

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02728

研究課題名（和文）腸管病原細菌による宿主生体防御クロストーク抑制機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of bacterial strategies that counteract host defense cross-talk

研究代表者

芦田 浩（Ashida, Hiroshi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10535115

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）：本研究では、腸管病原菌であるEPECおよび赤痢菌感染における宿主生体防御クロストーク発動機構とその制御戦略を明らかにした。EPECのエフェクターFは別のエフェクターによる宿主細胞死necroptosis阻害により誘導されるpyroptosisを標的とし、阻害する。一方、赤痢菌エフェクターOは宿主炎症抑制の代替としてapoptosis誘導を導くが、別のエフェクターOspC1により阻害されることを明らかにした。すなわち、腸管病原菌はエフェクターの時空間的な制御により宿主生体防御クロストークを克服していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸管病原菌感染における生体防御クロストーク発動機構とそれに対する腸管病原菌の感染戦略を解明した。本研究により得られた知見は未だ未解明な点が多い腸管病原菌の感染機構解明に寄与した。また、腸管病原菌による新たな感染戦略を標的とする創薬・ワクチン開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have identified bacterial strategy that counteracts host defense crosstalk. EPEC delivers effector to prevent necroptosis, while it becomes a cue to trigger pyroptosis. To counteract this, EPEC delivers another effector F and prevents pyroptosis. In addition, Shigella effector O downregulates host inflammatory responses, while induces apoptosis. To counteract effector O-triggered apoptosis, Shigella delivers OspC1 effector and prevents apoptosis. In conclusion, we found that enteric bacterial pathogens prevent host defense crosstalk through spatiotemporal regulation by effectors.

研究分野：細菌学

キーワード：腸管病原菌 エフェクター 細胞死 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管病原菌が感染を成立させるためには、宿主により誘導される様々な生体防御反応と対峙する必要がある。生体は病原細菌の感染に対し、PAMPs、DAMPs の認識を介して炎症や細胞死等の生体防御機構を誘導し、感染を阻止する。これに対し、腸管病原菌は III 型分泌装置を通じて複数のエフェクターを宿主細胞内に分泌する。エフェクターは宿主細胞機能をハイジャックすることで生体防御機構を回避・抑制し、感染を拡大させる。

興味深いことに、宿主側も病原細菌エフェクターによる生体防御機構抑制を感知し、別の生体防御機構をバックアップとして発動させる「生体防御クロストーク」を有している。しかし、生体防御クロストークに関する知見は乏しく、それに対抗する腸管病原菌の生存戦略も未解明である。

2. 研究の目的

生体は腸管病原菌の生体防御機構抑制戦略に対して、別の生体防御機構をバックアップとして発動させる「生体防御クロストーク」を有しているにも関わらず、腸管病原菌は感染を成立させる。一方、多くの腸管病原細菌は III 型分泌装置より複数のエフェクターを時空間的に分泌し、その特異的かつ巧妙な働きにより宿主細胞機能を制御する。この事実は、腸管病原菌が宿主による「生体防御クロストーク」をさらに克服する生存戦略を有することを示唆している。

そこで本研究では、赤痢菌、腸管病原性大腸菌 (EPEC) を腸管病原菌のモデルとし、腸管病原菌感染における宿主生体防御クロストーク発動機構とそれに対抗する腸管病原菌の感染戦略を解明する。

3. 研究の方法

本研究では赤痢菌および EPEC を腸管病原菌のモデルとして、腸管病原菌による宿主生体防御クロストーク発動機構を解明するとともに、それに対抗する腸管病原菌の感染戦略を解明した。本研究計画として、(1) EPEC 感染時の細胞死-細胞死クロストーク、(2) 赤痢菌感染における炎症-細胞死クロストーク、を解析した。

(i) 赤痢菌および EPEC が宿主の生体防御機構に対抗する生存戦略を有するかを明らかにするため、各種エフェクター遺伝子欠損赤痢菌株を用いてスクリーニングを行った。具体的には細胞死、炎症誘導に焦点を当て、各種赤痢菌および EPEC エフェクター遺伝子欠損株および野生株を培養細胞に感染させ、その宿主応答を比較することでエフェクタータンパクの関与を確認した。

関与の確認されたエフェクターに関しては、当該エフェクター遺伝子を培養細胞へ導入し、レポーターアッセイ、RNA-seq 解析等を用いることにより、各エフェクタータンパクの作用するシグナル伝達経路を特定した。さらに、病原細菌野生株および各エフェクター遺伝子欠損株を感染させた培養細胞において、各種シグナル伝達経路構成因子の発現や活性の比較により各エフェクタータンパクの作用点を特定した。

(ii) (i) で解明された赤痢菌および EPEC エフェクターによる感染戦略が別の生体防御機構発動に影響するかを上記(i)と同様の方法を用いて網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) EPEC 感染

