

「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 感染・免疫部門 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

本研究では、赤痢菌をモデルとして粘膜病原細菌の腸粘膜バリアーの感染における普遍的な感染現象を発見するとともに、その知見を赤痢ワクチンや感染動物モデルの開発へ応用することを目的とした。本研究では、細胞生物学的手法を基盤に、赤痢菌の腸上皮細胞への侵入および定着に関わる菌と宿主因子の関係を解明するとともに、それら因子の感染に果たす役割を、動物モデルを駆使して解明した。また赤痢菌の感染にともない発動される生体防御・自然免疫の抑制・回避に必要な細菌の因子を同定し、それら因子の感染におけるオートファジー回避、および炎症応答抑制に対する役割の一端を明らかにした。さらに、赤痢菌のマクロファージ感染により誘導される細胞死に新規な機構が介在することを示すとともに、この知見を利用して弱毒化赤痢ワクチンを作成した。本研究では、これまでの研究成果をもとに、赤痢菌の腸粘膜感染における新規な感染システムの解明および弱毒化赤痢ワクチンのさらなる改良を行う。

## 2. 研究実施内容

### 赤痢菌エフェクターの感染における役割の研究

感染初期に赤痢菌のIII型分泌機構 (TTSS) から分泌されるIpgB1は、Rac1を活性化してラッフル形成を促進するエフェクターであることをすでに報告したが、本年度は、GST-プルダウンアッセイ法および免沈法で、IpgB1がELMO (Rac1のGEFであるDock180と複合体を形成する) と特異的に結合することを見いだした。蛍光顕微鏡により菌の侵入部位に形成されたラッフル膜近傍に、IpgB1、ELMO、Dock180が共局在していることを示した。IpgB1により誘導されるラッフルは、Dock180と結合できないドミナントネガティブ ELMOの過剰発現、あるいはRNAiによるELMOノックダウンで有意に減少するとともに、Dock180<sup>-/-</sup>のMEFをもちいて、IpgB1によるラッフル形成にELMO-Dock180 複合体の活性化が必須であることを示した。活性化したRhoGはELMOと結合してELMO-Dock180複合体を細胞質膜へ結合させ局所のRac1を活性化する。事実、IpgB1-ELMOのキメラを作成し、細胞に発現させたところ、IpgB1-ELMO-Dock180が細胞質膜へ局在するとともに、ラッフル形成を誘導した。これらの結果から、IpgB1によるRhoG機能の代行が、赤痢菌の上皮細胞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。

VirAはTTSSを通じて細胞外の赤痢菌より分泌され、菌の侵入局所の微小管を破壊してラッフル膜を誘導することを以前に報告した。今回、細胞内に侵入した菌からVirAは再びTTSSを通じて分泌され、局所の微小管を破壊し菌の細胞内拡散を促進するあらたな役割を持つことを明らかにした。VirAの生化学的性状を精査した結果、VirAによる微小管の破壊は、本タンパク質の $\alpha$ -チューブリンに対するセリンプロテアーゼ活性によることを見いだした。

VirAのセリンプロテアーゼ活性に重要と予想される34番目のシステイン残基をアラニン残基へ置換した変異VirAを産生する赤痢変異株は、菌の細胞内移動、微小管破壊、およびマウス経鼻感染致死の、いずれにおいても親株と比べ有意に活性が減少していた。したがって、VirAは赤痢菌の細胞内拡散に関わる新たな機能を持つエフェクターであることが明らかとなった。

#### エフェクターによる免疫抑制機構の研究

赤痢菌属が保有する220 kb プラスミドおよび染色体上には、各々相同性の高い3個 (*ipaH9.8*, *ipaH7.8*, *ipaH4.5*) と6個 (*ipaH0722*, *ipaH1383*, *ipaH1880*, *ipaH2610*, *ipaH0887*, *ipaH2022*, *ipaH2202*) の合計9個の *ipaH* 遺伝子群が存在する。これまでに、我々はIpaH9.8が細胞内赤痢菌からTTSSを通じて分泌され、最終的に核内へ移行してスプライシングファクターの一つU2AF<sup>35</sup>と結合することを報告した。そこで、染色体性の一連のIpaH蛋白質についても、遺伝子発現およびTTSS依存的な分泌性の有無を調べた結果、染色体上にコードされるIpaHはすべてTTSSより分泌されることが確認された。各々のIpaHが細胞内で赤痢菌から細胞質へ分泌されているかを調べるために、 $\beta$ -lactamase法(あらかじめ $\beta$ -lactamaseとIpaHの融合タンパク質(IpaH-TEM)を作り宿主細胞質中で基質の分解により蛍光発色させる方法)を利用してIpaHの細胞内動態を蛍光顕微鏡で調べた結果、いずれのIpaHもHeLa細胞へ侵入した菌から細胞質へ分泌されていることが確認された。また、細胞へ感染後の赤痢菌の *ipaH*-mRNAをRT-PCRにより解析した結果、いずれの *ipaH* 遺伝子も細胞侵入後に発現が増加していることが確認された。したがって、赤痢菌は、染色体上にもTTSSを通じて分泌されるエフェクター遺伝子を有していることが明らかとなった。そこで染色体上の全ての *ipaH* 遺伝子を欠損させた多重欠損変異株を作成し、マウスの経鼻感染モデルを利用して肺炎惹起能に及ぼす影響を調べた結果、*ipaH* 多重欠損変異株は野生株と比べより激しい炎症を惹起した。しかし、肺組織への定着菌数は、野生株は多重欠損変異株に比べて有意に高い値を示した。以上の結果より、染色体に存在する *ipaH* 遺伝子産物は、感染において炎症を適度に抑制して菌の定着を促進する役割を持つことが明らかとなった。

腸粘膜上皮は数日の周期で再生と剥離を繰り返す。これにより病原体の粘膜への定着を阻止している。しかし、赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌は粘膜上皮を足場として定着する。赤痢菌がTTSSより分泌するIpaBは、III型分泌装置の先端に分泌され宿主細胞の形質膜に膜孔を形成する。本研究では、細胞内へ侵入した菌からIpaBが分泌され、宿主細胞の核内へ移行して細胞周期を抑制することを見いだした。IpgB1は細胞周期調節に関わるAPC-Cdh1を負に抑制するMad2L2へ特異的に結合した。APC-Cdh1によるサイクリンB1の崩壊をユビキチン化アッセイ法で精査した結果、IpaB-Mad2L2依存的にAPC-Cdh1の活性化を通じたサイクリンB1の崩壊が誘導された。Mad2L2に対する結合に必須なIpaBのアミノ酸の一つ、61番目のアスパラギンをアラニンへ置換した変異体は、サイクリンB1の崩壊および細胞周期抑制性がもとのIpaBに比べて有意に低下していた。赤痢菌野生型および*ipaB*欠損変異体をウサギ腸管ループへ感染させると、野生株は感染後12時間後に陰窩近傍の腸管上皮前駆体細胞の増殖を抑制したが、*ipaB*欠損変異体ではその能力が低下した。またIpaBの61番目のアラニン置換変異体を産生する菌も前駆体細胞の増殖抑制性は低下した。これらの結果から、赤痢菌は感染後期においてIpaBとMad2L2の結合を通じて陰窩近傍の上皮前駆体細胞の増殖を抑制することが示唆された。この抑制能は、赤痢菌の細胞内定着において長く宿主細胞を利用するために貢献しているものと思われる。

#### 赤痢菌の抗原提示細胞死誘導機構の解明とその応用

赤痢菌はマクロファージへ侵入し食胞から細胞質へ離脱して増殖する過程で、激しい炎症応答(主にIL-1 $\beta$ およびIL-18の産生・分泌)を引き起こすと同時に、ネクロシス様の細胞死を誘導して周囲の上皮細胞へ感染する。これまでに開発されてきた弱毒赤痢ワクチン株は細胞侵入能を有しており、ワクチン接種にともなう副作用(腸炎、発熱、下痢など)の原因となることが推定されていた。そこでM細胞への侵入能は保持するが、マクロ

ファージに感染後の食胞からの離脱能を欠失した弱毒赤痢変異株を作成して、低炎症性のより安全なワクチン株としての有用性の有無を検討した。M細胞およびマクロファージへの侵入性を保持させるために、エルシニア菌由来の細胞侵入因子インベイン遺伝子 (*inv*) を赤痢菌の細胞侵入性欠損株 (*ipaB*) に導入した。この株はマクロファージへ野生株と同様の感染性を示すものの、マクロファージの食胞から離脱できずマクロファージへ細胞死を誘導しない。実際、J774 マクロファージ細胞へこの変異株を感染させると、細胞死に伴って大量に分泌される IL-1 $\beta$  および IL-18 の産生は著しく低下していた。また BALB/C マウス経鼻感染モデルを用いインベイン発現変異株による感染防御効果等の免疫学的解析を行った結果、菌投与後の肺病理所見では中程度の好中球浸潤像がみられたが各種炎症性サイトカインの顕著な上昇は認められなかった。また外見上の病的症状、体重減少といった副作用がほとんど観察されなかった。一方、投与 1 ヶ月後の血清中および気管支肺洗浄液中の抗赤痢菌 LPS-IgG、-IgA 抗体価の有意な上昇がみられ、さらに致死量の赤痢菌野生株感染に対する高い防御効果も示された。これらのことからインベイン発現非細胞侵入赤痢変異株は、低炎症性の新規赤痢ワクチンとして有用である可能性が示唆された。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「笹川千尋」グループ

##### ①研究者名

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. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

- Marchés, O., Batchelor, M., Shaw, R. K., Patel, A., Cummings, N., Nagai, T., Sasakawa, C., Carlsson, S. R., Cougoule, C., Caron, E., Knutton, S., Connerton, I. and Frankel, G. EspF of Enteropathogenic *Escherichia coli* Binds Sorting Nexin 9. *J. Bacteriol.* 188: 3110-3115, 2006.
- Ogawa, M. and Sasakawa, C. *Shigella* and Autophagy. *Autophagy* 2: 171-174, 2006.
- Suzuki, T., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Iwai, H., Toyotome, T., Matsui, H. and Sasakawa, C. High vaccine efficacy against shigellosis of recombinant noninvasive *Shigella* mutant that expresses Yersinia invasins. *J. Immunol.* 177: 4709-4717, 2006.
- Yoshida, S., Handa, Y., Suzuki, T., Ogawa, M., Suzuki, M., Tamai, A., Abe, A., Katayama, E. and Sasakawa, C. Microtubule-Severing Activity of *Shigella* Is Pivotal for Intercellular Spreading. *Science* 314: 985-989, 2006.
- Handa, Y., Suzuki, M., Ohya, K., Iwai, H., Ishijima, N., Koleske, A. J., Fukui Y. and Sasakawa, C. *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. *Nat. Cell Biol.* 9: 121-128, 2006.

- Ashida, H., Toyotome, T., Nagai, T. and Sasakawa, C. *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. *Mol. Microbiol.* 63: 680–693, 2006.
- Shim D. H., Suzuki T., Chang S. Y., Park S. M., Sansonetti P. J., Sasakawa C. and Kweon M. N. New Animal Model of Shigellosis in the Guinea Pig: Its Usefulness for Protective Efficacy Studies. *J. Immunol.* 178: 2476–2482, 2006.

**(2) 特許出願**

平成 18 年度特許出願: 2 件 (CREST 研究期間累積件数: 2 件)