様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　５ 月 １４ 日現在

機関番号：１２５０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０７１０２

研究課題名（和文）細菌分泌蛋白質が誘導する骨髄記憶免疫細胞抑制に基づく持続感染戦略機構

研究課題名（英文）Strategy of Salmonella persistent infection based on suppression of bone-marrow derived immune cells induced by secreted proteins

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）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：病原細菌であるサルモネラの持続感染では、獲得免疫系を低下させること、更に、組織に移行した骨髄系細胞の分化抑制が関わることを見出した。獲得免疫の阻害機構では、サルモネラの分泌する病原因子SiiEが骨髄ニッチに存在する長命形質細胞上のintegrin β1とストローマ細胞上のlaminin β1の相互作用を阻害することを明らかにした。更に、持続感染している宿主では、組織に移行した骨髄系細胞の成熟を抑制されることで免疫応答が変化する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
病原細菌の持続感染では宿主に特異的な記憶免疫が形成されることから、弱毒化ワクチンなどに応用される。今回の成果は、ある種の弱毒化ワクチンなどでは宿主の持つ長期記憶等の免疫応答を低下させる可能性を示唆している。従って、弱毒化ワクチンなどの利用において他の抗体変化を調べることで安全性や効果について検討することの重要性を示唆している。一方、骨髄の長命形質細胞を特異的に阻害する戦略により免疫疾患の治療などへの応用に発展する可能性も考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found the novel mechanism that Salmonella has an ability to suppress humoral immunity via secretion of the virulence factor, SiiE Our result suggested that SiiE inhibits the interaction between the integrin β1 on plasma cells and laminin β1 on stromal cells in bone marrow. Furthermore, our study was also suggested that accumulation of immature myeloid cells provide a balance of immunosuppressive and protective functions in the host response to the persistent infection with Salmonella. Taking these findings together, it is suggested that Salmonella could maintain persistent infection by suppressing the host immune response in various strategies.

研究分野：細菌学

キーワード：サルモネラ　持続感染　免疫抑制　骨髄系細胞　病原因子　分泌タンパク質

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

病原細菌が宿主に感染し病原性を発揮するためには、宿主免疫による殺菌機構に打ち勝ち、宿主機能をかく乱することが必須である。そのため、細菌は宿主環境に応答して病原因子を産生し、病原因子を宿主細胞に移行させる。このような病原因子の多くは、細菌が有するタンパク質輸送機構を用いて細菌細胞外に分泌される。

グラム陰性病原細菌であるサルモネラのゲノム上には、数種の遺伝子領域 *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs)が存在する。SPI1 と SPI2 には 3 型タンパク質分泌装置（T3SS）とその機能発現に必要なタンパク質がコードされている。SPI4 には、1 型タンパク質分泌装置（T1SS）と分泌因子である SiiE がコードされている。SPI1 は腸管からの侵入に必須であり、腸管との接触に関わる SPI4 の遺伝子発現にも関わる。SPI4 による腸管上皮細胞への接着は、SPI4-T1SS で菌体表面に露出した SiiE と細胞成分との相互作用による。申請者らは先行研究において、SiiE の新たな機能として、宿主記憶免疫抑制作用を見出した。SiiE は宿主で形成される骨髄に存在する長命形質細胞（long-lived plasma cells; LLPC）の細胞死を誘導することで、感染初期に血中 IgG 量を低下させる。更に、SiiE は持続感染においてサルモネラ特異的な IgG 産生量を低下させる。しかしながら、SiiE によって誘導される LLPC の細胞死の分子機構は明らかでなかった。

持続感染するサルモネラは二次リンパ組織である脾臓では検出されるものの、一次リンパ組織である骨髄ではほとんど検出されない。脾臓に局在するサルモネラはマクロファージ内に存在することが示唆されているが、マクロファージを住みかとして長期間生存できる戦略については不明である。近年、マクロファージには異なる細胞由来の複数の種類が存在すること報告されている。細菌感染などの炎症反応に関わるマクロファージは骨髄系細胞に由来し、短命であるとされてきた。一方、各組織には長期間生存可能な組織特異的なマクロファージが存在していることが示されているが、細菌感染における組織マクロファージの役割については明らかではなかった。