はじめに HeLa 細胞に各種エフェクター遺伝子欠損株を感染させ、細胞死制御に関与するエフェクターを探索した。この結果、複数のエフェクター遺伝子欠損株感染で細胞死の上昇が確認された。このうち、エフェクター F 遺伝子欠損株に注目し、細胞死の分類を試みたところ、エフェクター F は Caspase-4 依存的な pyroptosis を抑制していることが明らかとなった。興味深いことに、エフェクター F 遺伝子欠損株感染による細胞死の上昇は caspase 阻害剤処理で抑制される一方、necroptosis 阻害剤処理では促進されていた。EPEC は necroptosis を阻害するエフェクター EspL を分泌する。そこで、EspL エフェクター遺伝子とエフェクター F 遺伝子の二重欠損株を作製したところ、エフェクター F 遺伝子欠損株感染で認められた pyroptosis の誘導は消失していた。すなわち、EPEC 感染において、EspL による necroptosis 阻害は別の細胞死 pyroptosis を誘導する引き金となるが、EPEC はエフェクター F を分泌することで pyroptosis

を抑制していることが示唆された。

(2)赤痢菌感染

申請者はこれまでに赤痢菌感染時の OspC1 エフェクターによる Caspase-8 活性化阻害が necroptosis 誘導の引き金になることを報告しているが、Caspase-8 の活性化機構は明らかにされていない (Ashida et al. 2020 EMBO J)。そこで本研究では、感染の時系列を遡り、Caspase-8 活性化を引き起こす因子を同定するとともに、赤痢菌感染における生体防御クロストーク機構の包括的な解明を目的とした。

各種赤痢菌エフェクター遺伝子欠損株を感染させ、Caspase-8 活性を測定するスクリーニングを行った。この結果、野生株感染時に比べ、赤痢菌エフェクター0 欠損株において、Caspase-8 活性が有意に低下していた。エフェクター0 の作用機序を解析したところ、感染初期の炎症抑制と引き換えに、Caspase-8 活性化に伴う apoptosis を誘導することが明らかとなった。すなわち、赤痢菌感染において、エフェクター0 による炎症抑制は Caspase-8 依存的な apoptosis を誘導する生体防御クロストーク発動の引き金となるが、赤痢菌はエフェクターOspC1 を分泌することで apoptosis を抑制する。さらに、OspC1 による Caspase-8 抑制は別の細胞死である necroptosis をバックアップ機構として誘導する引き金となるが、赤痢菌はこれに対し、別の OspD3 エフェクターを分泌し、necroptosis を阻害するといった時空間的な感染戦略を有することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Abass A, Okano T, Boonyaleka K, Kinoshita-Daitoku R, Yamaoka S, Ashida H, Suzuki T.	4. 巻 560
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 Commun.	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.123.	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 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, Nguyen LT, Van KV, Ho DQD, Nakai K, Suzuki T, Yamaoka Y, Hayashi T, Mimuro H.	4. 巻 12
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 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22317-7	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 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 Nature Communications	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 -
1. 著者名 Miyamoto K, Sujino T, Harada Y, Ashida H, Yoshimatsu Y, Yonemoto Y, Nemoto Y, Tomura M, Melhem H, Niess JH, Suzuki T, Suzuki T, Suzuki S, Koda Y, Okamoto R, Mikami Y, Teratani T, Tanaka K, Yoshimura A, Sato T, Kanai T.	4. 巻 42
2. 論文標題 The gut microbiota-induced kynurenic acid recruits GPR35-positive macrophages to promote experimental encephalitis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 113005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.113005	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 Umeda S, Sujino T, Miyamoto K, Yoshimatsu Y, Harada Y, Nshiyama K, Aoto Y, Adachi K, Hayashi N, Amafuji K, Moritoki N, Shibata S, Sasaki N, Mita M, Tanemoto S, Ono K, Mikami Y, Sasabe J, Takabayashi K, Hosoe N, Suzuki T, Sato T, Atarashi K, Teratani T, Ogata H, Nakamoto N, Shiomi D, Ashida H, Kanai T.	4. 巻 16
2. 論文標題 D-amino acids shape the gut microbiota by suppressing Proteobacteria pathobionts.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1011-1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2023.08.002	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 Boonyaleka K, Okano T, Iida T, Leewananthawer A, Sasai M, Yamamoto M, Ashida H, Suzuki T.	4. 巻 e2350455
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum infection activates the noncanonical inflammasome to exacerbate inflammatory response in acute colitis mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eur. J. Immunol	6. 最初と最後の頁 e2350455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.202350455	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 Suzuki T, Boonyaleka K, Okano T, Iida T, Yoshida M, Fukano H, Hoshino Y, Iwakura Y, Ablordey AS, Ashida H	4. 巻 e1011747
2. 論文標題 Inflammasome-triggered IL-18 controls skin inflammation in the progression of Buruli ulcer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens.	6. 最初と最後の頁 e1011747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1011747	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 芦田 浩、鈴木 敏彦
2. 発表標題 腸管病原菌による宿主細胞死制御機構の解明
3. 学会等名 第34回微生物シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芦田 浩、鈴木 敏彦
2. 発表標題 赤痢菌による宿主細胞死制御機構の解明
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芦田 浩、鈴木 敏彦
2. 発表標題 腸管病原菌による宿主細胞死制御機構の解明
3. 学会等名 第34回日本生体防御学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 芦田 浩、鈴木 敏彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「細胞」,54(10)	

1. 著者名 岩澤 茉莉絵、芦田 浩、鈴木 敏彦、笹川 千尋	4. 発行年 2022年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 炎症と免疫	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------