

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03467

研究課題名(和文) 低酸素環境が拓く細菌感染 宿主応答機構の新機軸

研究課題名(英文) New study of bacteria-host interaction in the hypoxic environment

研究代表者

鈴木 敏彦 (Toshihiko, Suzuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10292848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含むほぼ全ての多細胞生物は、酸素を失えば生命を維持できない。その一方で生体内の酸素分圧は末梢に向かって低下し、さらに生理的環境要因や疾患によっても低酸素状態になっている。細菌の中には低酸素環境でのみ増殖できる菌がいるが、こういった細菌の低酸素環境での感染を調べる実験系に酸素濃度が考慮されていなかった。そこで本研究では、低酸素環境における細菌感染と宿主の応答機構について検討した。その結果、低酸素環境下ではこれまで報告と異なる宿主炎症応答が生じることが判明し、この原因として細胞の貪食機能や低酸素応答が関与していた。本研究により、感染部位の環境を反映した本来の菌の感染と宿主応答の姿を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、低酸素環境において今までとは異なる宿主応答機構が隠れている可能性が示唆された。低酸素環境における菌感染時の宿主応答を包括的に解析し、その分子メカニズムを解明することにより得られた新知見は、嫌気性細菌や微好気性細菌の低酸素環境下における本来の感染機構と宿主応答機構の解明に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Almost all multicellular organisms, including humans, cannot sustain life if they lose oxygen. On the other hand, the partial pressure of oxygen in the living body decreases toward the periphery, and the oxygen state becomes hypoxic due to physiological environmental factors and diseases. Some bacteria can grow only in a hypoxic environment, but the oxygen concentration was not considered in the in vitro experimental system for investigating the infection of these bacteria. Therefore, in this study, we investigated the molecular mechanism between bacterial infection and the host in a hypoxic environment. As a result, it was found that host inflammatory responses different from that reported so far occurs in a hypoxic environment, and the phagocytic function of cells and the hypoxic response gene elements were involved as the cause. Through this study, we found the original bacterial infection and host response that reflected the environment of the infected site.

研究分野：細菌学、感染免疫学

キーワード：低酸素応答 宿主応答 細菌感染 インフラマゾーム

1. 研究開始当初の背景

生体内における低酸素環境に着目した研究として、心筋梗塞に伴う虚血状態や代謝疾患等に見られる低酸素環境における細胞応答のメカニズム、あるいはがんの転移や浸潤における低酸素環境が細胞に与える影響等を調べた研究がよく知られている。特に、1992年に細胞の低酸素誘導性因子 Hypoxia Inducible Factor (HIF)が同定されて以来、HIFによる遺伝子発現制御機構を中心に、細胞の低酸素応答機構の分子レベルでの理解が進んできた。一方で、細菌の中にも酸素を嫌う嫌気性菌や数%の酸素を至適とする微好気性菌といった、生存・増殖が酸素濃度に大きく影響される細菌が存在する。生体内においても生理的に低酸素状態下にある組織、たとえば歯肉溝や消化管腔にはそのような細菌が多く定着する。しかし、細菌による宿主への感染について低酸素環境を考慮して調べている研究はほとんどない。したがって、低酸素環境における細菌の感染や宿主応答機構を解明する目的で *in vitro* の解析を行う場合、改めて実験環境中の酸素濃度を厳密に考慮すべきだという考えに至った。実際、低酸素環境における菌、宿主両面から感染免疫応答を解析した研究としては赤痢菌、緑膿菌といった通性嫌気性菌あるいは好気性菌の結核菌でしか報告されていない。このように感染症における低酸素環境の関与については、感染部位の酸素濃度とともにさらに感染によって誘導される低酸素状態も考慮する必要がある、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

このような背景から、低酸素環境での嫌気性菌の感染実験を試行したところ、感染に伴ってインフラマゾーム活性化が著しく亢進する現象を初めて見出した。低酸素環境において今まで報告されている知見とは異なる宿主応答機構が隠れている可能性が強く示唆されたことから、本研究では、嫌気性および微好気性菌による感染に焦点を絞り、低酸素環境において細菌感染に対するインフラマゾーム活性化を含む宿主応答（とくに感染に伴う炎症応答）の解析を網羅的に展開する研究を企図した。

3. 研究の方法

(1) 種々の低酸素環境下におけるインフラマゾーム活性化をはじめとした宿主炎症応答の解明

マルチガスインキュベーターを用いて大気環境（酸素濃度 20%）および低酸素環境（0.1%、1% および 5%）を維持しつつ、異なった酸素濃度での菌感染後の宿主応答の違いを解析した。各菌株は至適条件にて培養後に感染実験系へ持ち込んだ。宿主細胞としてマウス骨髄由来マクロファージの他、ヒトおよびマウス由来の歯肉上皮、歯根膜細胞、胃および腸管上皮細胞を用いた。細胞応答として、各種サイトカインの産生の他、細胞内 NF- κ B および MAPK シグナル、ユビキチン化シグナル、インフラマゾーム活性化などを解析し、それらの活性化程度と酸素濃度との関連を解析した。

(2) 細菌側因子の同定と当該因子の欠損株等を用いた機能の解明

菌が産生する特有の病原因子に着目してその発現が増強しているのか同様に解析した。タンパク分解酵素、各種毒素、付着因子、IX型分泌装置 (type IX secretion system, T9SS) を構成する遺伝子群、IV型分泌装置 (T4SS) を構成する遺伝子群等に着目して発現量の変化について調べた。さらに当該遺伝子の欠損株を用いて、低酸素環境において発現が変動して宿主応答に影響する病原体側因子を同定した。

(3) 宿主側の関連因子の同定と当該因子欠損細胞およびマウスの作製と感染モデルを用いた検証

宿主細胞における大気環境と低酸素環境での遺伝子の発現変動、並びにサイトカイン産生、インフラマゾーム活性化について比較・解析した。次に、宿主応答に関与する宿主因子を欠損した細胞や各種阻害剤を用いて、当該宿主因子の関与を解析した。

4. 研究成果

ピロリ菌 *Helicobacter pylori* 感染に伴う低酸素環境におけるマクロファージの応答について報告する。マクロファージへの感染によって誘導されるインフラマゾーム活性化は低酸素環境において亢進することが明らかとなった。

(1) 種々の低酸素環境下におけるインフラマゾーム活性化をはじめとした宿主炎症応答の解明

マルチガスインキュベーターを用いて大気環境（酸素濃度 20%）および低酸素環境（5%および1%）を維持しつつ、異なった酸素濃度での菌感染後の宿主応答の違いを解析した結果、低酸素環境では感染に伴って活性化されるインフラマゾームが亢進し、カスパーゼ-1の活性化と IL-1 β 産生の亢進が認められた (図1)。

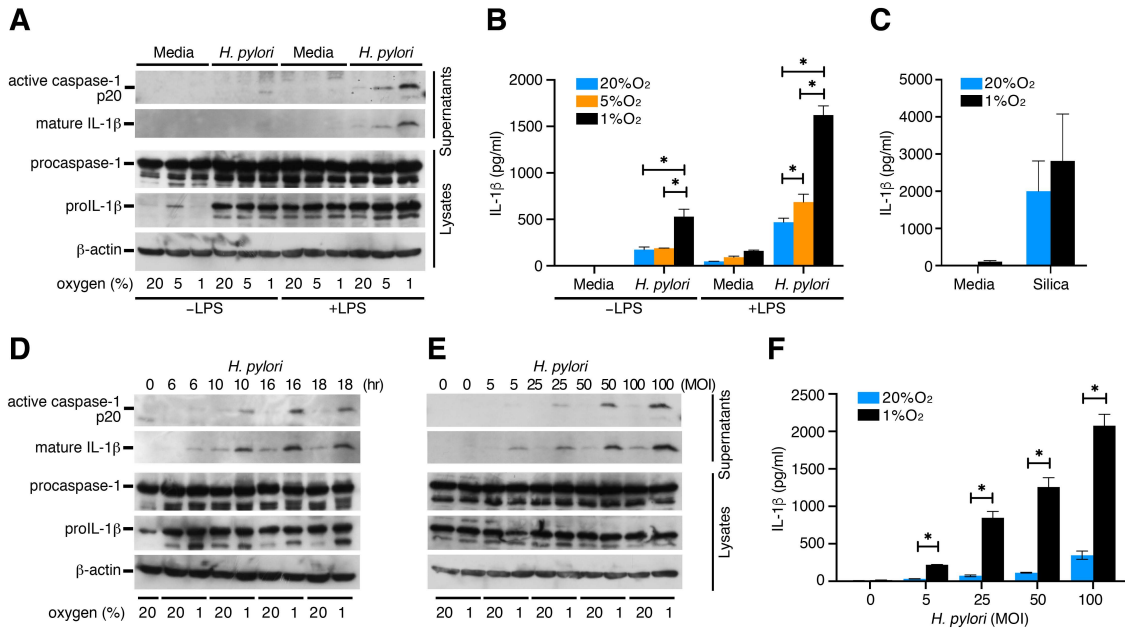


図 1. 低酸素環境において亢進するインフラマソーム活性化

A. カスパーゼ-1 活性化と IL-1 β の部分切断。B. IL-1 β の産生。C. silica (活性化コントロール) 刺激に対する酸素の影響。D-F. 時間および感染菌数に依存した活性化 (Adiza et al. BBRC, 2021)

(2) 細菌側因子の同定と当該因子の欠損株等を用いた機能の解明

H. pylori の病原因子である空胞化毒素 VacA および IV 型分泌装置の遺伝子欠損株を作製し、インフラマソーム活性化亢進との関連を解析した結果、これらの病原因子は関与しないことが示された。

(3) 宿主側の関連因子の同定と当該因子欠損細胞およびマウスの作製と感染モデルを用いた検証

低酸素環境特異的なインフラマソーム活性化亢進は、低酸素誘導因子 HIF-1 α 依存的なピロリ菌に対するマクロファージ食作用能の上昇によるものであることを見出した (図 2)。この食作用亢進はピロリ菌に特異的なものであった。さらにマウスを用いた動物実験から、ピロリ菌感染によって胃組織において誘導される IL-1 β は HIF-1 α 阻害剤により有意に減少することが示された。

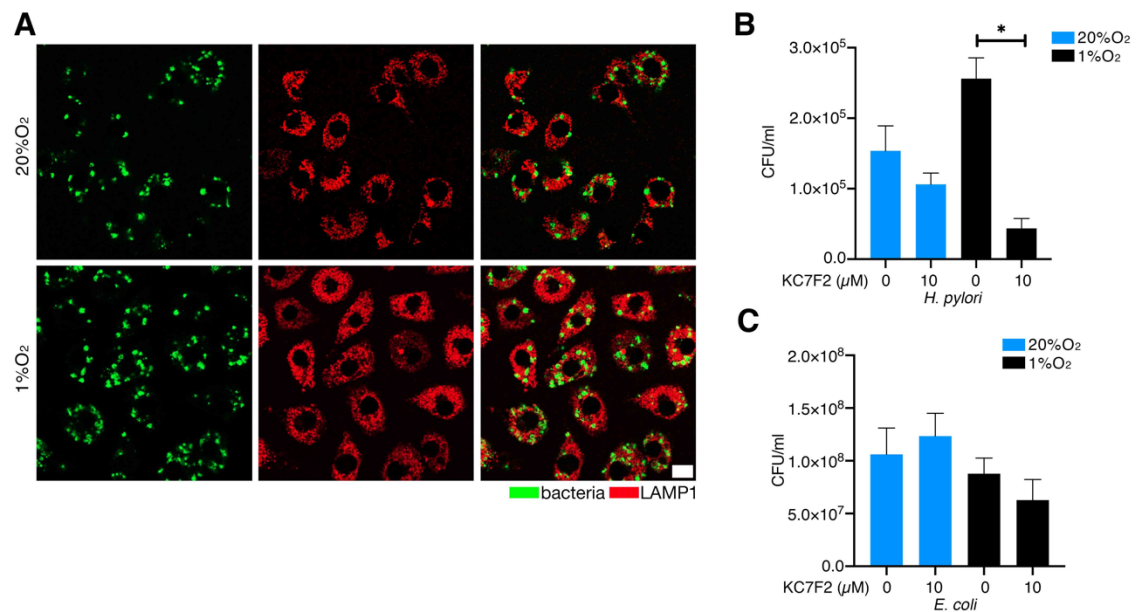


図 2. 低酸素環境におけるマクロファージの *H. pylori* 食食能亢進

A. 細胞による食作用。B. 食食された菌数の定量化と HIF-1 α 阻害剤 KC7F2 の効果。C. 大腸菌 (コントロール) の食食菌数の定量化。D-F. (Adiza et al. BBRC, 2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saeki A, Tsuchiya K, Suda T, Into T, Hasebe A, Suzuki T, Shibata K.	4. 巻 161
2. 論文標題 Gasdermin D-independent release of interleukin-1 by living macrophages in response to mycoplasmal lipoproteins and lipopeptides.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunol	6. 最初と最後の頁 114-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.13230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ayibieke A, Kobayashi A, Suzuki M, Sato W, Mahazu S, Prah I, Mizoguchi M, Moriya K, Hayashi T, Suzuki T, Iwanaga S, Ablordey A, Saito R	4. 巻 11
2. 論文標題 Prevalence and characterization of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase-producing <i>Acinetobacter</i> isolates from Ghana.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 587398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.587398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ashida H, Sasakawa C, Suzuki T.	4. 巻 39
2. 論文標題 A unique bacterial tactic to circumvent the cell death crosstalk induced by blockade of caspase-8.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 e104469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020104469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Prah I, Ayibieke A, Nguyen TTH, Iguchi A, Mahazu S, Sato W, Hayashi T, Yamaoka S, Suzuki T, Iwanaga S, Ablordey A, Saito R	4. 巻 74
2. 論文標題 Virulence profile of diarrhoeagenic <i>Escherichia coli</i> from the Western region of Ghana. Japanese journal of infectious diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 115-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2020.356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurashima Y, Kigoshi T, Murasaki S, Arai F, Shimada K, Seki N, Kim YG, Hase K, Ohno H, Kawano K, Ashida H, Suzuki T, Morimoto M, Saito Y, Sasou A, Goda Y, Yuki Y, Inagaki Y, Iijima H, Suda W, Hattori M, Kiyono H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pancreatic glycoprotein 2 is a first line of defense for mucosal protection in intestinal inflammation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Comm	6. 最初と最後の頁 1067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21277-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kinoshita-Daitoku R, Kiga, K, Miyakoshi M, Otsubo R, Ogura Y, Sanada T, Bo Z, Phuoc TV, Okano T, Iida T, Yokomori R, Kuroda E, Hirukawa S, Tanaka M, Sood A, Subsomwong P, Ashida H, Binh TT, Nguen LT, Van KV, Ho VDQ, Nakai K, Suzuki T, Yamaoka Y, Hayashi T, Mimuro H.	4. 巻 未定
2. 論文標題 A bacterial small RNA regulates the adaptation of Helicobacter pylori to the host environment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Comm	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Prah I, Ayibieke A, Mahazu S, Tani-Sassa C, Hayashi T, Yamaoka S, Suzuki T, Iwanaga S, Ablordey A, Saito R.	4. 巻 未定
2. 論文標題 Emergence of oxacillinase-181 carbapenemase-producing diarrheagenic Escherichia coli in Ghana.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Emerg Microbe Infect	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abass A, Okano T, Boonyaleka K, Kinoshita-Daitoku R, Yamaoka S, Ashida H, Suzuki T.	4. 巻 未定
2. 論文標題 Effect of low oxygen concentration on activation of inflammation by Helicobacter pylori.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Comm	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Leewananthawet A, Arakawa S, Okano T, Kinoshita RD, Ashida H, Izumi Y, Suzuki T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Ozone ultrafine bubble water induces the cellular signaling involved in oxidative stress responses in human periodontal ligament fibroblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science and Technology of Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 589-598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14686996.2019.1614980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡野徳壽, 芦田浩, 鈴木志穂, 鈴木敏彦	4. 巻 86
2. 論文標題 最近の歯学 細菌感染制御 Porphyromonas gingivalisによる炎症誘導機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 口腔病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamura K, Ashida H, Okano T, Kinoshita-Daitoku R, Suzuki S, Ohtani K, Hamagaki M, Ikeda T, Suzuki T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Inflammasome activation induced by perfringolysin O of Clostridium perfringens and its involvement in the progression of gas gangrene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers Microbiology	6. 最初と最後の頁 2406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.02406	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 Tanaka M, Kinoshita-Daitoku R, Kiga K, Sanada T, Zhu B, Okano T, Aikawa C, Iida T, Ogura Y, Hayashi T, Okubo K, Kurosawa M, Hirahashi J, Suzuki T, Nakagawa I, Nangaku M, Mimuro H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Group A Streptococcus establishes pharynx infection by degrading the deoxyribonucleic acid of neutrophil extracellular traps.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60306-w	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 Kinoshita-Daitoku R, Kiga K, Sanada T, Ogura Y, Bo Z, Iida T, Yokomori R, Kuroda E, Tanaka M, Sood A, Suzuki T, Nakai K, Hayashi T, Mimuro H.	4. 巻 525
2. 論文標題 Mutational diversity in mutY deficient <i>Helicobacter pylori</i> and its effect on adaptation to the gastric environment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 806-811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Adiza Abass, 鈴木敏彦
2. 発表標題 H. pylori-mediated cytokine production enhanced under low oxygen. Adiza Abass
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡野徳壽、鈴木敏彦
2. 発表標題 低酸素環境下においてTRIF-HIF-1 経路はP. gingivalisによるインフラマソーム活性化亢進を制御している
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芦田浩、笹川千尋、鈴木敏彦
2. 発表標題 腸管病原菌による宿主細胞死クロストーク制御機構の解明
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Prah I, Ayibieke A, Mahazu S, Tani SC, Hayashi T, Suzuki T, Iwanaga S, Yamaoka S, Ablordey A, Saito R.
2. 発表標題 Whole-genome characterization of OXA-181 carbapenemase producing Escherichia coli from diarrheic patients in Ghana
3. 学会等名 第32回日本臨床微生物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯 歩、土屋 晃介、須田 貴司、引頭 毅、長谷部 晃、鈴木 敏彦、柴田 健一郎
2. 発表標題 マイコプラズマのリボペプチドFSL-1はどのようにして生きたマクロファージからIL-1 の放出を誘発するのか
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 木下 遼、氣駕 恒太郎、大坪 亮太、小椋 義俊、真田 貴人、岡野 徳壽、鈴木 敏彦、林 哲也、三室 仁美
2. 発表標題 ヘリコバクター・ピロリのsmall RNAによる持続感染機構の解析
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 芦田 浩、笹川 千尋、鈴木 敏彦
2. 発表標題 バクテリオロジーのフロントランナー～AMED獲得者の革新的細菌学研究～ 腸内細菌叢と病原細菌の相互作用解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山村 清展、岡野 徳壽、大谷 郁、鈴木 敏彦
2. 発表標題 ウェルシュ菌によるインフラマゾーム活性化
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 鈴木 志穂、鈴木 敏彦、笹川 千尋
2. 発表標題 GLMN-cIAP1/2は細菌感染に対するインフラマゾーム活性をコントロールする
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 Tokuju Okano, Toshihiko Suzuki
2. 発表標題 Hypoxia induces enhancement of inflammasome activation by <i>P. gingivalis</i>
3. 学会等名 7th International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okano Tokuju, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro, Suzuki Toshihiko
2. 発表標題 Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces activation of noncanonical inflammasome via lysosomal degradation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Prah Isaac, Ayibieke Alafate, 井口 純, Mahazu Samiratu, 佐藤 和佳菜, 鈴木 敏彦, 山岡 昇司, 岩永 史朗, Ablordey Anthony, 齋藤 良一
2. 発表標題 Virulence Profile of Diarrheagenic E. coli from the Western region of Ghana
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 木下 遼、 氣鷲 恒太郎、 大坪 亮太、 小椋 義俊、 眞田 貴人、 岡野 徳壽、 鈴木 敏彦、 山岡 吉生、 林 哲也、 三室 仁美
2. 発表標題 RNAで細菌を制御する (Regulating with RNA in Bacteria sRNA regulates pathogenicity during persistent infection of Helicobacter)
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 岡野徳壽、鈴木敏彦
2. 発表標題 A. actinomycetemcomitans induces inflammasome activation via lysosomal degradation
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京医科歯科大学医歯学総合研究科 細菌感染制御学分野 http://www.tmd.ac.jp/dept/dentistry/bac/index.html 東京医科歯科大学国際交流サイト ガーナ拠点の取り組み https://www.tmd.ac.jp/international/globalization/tmdu_international_collaboration_centers/ghana/ghana.html</p>

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			
米国	ミシガン大学			
ガーナ	ガーナ大学野口記念医学研究所			
タイ	チャンマイ大学			