２．研究の目的

(1)　SiiE によって誘導される LLPC の細胞死の分子機構の詳細を検討した。

(2)　腹腔感染マウスをモデルとして、サルモネラと組織マクロファージおよび骨髄由来マクロファージとの相互作用について調べた。

(3)　持続感染するサルモネラの増殖が阻害される際のサルモネラ細胞変化を検討した。

３．研究の方法

(1)　*S. enterica* serovar Typhimurium χ3306 を野生株として、野生株 SiiE の 97-170 アミノ酸配列を GST と融合させたタンパク質 GST-SiiE97-170 を精製した。精製したタンパク質はマウス骨髄細胞との相互作用との検討に用いた。

(2)　サルモネラ弱毒株 Lon 欠損株を C57BL/6 マウスに腹腔より投与した。投与 7、14、21 日後に解剖し、腹腔内を PBS で洗浄し腹腔内細胞を回収した。回収した細胞を抗体染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

(3)　野生株および Lon 欠損株を抗菌薬に曝露した後、経時的にサンプリングし、L 寒天培地に塗布しコロニー数を計測した。

４．研究成果

(1)　LLPC は濾胞性 B 細胞が骨髄ニッチに移行した後に分化した形質細胞である。長期間骨髄で生存し特異的抗体の産生を担うことから、液性免疫の記憶に重要な役割を担う。これまでにサルモネラ分泌タンパク質である SiiE が骨髄に存在する IgG 分泌形質細胞（IgG-PC）を特異的に低下させることを見出していた。SiiE は 5559 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端ドメイン、53 x bacterial Ig domain、C 末端ドメインの 3 つのドメインを有する。N 末端ドメインの一部である 97-170 ペプチドを GST と融合させたタンパク質 GST-SiiE97-170 をマウスに投与すると、IgG-PC 数が減少した。SiiE97-170 領域には、マウス laminin β1 と高い相同性を示す領域が 129-168 アミノ酸配列に存在した。Laminin は細胞接着など、様々な働きに関与する細胞表層タンパク質群である。SiiE129-168 アミノ酸配列からなるペプチドをマウスに投与しても IgG-PC 数は低下することから、IgG-PC 表層には SiiE の laminin β1 領域と相互作用するレセプターが存在することが考えられた。Laminin のレセプターの一つとして integrin β1 が報告されていることから、integrin β1 に着目した。骨髄 IgG-PC での integrin β1 の発現量は脾臓 IgG-PC での発現量と比較して優位に高かった。Integrin β1 が骨髄での IgG-PC の維持に寄与するか確かめるため、integrin β1 の抗体

をマウスに投与したところ骨髄IgG-PC数が減少した。GST-SiiE97-170とintegrin β1が相互作用するかを免疫沈降で検討したところ、2 つのタンパク質が相互作用することが強く示唆された。このことから、SiiEはIgG-PCのintegrin β1を介した生存様式を阻害することで、IgG-PCの細胞死を誘導すると考えられる。

続いて、IgG-PCの生存に関わる骨髄ニッチにおけるlaminin β1発現細胞を探索した。これまでに IgG-PC は CXCL12 発現ストローマ細胞と相互作用することが見出されていた。そこでCXCL12発現ストローマ細胞でのlaminin β1を調べたところ、細胞の表面に発現が確認された。骨髄IgG-PCのほとんどはlaminin β1発現細胞と相互作用していたが、IgM分泌PCとlaminin β1発現細胞の相互作用はほとんどみられなかった。このことから、骨髄 IgG-PC は laminin $\beta1^{+}$ $CXCL12^{+}$ストローマ細胞と相互作用することで、骨髄ニッチで維持されることが示唆された。

以上より、サルモネラが分泌したSiiEは骨髄に到達した後、IgG-PCのintegrin β1と相互作用することでlaminin $\beta1^{+}CXCL12^{+}$ストローマ細胞上での維持を阻害し、IgG-PC細胞死を特異的に誘導することが示唆された（図 1）。これまで麻疹などのいくつかのウイルス感染で、宿主が獲得していた抗体産生を抑制するという報告はあったものの①、細菌感染での報告はなかった。本研究で、細菌感染で長期獲得免疫を抑制させる分子機構を初めて明らかにした。

SiiEは持続感染する宿主のサルモネラ特異的抗体の産生も抑制する。しかしながら、サルモネラ感染マウスを解析すると、サルモネラは脾臓などの二次リンパ組織から多く検出されたが、骨髄ではほとんど検出できなかった。脾臓などの二次リンパ組織に存在するサルモネラが放出した SiiE が骨髄に移行し作用すると考えられるが、持続感染するサルモネラは脾臓のマクロファージ内で生存する。マクロファージ内にいるサルモネラから SiiE が効率的に骨髄に到達する機構についてはさらなる検討が必要である。

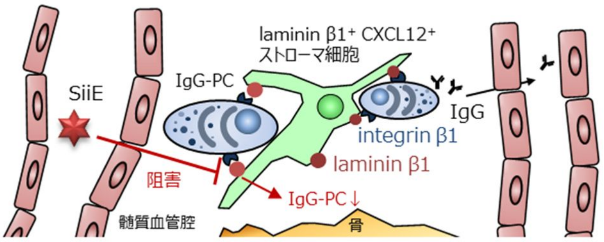

図 1　骨髄ニッチでの SiiE による IgG 分泌プラズマ細胞ーストローマ細胞相互作用の阻害モデル

(2)　細菌感染など炎症反応が誘導されると、骨髄系細胞のマクロファージが感染部位に集積する。一方、近年、骨髄由来マクロファージとは異なる組織局在型マクロファージが存在することが見出されている②。マウス腹腔には腹腔特異的マクロファージ（Large peritoneal macrophage; LPM）が存在し、炎症が誘導されるとLPMが消失し、骨髄由来マクロファージ（Small peritoneal macrophage; SPM）が集積する③。消失したLPMは炎症が治まると、腹腔内で再び検出され、SPMが消失する。今回、サルモネラ弱毒株を腹腔投与し、持続感染時のマウスにおける LPM、SPMの変遷を調べた。感染 7 日の腹腔内では LPM は完全に消失しており、感染後 21 日でも回復していなかった（図 2A）。感染 21 日では腹腔内からはサルモネラは検出されないものの、脾臓からわずかに検出されたことから、持続感染が継続しているためLPMが回復しない可能性が示唆された。SPMについて調べたところ、感染 7 日でも SPM を示す細胞は少なく、感染 14 日、21日でもほとんど増加しなかった（図 2B）。一方で、$Ly6C^{hi}Ly6G^{low}$のマクロファージに分化すると考えられる未成熟ミエロイド細胞が観測され、感染 14 日で顕著に増加していた（図 2C）。このことから、サルモネラ持続感染マウスの腹腔では、組織局在型マクロファージであるLPMが消失し骨髄系細胞の流入は見られるものの、SPM には分化できない未成熟ミエロイド細胞として維持される可能性が示唆された。

LPMの消失について詳細に調べたところ、感染6時間で顕著に減少し、24時間でほとんどが消失した。24時間後にLPMは腹腔に近接したリンパ節である大網で検出された。このことから、LPMは侵入したサルモネラを素早く認識し、リンパ節に輸送する可能性が考えられる。リンパ節でも未成熟マクロファージが検出されたことから、サルモネラは LPM によってリンパ節まで運ばれた後、未成熟マクロファージに貪食され各臓器に輸送されるものの、SPMのような成熟したマクロファージへの分化を抑制することで初期のマクロファージからの回避する戦略を有している可能性が考えられる。

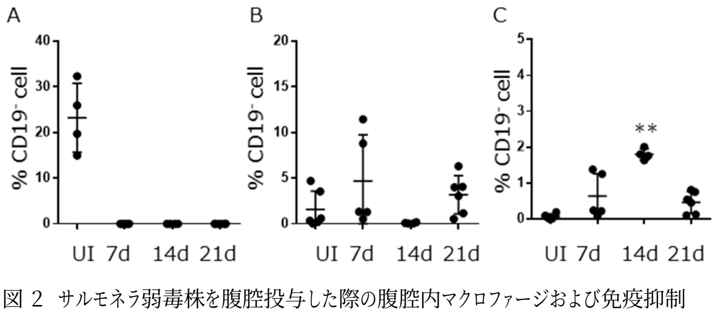

図 2　サルモネラ弱毒株を腹腔投与した際の腹腔内マクロファージおよび免疫抑制細胞の変遷

A 腹腔特異的マクロファージ（Large peritoneal macrophage; LPM）

B 骨髄由来マクロファージ（Small peritoneal macrophage; SPM）

C 単球系骨髄由来免疫抑制細胞（$Ly6C^{hi}Ly6G^{low}$）

UI：uninfected d: day ** $p<0.01$

(3)　持続感染する細菌では、宿主環境のストレスに応答して休眠状態になることが示唆されている[④]**。そこで、Lon プロテアーゼによる休眠状態の制御について検討した。休眠状態を誘導する抗菌薬ストレス下での生存についてコロニー数を指標に野生株と比較したところ、抗菌薬処理時の細胞密度に関わらず、処理後 1 時間の生存に Lon プロテアーゼの作用が大きく、24 時間後の生菌数に影響することが示唆された。Lon プロテアーゼの発現をテトラサイクリン（Tc）で誘導できる株を構築し、Lon を発現させない条件で抗菌薬に曝露しコロニー形成時に Lon を発現させたところ、Lon を発現させない時に比べてコロニー数が顕著に増加した。この現象は抗菌薬処理後 72 時間を経過しても観察できた（図 3）。このことは、Lon 欠損株は抗菌薬ストレス下で死滅せず、長期間生存し続けることができることを示唆しており、同様の細胞制御により宿主体内で持続感染していると考えられる。そこで、抗菌薬処理後に Lon プロテアーゼを発現したときの再増殖について詳細に調べたところ、抗菌薬処理によって生じた細胞内異常タンパク質を減少させることにより細胞分裂を促進することが示唆された。従って、宿主細胞内環境に応答した異常タンパク質が蓄積するものの、Lon プロテアーゼが消失することで細胞の増殖が抑制され、宿主体内に持続感染する機構が示唆された。（2）の結果から、感染 21 日では感染 7 日に比べて脾臓などの臓器内の菌数が減少しているにも関わらず、腹腔内細胞は感染初期と同様の分布であり炎症が持続していることが示唆されていた。マウスの組織から回収した Lon 欠損株は宿主環境に適応しているものの、L 寒天平板上ではコロニーまで増殖できずに計測できなかった可能性も考えられる。今後、本研究で作成した Tc 誘導型発現制御遺伝子変異株を用いて宿主免疫応答との相互作用を解析することにより、持続感染における細菌生存戦略の分子機構解明につながると期待できる。**

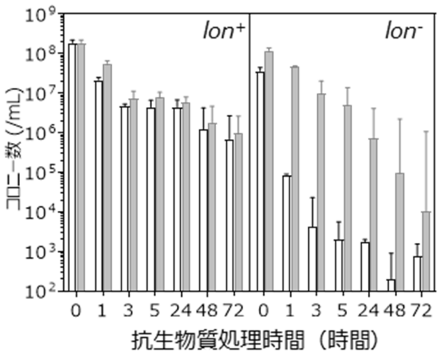

図 3　Lon 発現株（*lon*+）および Lon 非発現株（*lon*-）に抗生物質を曝露した後、L 寒天培地（□）と Tc 含有 L 寒天培地（■）に塗布したときのコロニー数の変化

＜引用文献＞

① Mina MJ, Kula T, Leng Y, Li M, de Vries RD, Knip M, Siljander H, Rewers M, Choy DF, Wilson MS, Larman HB, Nelson AN, Griffin DE, de Swart RL, Elledge SJ. Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science*. 2019 366:599-606.

② Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol* 2015 33, 643-675.

③ Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 107:2568-73.

④ Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C., and Helaine, S. Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. *Annu Rev Microbiol* 2019 73, 359-385.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　6件／うち国際共著　4件／うちオープンアクセス　6件）

１．著者名	４．巻
Takaya Akiko、Yamamoto Tomoko、Tokoyoda Koji	10
２．論文標題 Humoral Immunity vs. Salmonella	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Frontiers in Immunology	６．最初と最後の頁 3155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.03155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名	４．巻
Manne Christian、Takaya Akiko、Yamasaki Yuzuru、Mursell Mathias、Hojyo Shintaro、Wu Tsung-Yen、Sarkander Jana、McGrath Mairi A.、Cornelis Rebecca、Hahne Stefanie、Cheng Qingyu、Kawamoto Tadafumi、Hiepe Falk、Kaufmann Stefan H. E.、Yamamoto Tomoko、Radbruch Andreas、Tokoyoda Koji	116
２．論文標題 Salmonella SiiE prevents an efficient humoral immune memory by interfering with IgG+ plasma cell persistence in the bone marrow	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	６．最初と最後の頁 7425～7430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1818242116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名	４．巻
Takaya Akiko、Takeda Hikari、Tashiro Shogo、Kawashima Hiroto、Yamamoto Tomoko	294
２．論文標題 Chaperone-mediated secretion switching from early to middle substrates in the type III secretion system encoded by Salmonella pathogenicity island 2	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Journal of Biological Chemistry	６．最初と最後の頁 3783～3793
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.005072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名	４．巻
Nakamura Y、Takahashi H、Takaya A、Inoue Y、Katayama Y、Kusuya Y、Shoji T、Takada 、Nakagawa S、Oguma R、Saito N、Ozawa N、Nakano T、Yamaide F、Dissanayake E、Suzuki S、Villaruz A、Varadarajan S、Matsumoto M、Kobayashi T、Kono M、Sato Y、Akiyama M、Otto M、Matsue H、N Gabriel、Shimojo N	12
２．論文標題 Staphylococcus Agr virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Science Translational Medicine	６．最初と最後の頁 eaay4068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.aay4068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名	4．巻
Sun Xiaoning、Kawata Kentaro、Miki Atsuko、Wada Youichiro、Nagahama Masami、Takaya Akiko、Akimitsu Nobuyoshi	14
2．論文標題	**5．発行年**
Exploration of <i>Salmonella</i> effector mutant strains on MTR4 and RRP6 degradation	2020年
3．雑誌名	**6．最初と最後の頁**
BioScience Trends	255～262

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.5582/bst.2020.03085	有
オープンアクセス	**国際共著**
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　0件／うち国際学会　3件）

1．発表者名 高屋 明子, 田代 翔吾, 横井 達成, 後藤 義幸, 高橋 志達,　岡 健太郎, 川島 博人, 山本 友子
2．発表標題 Large peritoneal macrophage delivers Salmonella from the peritoneal cavity to the greater omentum
3．学会等名 第93回日本細菌学会総会
4．発表年 2020年

1．発表者名 横井 達成, 川島 博人, 山本 友子, 高屋 明子
2．発表標題 サルモネラ全身感染発症における DnaK シャペロンシステムによ る細胞分裂制御
3．学会等名 第93回日本細菌学会総会
4．発表年 2020年

1．発表者名 Akiko Takaya, Shogo Tashiro, Tatsunari Yokoi, Yoshiyuki Goto, Motomichi Takahashi, Kentaro Oka, Hiroto Kawashima, Tomoko Yamamoto
2．発表標題 Dissemination of Salmonella by Large Peritoneal Macrophages
3．学会等名 感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2019（国際学会）
4．発表年 2020年

１．発表者名
高屋 明子, 常世田 好司, 山本 友子

２．発表標題
Salmonella Pathogenicity Island 4-encoded SiiE reduces IgGsecreting plasma cell in the bone marrow

３．学会等名
第92回日本細菌学会総会

４．発表年
2019年

１．発表者名
Shogo Tashiro, Hikari Takeda, Hiroto Kawashima, Tomoko Yamamoto, Akiko Takaya

２．発表標題
Analysis of chaperones in the assembly of the type III secretion apparatus encoded by Salmonella Pathogenicity Island-2

３．学会等名
感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2019（国際学会）

４．発表年
2020年

１．発表者名
Tatsunari Yokoi, Hiroto Kawashima, Tomoko Yamamoto, Akiko Takaya

２．発表標題
DnaK chaperon system controls Salmonella pathogenesis via regulation of cell division

３．学会等名
感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2019（国際学会）

４．発表年
2020年

１．発表者名
高屋明子、常世田好司、山本友子

２．発表標題
サルモネラSiiEによる骨髄IgGプラズマ細胞制御

３．学会等名
第１０１回日本細菌学会関東支部総会

４．発表年
2018年

1．発表者名 前川尚輝、板寺健悟、石原潤一、梶谷颯希、田中大器、関口哲志、庄子習一、石橋正己、高橋弘喜、高屋明子
2．発表標題 ATP依存型Lonプロテアーゼによるパーシスタンス制御機構
3．学会等名 第94回 日本細菌学会総会
4．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院薬学研究院活性構造化学研究室 https://www.p.chiba-u.jp/lab/kassei/index.html

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Rheuma-Forschungszentrum Berlin (DRFZ)			