

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790428

研究課題名（和文）

腸管病原性大腸菌の定着機構と粘膜免疫系の解析および腸管再構築感染モデルの検討

研究課題名（英文）

Analysis of the interaction between enteropathogenic *Escherichia coli* infection and mucosal immunity *in vitro* and *in vivo*

研究代表者

永井 武 (NAGAI TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60418655

研究成果の概要（和文）：

腸管病原性大腸菌（EPEC）が腸管に定着するための定着機構や免疫制御機構に関しては、まだ不明な点が多く残されている。そこで、マウスを用いて、パイエル板と付着の関係および EPEC の III 型分泌装置が樹状細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、*C. rodentium* とパイエル板欠損マウスを用いた実験から、パイエル板が存在することによって、菌の定着が増大することが明らかとなった。また、菌の III 型分泌装置は、樹状細胞や上皮細胞に作用し、さまざまな遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to investigate the interaction between enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and host mucosal immune response. Consequently, we found that Peyer's patch was important for bacterial colonization in C57BL/6 mouse but not Balb/c mouse. And then we performed the *in vitro* infection model using bonemarrow derived dendritic cells and epithelial cells. Consequently, type III secretion system of EPEC directly or indirectly regulated the expression of various genes on dendritic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：病原細菌 免疫

1. 研究開始当初の背景

病原細菌の多くは粘膜面に付着もしくは侵入し感染症を引き起こす。一方、宿主側は粘膜および全身のさまざまな生体防御機能を駆使して、異物の排除を行う。特に腸管は、消化吸収を行う器官であるが、同時に最大の免疫器官でもある。近年、粘膜免疫系の研究が盛んに行われるようになり、今まで謎に包まれていたが、徐々にその全貌が明らかにな

りつつある。しかし、病原細菌が粘膜免疫系にどのように制御しているか、ほとんど明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的として、病原細菌が腸管粘膜免疫系をどのように制御し、感染を成立させているのか、また、宿主がどのように排除しているのかを解析するために、パイエル板と

樹状細胞に注目して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 病原細菌

病原細菌として、*in vitro* では、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*; EPEC) を用いて、またマウスには EPEC と同じ病原因子を持ち、マウスに感受性を示す *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) を用いた。

(2) パイエル板欠損マウスの作成

パイエル板の影響を見るために、妊娠 14 日の母マウスに抗 IL-7 受容体抗体を静脈内投与することで、産まれる子供にはパイエル板が欠損しているマウスを作成した、

(3) 投与方法

感染させるためには、以下の 2 種類の投与方法を用いた。

①経口投与 *C. rodentium* の培養液を希釈して、 $2 \times 10^8 / 200 \mu\text{l}$ を経口ゾンデを用いて投与した。

②腸管投与 マウスをネブタール/キシラジンの麻酔下、腹部を開腹し小腸もしくは大腸から 30G の注射器で菌液 (4×10^6) を注入する。縫合後、通常通り飼育した。

(4) サンプルング

経時的に感染菌数や抗体価測定するため、毎週糞の回収と採血を行った。糞便は、PBS 中でホモジネートし、段階的に希釈して Macconkey 寒天培地に塗布した。

(5) 樹状細胞の調製

マウスの骨髄細胞を、GM-CSF 存在下 9 日間培養し、非接着細胞を骨髄由来樹状細胞 (BMDC) として用いた。

(6) 感染実験

EPEC を BMDC に $\text{moi}=10$ で感染させて、遠心後 4 時間培養した。その後、樹状細胞から mRNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 腸管感染におけるパイエル板の役割

一般的に、小腸に存在するパイエル板は、抗原を M 細胞から取り込み、免疫応答を行っている。ここで、まず、*C. rodentium* を用いて、パイエル板が感染の成立に必要であるか検討した。パイエル板欠損 B6 および Balb/c マウスを作成し、6 週齢のマウスに *C. rodentium* をそれぞれ経口投与および腸管投与し、糞便中の菌数を経時的に測定した。

その結果 B6 マウスにおいて、パイエル板欠損マウスではほとんど糞便中の菌は観察されなかったが、Balb/c では、野生型と同様に観察された。一方、腸管投与の時に、小腸から投与 (パイエル板通過) もしくは大腸から (パイエル板不通過) することで、パイエル板の感染における役割を検討した。その結果、大腸経由の投与の方が、小腸経由の投与

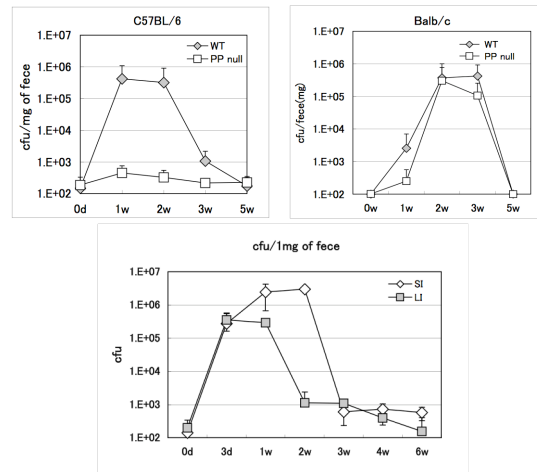


図 1 パイエル板と *C. rodentium* の感染

よりも、投与後 2 週間の時点で大幅に糞便中の菌数が少ないことが明らかとなった。つまり、B6 において、パイエル板があることで感染が増強されることが示唆された。また、感染時に、大腸のリンパ集積の構造にも変化が見られ、今後検討を行う。

次に、EPEC が III 型分泌装置を用いて、免疫応答をどのように制御しているのかを検討した。そこで、宿主の免疫応答の中心的役割を果たすと考えられている樹状細胞に対して、EPEC が III 型分泌装置依存的にどのように制御しているか検討した。まず BMDC に EPEC の野生株 (WT) と III 型分泌装置欠損株 (*escF*) を感染させ 3 時間後に mRNA を回収した。これらの mRNA についてマイクロアレイ解析を行った (図 2)。

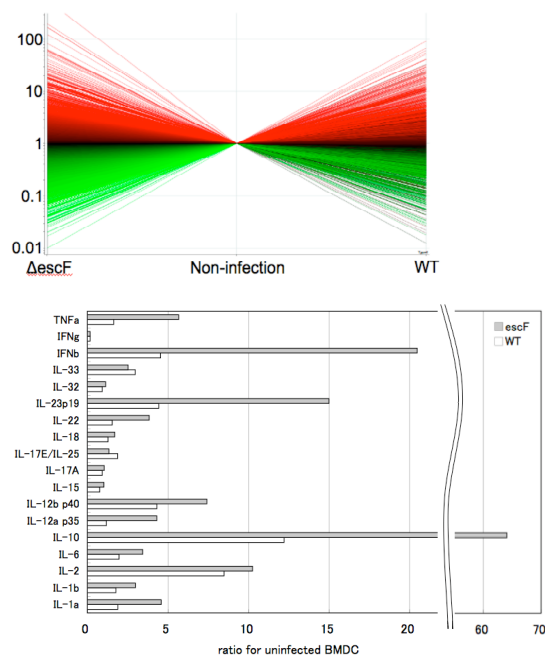
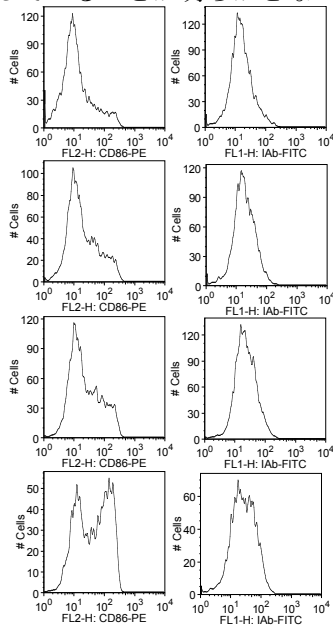


図 2 マイクロアレイ解析

非感染細胞に対し、あがった遺伝子を赤で、下がった遺伝子を緑で示した。また、III型分泌装置によって、2倍以上の増減があった遺伝子は102個であった。この結果より、III型分泌装置依存的に様々な因子を制御していることが明らかとなった。特に、EPECはNFκB経路を阻害することが知られているが、今回の実験からも、NFκBによって制御されている多くの遺伝子がIII型分泌装置依存的に阻害されていることが明らかとなった。例えば、TNFαやIL-6、IL-23p19、IFNβなどの炎症性サイトカインが阻害されている。しかしながら、炎症を抑制するサイトカインであるIL-10も阻害していることから、実際の感染では、より複雑なことが起きていることが示唆される。

次に、*in vitro*における感染モデルを構築するため、トランスウェルを用いた実験系を行った。実際、腸管の構造は、管腔側と粘膜固有層は単層の上皮細胞で厳密に区切られており、腸管内から体内に異物が侵入するのを最小限に抑えている。つまり、EPECは腸管上皮細胞に付着し、下痢を引き起こすことから、上皮細胞も非常に重要である。実際の腸管を模倣するため、マウス腸管上皮細胞であるCMT93をトランスウェル上部に単層培養し、その下にBMDCを加えて、EPEC野生株とIII型分泌欠損株をCMT93に感染させた。つまり、III型分泌装置が、上皮細胞を介して、間接的に樹状細胞を制御しているかを確認した。その結果、樹状細胞の活性化マーカーであるCD86とMHCIIをIII型分泌装置依存的に抑制していることが明らかとなった。



以上の結果より、腸管病原性大腸菌は、詳しい機構は不明だが、パイエル板によって感染性を増大させていることが示唆された。また、*in vitro*の感染モデルにおいて、III型分泌装置によって直接樹状細胞の免疫応答を制御しているばかりでなく、上皮細胞を介しても樹状細胞などを活性化を抑制できることが明らかとなった。今後、どのようなエフェクターを同定し、解析していく予定である。

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)

[雑誌論文] (計4件)

①Chiba S, Nagai T, Hayashi T, Baba Y, Nagai S, Koyasu S. Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches *in vivo*. *Microbiol Immunol*, 査読有, 2011, vol.55, p 123-129

② Kimura K, Iwatsuki M, Nagai T, Matsumoto A, Takahashi Y, Shiomi K, Omura S, Abe A. A small-molecule inhibitor of the bacterial type III secretion system protects against *in vivo* infection with *Citrobacter rodentium*. *J Antibiot*, 査読有, 2011, vol.64, p197-203

③Kurushima J, Nagai T, Nagamatsu K, Abe A, EspJ effector in enterohemorrhagic *E. coli* translocates into host mitochondria via an atypical mitochondrial targeting signal. *Microbiol Immunol*, 査読有, vol.54, 2010, p371-379

④Kim M, Ogawa M, Fujita Y, Yoshikawa Y, Nagai T, Koyama T, Nagai S, Lange A, Fässler R, Sasakawa C, Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature*, 査読有, vol.459, 2009, p578-582

[学会発表] (計1件)

①永井 武、腸管病原性大腸菌に対する宿主免疫応答の解析、細菌学会関東支部 インターラボセミナー、2010年11月26日 北里大学感染制御科学府 2F 講義室

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 武 (NAGAI TAKESHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60418655

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし