

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15272

研究課題名(和文) 免疫記憶中枢をターゲットとした宿主の排菌機構を回避する病原戦略

研究課題名(英文) Mechanism of escape of Salmonella from humoral immune system by secreting a virulence factor

研究代表者

高屋 明子 (Takaya, Akiko)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：80334217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラは宿主体内で持続感染することができるが、宿主で生じる獲得免疫からの回避機構については不明であった。本研究では、マウスで持続感染するサルモネラLon欠損株を感染させ、骨髄リンパ球について検討したところ、サルモネラ感染では感染4日で骨髄IgG分泌プラズマ細胞が特異的に障害されることを見出した。これは、サルモネラから分泌されるSiiEにより誘導された。SiiE欠損感染株では病原性株の排除効果がSiiE+株よりも高かった。以上より、SiiEはサルモネラの獲得免疫抑制因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salmonella can escape from the host immune system by producing virulence factors, leading to establishment of systemic infection. To understand the mechanism by which Salmonella escapes the adaptive immune response, we focused on the influence of Salmonella infection on the production of immunoglobulin (Ig)-secreting plasma cells. We show that SiiE secreted from *S. Typhimurium* is required and sufficient to prevent an efficient humoral immune response, selectively reducing the numbers of IgG-secreting plasma cells in the bone marrow. Furthermore, attenuated SiiE-deficient Salmonella induces high and lasting titers of specific IgG, mice vaccinated with SiiE-deficient Salmonella strongly suppressed the expansion of virulent Salmonella in the spleen compared to mice vaccinated with SiiE+-Salmonella. These findings suggest that SiiE is a virulent factor involving in the escape of Salmonella from humoral immune response.

研究分野：細菌学

キーワード：サルモネラ 骨髄IgG分泌プラズマ細胞 SiiE ワクチン

1. 研究開始当初の背景

細菌感染機構の理解において、細菌病原因子と宿主細胞間の相互作用により生じる分子機構を解明することが重要である。宿主は、自然及び獲得免疫応答により、細菌感染を防御する。細菌が感染する初期においては、宿主は、細菌体外構成因子である LPS、ペプチドグリカン、フラジェリンなどを認識した自然免疫応答防御機構を有するが、サルモネラなどのグラム陰性病原細菌は、3 型分泌機構 (T3SS) 依存的なエフェクター等を介して自然免疫反応を打破することで、感染を成立させる。

サルモネラは宿主体内で長期にわたり持続感染することができる。持続感染が生じた宿主は、サルモネラに対する獲得免疫系を確立しているにも関わらず、体内のサルモネラを排除することはできない。このことから、サルモネラは自然免疫のみならず獲得免疫を制御する機構を有していると考えられるが、その制御機構に関する知見はほとんど見出されていない。

我々はこれまでに、AAA+プロテアーゼである Lon を欠損させた *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 株をマウスに投与しても斃死させず、脾臓等に一月以上持続感染すること、更に感染後二週目に病原性株を投与してもマウスは生存することを報告してきた。この中で、感染初期の骨髄において、プラズマ細胞、B 細胞等のリンパ球が障害されていることを新たに見出していた。一方、サルモネラが存在する脾臓のリンパ球は障害しなかった。このことから、サルモネラは免疫記憶の中核である骨髄を特異的に標的とした宿主の排菌機構を回避する病原戦略を有していることが示唆されていた。

2. 研究の目的

サルモネラによる骨髄リンパ球制御機構について明らかにするため、標的とするリンパ球を特定すること、更に、サルモネラ病原因子を同定する。同定したサルモネラ病原因子の欠損株を構築し、獲得免疫に対する応答について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) サルモネラ野生株及び変異株

全てのサルモネラ株は、病原性株である *S. Typhimurium* χ 3306 を親株とし、遺伝子破壊株を構築した。遺伝子破壊株は、 λ Red system を用いて遺伝子破壊領域に FRT もしくは薬剤耐性遺伝子を挿入することで構築した。

(2) マウス感染実験

C57BL/6 マウスを用いた。サルモネラ、培養上清及び精製タンパク質は腹腔から投与した。

4. 研究成果

(1) サルモネラ感染で障害される骨髄リンパ球の同定

Lon 欠損株を C57BL/6 マウスに 1×10^4 CFU 腹腔感染させ、感染 4 日後の骨髄におけるプラズマ細胞数を ELISPOT アッセイにより調べた (図 1)。感染マウスの骨髄では IgG 分泌プラズマ細胞が著しく減少した。一方、IgM 分泌プラズマ細胞および脾臓 IgG 及び IgM 分泌プラズマ細胞は非感染マウスと同等であった。

骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞の減少が血中に存在する IgG 量に影響する可能性について、感染 7 日後の血中 IgG 量を ELISA により調べたところ、Lon 欠損株感染マウスでは非感染マウスと比較して有意に減少した (図 2)。一方、IgM 量は同程度であった。このことから、感染初期のサルモネラは骨髄で産生する IgG 分泌プラズマ細胞を特異的に障害することが示唆された。

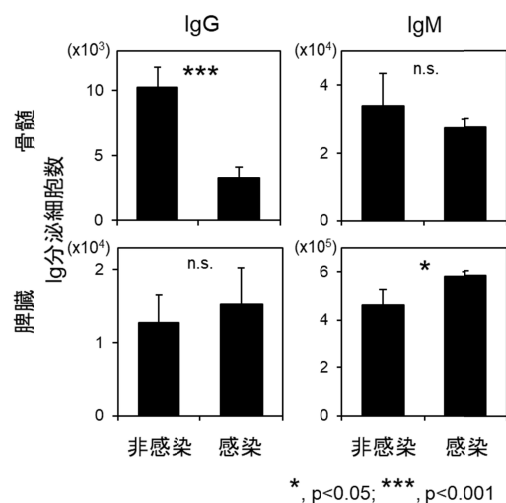


図 1 サルモネラ Lon 欠損株感染における骨髄及び脾臓における IgG・IgM 分泌プラズマ細胞数

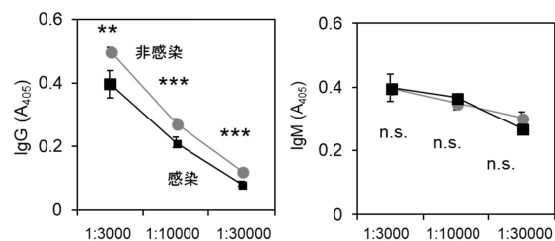


図 2 サルモネラ Lon 欠損株感染マウスの血中における IgG 及び IgM 量

(2) IgG 分泌プラズマ細胞障害に関するサルモネラ因子の同定

サルモネラによる IgG 分泌プラズマ細胞障害機構を明らかにするため、まず骨髄中のサルモネラ生菌数を調べた。しかしながら、骨髄から生菌は検出されなかった。そこで、サ

ルモネラ培養上清を投与したところ、骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞の減少がみられた (図 3)。

サルモネラの培養上清には、LPS、フラジェリン、T3SS で分泌されるエフェクターが存在する。このうち、LPS、フラジェリンは、TLR を介して自然免疫応答誘導に寄与する。そこで、LPS、フラジェリンによる影響をみるため、フラジェリン欠損株培養液から LPS を除去し、同様の実験を行った (図 3)。その結果、LPS、フラジェリンは関与しないことが明らかとなった。又、エフェクターも関与しないことが、T3SS 欠損株を用いた実験から示唆された。

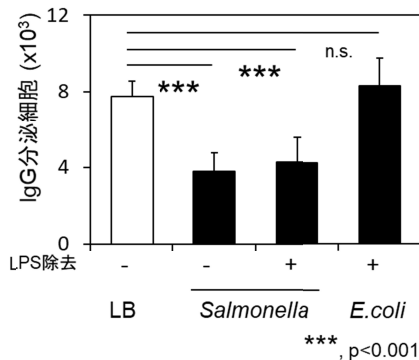


図 3 サルモネラ培養上清投与による骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞数への影響

培養上清に含まれるタンパク質のうち、*Salmonella* pathogenicity island (SPI) 4 にコードされる SiiE を欠損させた株の培養上清を調製してマウスに投与したところ、骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞は減少しなかった。

siiE は SPI4 にある 16680bp の遺伝子で、5559 アミノ酸の巨大タンパク質である (図 4)。SPI4 にコードされる 1 型分泌装置で菌体表面に露出することで、腸管での接着に寄与する。大きく 3 つのドメインに分けられるが、N 末領域の 129-168 の配列が Laminin 1 の一部と相溶性のあることを見出した。この領域が IgG プラズマ細胞障害に関与する可能性を検討するため、SiiE の 97 から 170 アミノ酸配列を GST に融合したタンパク質を発現するプラスミドを作成し、大腸菌で発現、精製した。精製した GST-SiiE₉₇₋₁₇₀ は骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞に結合した (図 5)。このことから、サルモネラは菌体表面から SiiE を遊離し、その N 末領域を介して骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞障害を誘導することが強く示唆された。

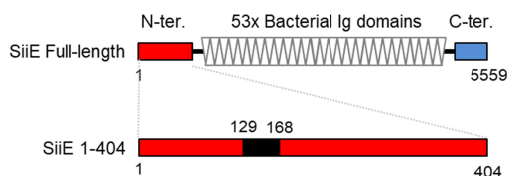


図 4 SiiE の構造

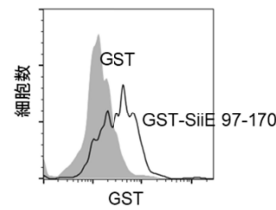


図 5 GST-SiiE97-170 と骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞の結合

(3) サルモネラの腹腔からの伝播

骨髄 IgG プラズマ細胞障害は、腹腔感染 3 日後に検出することができる。そこで、腹腔から投与したサルモネラが伝播する経路について検討した。GFP を発現するサルモネラを腹腔に感染させ、サルモネラが局在する細胞を検討したところ、感染初期には腹腔マクロファージである LPM に特異的に感染したが、感染 3 日後には単球に局在していた。感染 3 日後の腹腔内の菌数は、投与 6 時間後とほとんど変わらなかった。LPM は、感染 24 時間で顕著に減少し、3 日後には消失していた。又、腹腔内に豊富に存在する B 細胞も感染 3 日後に顕著に減少した (図 6)。このことから、サルモネラの腹腔感染は、腹腔内細胞の局在を顕著に変化させることが示唆された。

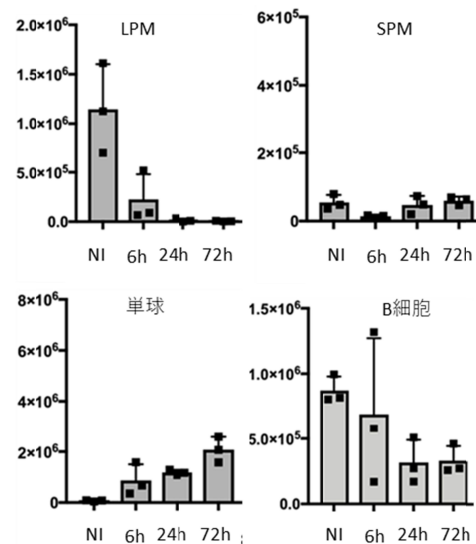


図 6 サルモネラ感染時の腹腔内細胞の変遷

サルモネラは感染初期において、マクロファージの細胞死を誘導することが知られている。しかしながら、腹腔マクロファージの減少は、サルモネラ感染による細胞死誘導の結果ではなく、大網に特異的に移動した結果であることが示唆された。このことから、腹腔に投与したサルモネラは、腹腔マクロファージに特異的に感染することで、リンパ節の一つとして考えられる大網に素早く移動することが可能である。このように宿主細胞の持つ移動手段を利用することで、サルモネラは全身の臓器に伝播し、増殖可能な細胞に移動し、そこで増殖するものと考えられる。増

殖するときに産生される SiiE が細胞外に放出され、骨髄に到達し、骨髄内での細胞障害を誘導する可能性が考えられる。

(4) SiiE 欠損によるサルモネラ特異的 IgG 産生への影響

SiiE がサルモネラ特異的 IgG 抗体産生に影響する可能性を検討するため、Lon 欠損株及び Lon・SiiE 二重欠損株をマウスに投与し、サルモネラ IgG 量について検討した。サルモネラ特異的 IgG 量の検討には、サルモネラを定常期まで培養した細胞質画分を用いた。感染後 7、14、21、42 日で血清中のサルモネラ IgG 量を測定したところ、感染 21、42 日後において、SiiE 欠損により IgG 量が顕著に増加することが明らかとなった(図 7)。このことは、サルモネラの SiiE により、新たな抗原に対する IgG 獲得が抑制されていることを示唆している。

新規 IgG 産生抑制が感染制御に与える影響を検討するため、Lon 欠損株及び Lon・SiiE 欠損株それぞれを感染させた 21 日後のマウスにサルモネラ野生株を投与した。感染後 4 日での脾臓における野生株生菌数を測定したところ、Lon・SiiE 欠損株感染マウスではほとんど検出されなかった(図 7)。このことから、SiiE による新規 IgG 産生抑制は、感染防御を負に制御していることが示唆された。

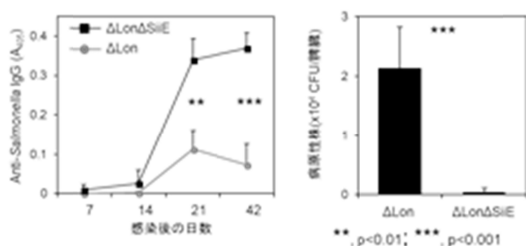


図 7 サルモネラ IgG 及びサルモネラ感染防御における SiiE の影響

以上より、サルモネラは感染初期において SiiE を遊離させることで、骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞を特異的に障害することが明らかとなった。この障害には、SiiE の N 末領域 97 から 170 を含む構造が関与することが示唆された。骨髄 IgG 分泌プラズマ細胞は記憶免疫の中核であり、自己免疫疾患において、自己を認識する IgG が産生することが疾患の要因となる。このことから、SiiE の N 末端領域の構造を応用することで、IgG が原因となる疾患を抑制する可能性が考えられる。

持続感染するサルモネラ弱毒株は、サルモネラ症のワクチンへの応用が考えられる。我々もこれまでに AAA⁺プロテアーゼ Lon 及び ClpXP 欠損株がワクチン効果を示すことを報告してきた。本研究で、Lon 欠損株に SiiE 欠損を導入した株は、Lon 欠損株よりも強いワクチン効果を示した。このことから、SiiE 欠損の導入は、ワクチン効果を高めることが示

唆された。

SiiE による IgG 分泌プラズマ細胞障害は感染初期に生じるものの、SiiE 欠損株の感染を抑制することはできなかった。このことから、SiiE は感染初期に IgG を低下させるのではなく、新たな IgG 産生抑制に寄与することが主要な機能であると考えられる。

サルモネラ感染では、IgG 分泌プラズマ細胞に加えて、骨髄 B 細胞、T 細胞も減少することも見出していた。今回 B 細胞障害において、骨髄だけではなく、腹腔内の B 細胞も顕著に減少させることから、サルモネラは B 細胞障害を誘導する因子を有すると考えられる。この因子は SiiE 以外であることが示唆されており、サルモネラ病原因子の探索が必要である。

本研究では、サルモネラが病原因子を放出することで獲得免疫系を制御する機構を有することを明らかとした。この獲得免疫の抑制が、サルモネラ持続感染に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Imamura K, Takaya A, Ishida Y, Fukuoka Y, Taya T, Nakaki R, Kakeda M, Imamachi N, Sato A, Yamada T, Mizutani R, Akizumi G, Tanu T, Tao K, Miyao S, Suauki Y, Nagahama M, Yamamoto T, Jensen T, Akimitsu N. Diminished nuclear RNA decay upon *Salmonella* infection upregulates antibacterial noncoding RNAs. EMBO J. in press (2018) 査読有

2. Xu J, Suita K, Okuno K, Takaya A, Yamamoto T, Isogai E. Membrane vesicle protein PagC as a novel biomarker for detecting pathogenic *Salmonella* in the viable but not culturable state. J Vet Med 80: 133-137 (2018) 査読無

[学会発表](計 8 件)

1. 高屋明子、武田英香里、山本友子、川島博人: The SsaH-SsaE heterodimer acts as a class III chaperone in SPI2-Type 3 secretion system. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 (3) 福岡

2. 高田 紗奈美, 高屋明子, 中村 悠美, 高橋 弘喜, 片山 有記, 谷口 俊文, 猪狩 英俊, 大曾根 義輝, 下条 直樹, 松江 弘之: Whole-genome sequencing for analysis of genetic diversity in a neonatal MRSA outbreak 第 91 回日本細菌学会総会 2018 (3) 福岡

3. 秋光信佳, 今村亮俊, 高屋明子, 石田洋一, 長浜正巳, 福岡弥生, 田谷敏貴, 山本友子: サルモネラ感染応答を制御する長鎖ノンコーディング RNA 第 91 回日本細菌学会総会シンポジウム 2018 (3) 福岡

4. Takaya A.: *Salmonella* pathogenicity

island 2 3 型分泌機構における新規シャペロン SsaH の機能解析 2017 年度べん毛研究交流会 2018 (3) 大津

5. Imamura K, Takaya A, Yamamoto T, Akimitsu N. : Loss of RNA degradation factors upon *Salmonella* injection stabilizes nuclear long non-coding RNAs involving antibacterial response EMBO conference Eukaryotic RNA turnover 2017 (7) Oxford, UK

6. 今村 亮俊, 高屋 明子, 石田洋一、長浜正巳、鈴木穰、山本 友子, 秋光 信佳: 核内 RNA 分解抑制を通じた自然免疫応答制御. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 (11-12) 横浜

7. Takaya A, Männe C, Yamasaki Y, Kawashima H, Yamamoto T, Tokoyoda K: Reduction of Bone Marrow Immunoglobulin G-secreting Plasma Cells by *Salmonella* Infection. 5th ASM Conference on *Salmonella*, 2016(8), Potsdam, Germany

8. Kimura N, Yamamoto T, Kawashima H, Takaya A: RNA chaperons, CspC and CspE regulate mRNAs induced in *Salmonella* surviving in macrophages after phagocytosis. 5th ASM Conference on *Salmonella*, 2016(8), Potsdam, Germany

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: SALMONELLA SIIE-DERIVED PEPTIDES FOR MANIPULATION OF LONG-LIVED PLASMA CELLS

発明者: Tokoyoda K., Takaya A.

権利者: 同上

種類: 特許

番号: EP17199568.1

出願年月日: 平成 28 年 11 月 1 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bisei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高屋 明子 (TAKAYA, Akiko)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 80334217

(4) 研究協力者

常世田 好司 (TOKOYODA, Koji)

ドイツリウマチ研究センター・PI