起こす。赤痢菌をはじめとする粘膜病原細菌の多くは、III型分泌装置を通じて一群のエフェクター蛋白質を宿主細胞へ分泌する。そこで、赤痢菌の分泌するエフェクターの分泌動態、細胞内極在および標的宿主因子との相互作用を解明し、本菌の感染機構を解明するとともに、自然免疫に干渉するエフェクター分子を同定し、これらを総合して本菌の感染戦略の本体を究明する。またこれらの知見を基に、安全な赤痢ワクチンおよび新しい治療・制御法の確立を目指す。

これまでの研究により、赤痢菌から宿主細胞へ分泌される約30のエフェクター蛋白質のなかには、感染の促進および自然免疫抑制に働くものが示されている。本年の研究により、菌の上皮細胞侵入に中心的な役割を果たす新規なエフェクター (IpgB1) が存在することを見いだした。またIcsBが、宿主細胞内でオートファジー認識を回避する作用を有するエフェクターであることを示した。また赤痢菌の細胞内増殖により一連の炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , RANTES) 産生が誘導されるが、本菌は上皮細胞内でロイシンリッチリピートなエフェクターの一つIpaH9.8を分泌し核内へ移入後、U2AF35に特異的に結合し一連のスプライシング反応阻害を通じて炎症性サイトカイン遺伝子発現を抑制することを見いだした。さらに、マウス致死活性に影響する一群のエフェクターを同定したが、その感染に果たす役割は未だに不明である。今後それらの役割とともに、本菌の上皮細胞侵入、細胞内のオートファジー回避、炎症反応抑制現象に関わるエフェクター機能をさらに追求する一方、赤痢菌の感染初期における食細胞に対する細胞死誘導機構を解明し、低炎症性弱毒ワクチン開発に必要な基礎的知見を得る。

### 2. 研究実施内容

#### 研究目的

赤痢をはじめとする多く病原細菌は粘膜面を介して感染・定着し様々な疾患を引き起こす。赤痢は大腸粘膜のM細胞から粘膜下へ侵入し、マクロファージへ感染し細胞を破壊し

て周囲の吸収上皮細胞へ侵入する。赤痢菌の感染より強い炎症反応が誘起されるが、菌は粘膜上皮内に定着し周囲の上皮細胞へ感染を拡大する。近年、赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌が、III型分泌装置を通じて一群のエフェクター蛋白質を宿主細胞へ分泌し、感染に必要な機能を宿主細胞から獲得していることが報告されている。しかし、それらエフェクターが菌の感染と定着にどこまで関わっているかは未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、赤痢菌の分泌するエフェクターの分泌動態、細胞内極在および標的宿主因子との相互作用を精査し、本菌の感染分子機構を解明するとともに、炎症および自然免疫に干渉するエフェクターを同定し感染における役割を明らかにすることを目的とする。本年度は、赤痢菌の宿主の異物排除機構（オートファジー）回避機構および炎症抑制機構に焦点を絞り以下の研究を実施した。

#### 方法および結論

##### (i) オートファジー回避機構：

赤痢菌のエフェクター遺伝子の一つ、*icsB* を欠損させた菌は上皮細胞内での増殖に異常を示し (Ogawa et al., Mol. Microbiol. 2003)、また *icsB* 変異株は細胞内に侵入後数時間を経過すると多層膜に囲まれて死滅した。そこで、この変異株の細胞内動態を、リソゾーム、オートファゴソーム等の細胞内オルガネラに特異的なマーカーで染色し、その挙動を野生株と比較した。また、*icsB* 変異株の細胞内侵入後の動態を透過型電子顕微鏡により観察するとともに、オートファジーのマーカー蛋白質LC3と菌の極在性を調べた。また種々のオートファジー形成阻害剤処理細胞、あるいはAtg5欠損MEF細胞へ *icsB* 変異株を感染させ、細胞内増殖性を野生株と比較した。その結果、*icsB* 変異株では上皮細胞感染3-4時間以降オートファジーにより捕捉されリソゾームにより分解されることが明らかとなった。オートファジーにより異物認識される赤痢菌の表層蛋白を精査した結果、菌が宿主細胞内でアクチン重合により運動するために必須な外膜蛋白質VirGがその原因物質であることが判明した。VirGはin vitroあるいは in vivoでオートファジー形成に必要なAtg5に結合するとともに、IcsBもVirGにAtg5と競合的に結合することを示した。これらの結果から、IcsBはオートファジーの標的となる菌自身のVirGへ結合することにより、オートファジーによる認識を回避するために分泌されるエフェクターであることが示唆された。本研究により、細胞質内に定着する病原体は、宿主の異物認識機構を巧みに回避するメカニズムを備え、またその機能が菌の粘膜面における感染成立に極めて重要であることが明らかとなった。

##### (ii) 炎症抑制機構：

IpaH9. 8は宿主細胞内で赤痢菌が分泌するエフェクターの一つで、核内に蓄積することを見いだした (Toyotome et al., 2000, JBC)。興味あることに *ipaH9. 8* 変異株および野生株をマウスに経鼻的に半致死量を投与し肺組織の病理を見ると、*ipaH9. 8* 変異株は野生株に比べ炎症反応が亢進したが、逆に組織内の変異株の定着菌数は野生株の30分の1へと激減した。IpaH9. 8はスプライシング因子の一つである、U2AF35に特異的に結合し、その結合はU2AF35特異的なスプライシング反応を容量依存的に阻害した。上皮細胞において

U2AF35機能をsiRNAの導入あるいは赤痢菌の感染により阻害し、DNA-microarrayあるいは RTPCRで遺伝子発現への影響を調べた結果、いずれも多数の遺伝子発現が減弱するとともに、炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子発現も減少していた。これらの結果から、IpaH9.8は赤痢菌の感染により誘導される炎症応答を菌の定着に最適化するために働く新規な機能を有するエフェクターであることが強く示唆された。

### 3. 研究実施体制

笹川千尋グループ（東京大学・医科学研究所、教授）

①研究分担グループ長：笹川千尋（東京大学・医科学研究所、教授）

②研究項目：赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究

免疫抑制に関わるエフェクターの研究

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

### 4. 主な研究成果の発表

#### (1) 論文（原著論文）発表

- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. and Sasakawa, C. Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy. *Science*, 307, 727-731, 2005.
- Nagai, T., Abe, A. and Sasakawa, C. Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for the bacterial pathogenesis, *J. Biol. Chem.*, 280, 2998-3011, 2005.