

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 -2008  
 課題番号：19790315  
 研究課題名 (和文) 赤痢菌感染による宿主マクロファージ細胞死誘導の分子機構  
 研究課題名 (英文) Molecular analysis of macrophage cell death induced by shigella infection.  
 研究代表者  
 氏名 (アルファベット) 鈴木 志穂 (SUZUKI SHIHO)  
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・特任研究員  
 研究者番号 80444074

## 研究成果の概要：

赤痢菌は宿主へ侵入した後、マクロファージに対してネクロシスに近い形態的特徴を呈する細胞死(pyroptosis)を誘導する。本細胞死誘導の分子機構は未だわかっていない部分が多い。本研究では、赤痢菌が分泌する Type エフェクターのうちの1つである IpaH7.8 が ipaf inflammasome を活性化させ、pyroptosis を誘導することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：感染免疫

## 1. 研究開始当初の背景

赤痢菌が引き起こす下痢疾患により、発展途上国では乳幼児を中心に毎年多くの人命が失われている。また一方では、キノロン系耐性を含む薬剤耐性菌の出現により、抗生剤による治療が困難な場合が増加している。国内では、赤痢菌の臨床分離株はほとんどが多剤耐性菌であることから、有効なワクチン

の開発が求められているが、赤痢菌は感染に伴い強い炎症を誘導するために、弱毒化した生菌ワクチンを用いた場合の安全性は確立されていない。このような状況下において、ワクチン開発を含めた効果的予防法、治療法を確立するために、赤痢菌の感染過程を分子レベルで明らかにすることが急務とされている。

赤痢菌は経口的に体内に取り込まれ大腸に

達した後、大腸孤立リンパ節上に分布するM細胞から侵入し、トランスサイトーシスによりM細胞を通過する。その後、直下に常在するマクロファージに貪食されるが、赤痢菌はマクロファージに細胞死を誘導して細胞を殺す能力を有しており、貪食殺菌から逃れることができる。赤痢菌に破壊された結果、マクロファージから多量のIL-1、IL-18や炎症性物質が放出され、感染局所に強い炎症反応が引き起こされる。殺傷したマクロファージから離脱した赤痢菌は、上皮細胞へ側底面より侵入し、細胞質内で増殖しつつ隣接上皮細胞へ移行・拡散していくことにより上皮組織を破壊し、炎症性の粘血性下痢を惹起する(Ogawa and Sasakawa, 2005, *Cell. Microbiol.*)。一連の感染過程の中で、赤痢菌がマクロファージに対して引き起こす細胞死は、赤痢菌の病原性に大きく影響するとともに、赤痢菌特有の激しい炎症誘導の引き金になる重要なステップである。

近年、赤痢菌の病原性決定に関わる主要な病原因子が次々と特定されており、それらはType 3分泌装置を通じて宿主細胞へと分泌され、細胞機能を様々に修飾する機能性タンパク質 (Type 3エフェクター) であることがわかってきている。赤痢菌感染により引き起こされるマクロファージの細胞死においても、赤痢菌Type 3エフェクターが必須であることが知られている。その機構については、これまでアポトーシス誘導説(Zychlinsky *et.al.*, 1992, *Nature*) とオンコーシス説(Fernandez-Prada. *et.al.*, 1997, *Infect.Immun.*)、及び両細胞死進行説(Nonaka *et.al.*, 1999, *FEMS Microbiol.Lett.*)など多説が報告されており、未だコンセンサスが得られていない。しかし最近、赤痢菌やサルモネラ菌感染時に引き起こされるマクロファージの細胞死は、アポトーシスに特徴的な細胞縮小や核縮小、DNAの断片化が認められると同時に、カスパーゼ1の活性化とそれに伴うオンコーシスの特徴

である細胞膜のポア形成や細胞質の流出が認められ、両者の形態的特徴を併せ持つ特殊な細胞死であることがわかってきた(Brennan and Cookson, 2000, *Mol.Microbiol.*; Fink and Cookson, 2006, *Cell. Microbiol.*, Nonaka *et.al.*, 2003, *Microbiology*)。そして、どちらの定義にも属さない新しいタイプの細胞死として認識され、Pyroptosisと命名されている(Fink *et.al.*, 2005, *Infect.Immun.*; Swanson and Molofsky, 2005, *Autophagy*)。このpyroptosis誘導は、赤痢菌の病原性発現に直接的に関与する重要な要因であるにも関わらず、赤痢菌のどのエフェクター群が機能し、どのようなメカニズムによりマクロファージが死に至るのか、分子レベルでの知見は未だ確立されていない。

## 2. 研究の目的

病原細菌がマクロファージに対し引き起こす細胞死(pyroptosis)誘導は、病原細菌にとって感染力の強さや炎症応答を決定づける重要な要因であり、本分子機構を解明することは防疫上の意義が大きい。本研究は主要な粘膜病原細菌である赤痢菌を研究対象とし、赤痢菌感染によるマクロファージ細胞死誘導の分子機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、赤痢菌が分泌するエフェクタータンパク質の詳細な性状解析を進め、感染時におけるマクロファージ細胞死誘導、及びそれに伴う炎症制御の分子メカニズムを明らかにすることを計画している。具体的には、以下に示す項目を企図した。

1) マクロファージ細胞死に關与する赤痢菌エフェクタータンパク質を特定する。各赤痢菌 Type エフェクターの欠失変異株及び過剰発現株を作成し、マクロファージに対する細胞死誘導能の変化を測定する。次に、特定された赤痢菌エフェクターが誘導するマクロファージ細胞死の細胞形態、DNAの断片化、カスパーゼ活性等について詳細なcharacterizationを行い、細胞死の種類を特定する。

2) 細胞死関連の各シグナル経路の因子の発現量や活性を赤痢菌エフェクターがどのように変化させるか明らかにし、その作用点を特定する。また、赤痢菌エフェクターをマクロファージ内で発現させ、その局在や影響を確認する。

3) 赤痢菌野生株、エフェクター欠失変異株及びエフェクター遺伝子相補株を用いて動物感染実験を行い、赤痢菌定着菌数やサイトカイン量の評価を行う。これにより、エフェクターが赤痢菌の病原性や炎症応答に与える影響を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

1) 各赤痢菌 Type エフェクターの欠失変異株及び過剰発現株を用いたマクロファージ感染実験の結果、Type エフェクターのうちの1つである IpaH7.8 が pyroptosis 誘導に必須であることを見出した。マクロファージに赤痢菌野生株、IpaH7.8 欠損株及び過剰発現株を感染させ、LDH アッセイ・FACS 解析及び顕微鏡観察を行ったところ、IpaH7.8 分泌依存的に pyroptosis 誘導が認められた。LPS 刺激により活性化させたマクロファージに対しては、pyroptosis がより強く誘導された。

また、IpaH7.8 依存的細胞死誘導はマクロファージ (J774, RAW) においてのみ確認され、Hela, 293T, Jurcat, Raji 等においては同様な活性は認められなかった。

2) IpaH7.8 をマクロファージ内(J774,RAW)内で発現させたところ、細胞質への局在が認められた。IpaH7.8 はマクロファージに対して特異的に強い細胞毒性を示した。また赤痢菌感染マクロファージにおいて、IpaH7.8 の分泌依存的に pyroptosis の典型的特徴として知られる Caspase-1 活性化、及び IL-1、IL-18 の著しい上昇が認められ、更に Caspase-1 inhibitor 処理により IpaH7.8 による細胞死誘導は阻害された。一方、Caspase-3 inhibitor 処理による影響は認められなかった。さらに、IpaH7.8 ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、IpaH7.8 依存的細胞死が認められなかった。以上の結果は、IpaH7.8 が ipaf inflammasome pathway を活性化させ pyroptosis を誘導することを示している。IpaH7.8 は in vitro において E3 ユビキチンリガーゼ活性を示し、また MG132 処理により IpaH7.8 依存的細胞死が阻害されることから、ユビキチン-プロテアソーム系の関与が示唆された。

3) 赤痢菌野生株、IpaH7.8 欠失変異株及びエフェクター遺伝子相補株を用いて、Balb/c マウスに対する経鼻感染実験を行った。感染 24 時間後のマウスの体重測定を行った後、肺組織を摘出・磨砕し、赤痢菌定着菌数の測定、及び IL-1 サイトカイン量の ELISA 測定を行った。その結果、IpaH7.8 依存的にマウスの体重減少、肺重量の増加、赤痢菌定着菌数の増加、及び IL-1 サイトカイン量の上昇が認められ

た。

今回我々は、赤痢菌が分泌する Type エフェクター IpaH7.8 がマクロファージに pyroptosis を誘導することを見出した。マクロファージの pyroptosis は、粘膜炎症の激しさを決定づける要因であることから、本研究により得られた知見は、炎症は最少化され、且つ、防御反応は最大限に誘導される理想のワクチン開発に貢献するものと期待される。

また、Type 分泌装置により病原性因子を分泌する病原細菌は、サルモネラ菌やペスト菌、腸炎ビブリオから、*pseudomonas syringae*などの植物病原細菌まで、広範囲にわたり存在する。本研究にて着目したエフェクター IpaH7.8 は、サルモネラ菌をはじめ、複数の動植物病原細菌において、ホモログに相当する遺伝子が存在することがわかっているが、それら病原細菌の感染時における役割についてはわかっていない。従って、他の病原細菌がもつエフェクターの分子機構を解明する上で、本研究にて得られた知見が貢献する可能性は高いと思われる。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

鈴木志穂・笹川千尋、赤痢菌の type エフェクター IpaH7.8 によるマクロファージ細胞死誘導、第82回日本細菌学会総会、2009年3月12日、名古屋国際会議場

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 志穂 ( SUZUKI SHIHO )  
東京大学・医科学研究所・特任研究員  
研究者番号 : 80444074

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし