

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07027

研究課題名(和文) ネズミチフス菌のエフェロサイトーシスを利用した生存戦略

研究課題名(英文) Efferocytosis mediates Salmonella endurance during neutrophil-killing activities.

研究代表者

日吉 大貴 (Hiyoshi, Hirotaka)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：00585599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラは一定の条件により重篤な全身感染症を起こす。本菌は、III型分泌装置(T3SS-2)と呼ばれる病原因子により、マクロファージ内にサルモネラ含有液胞を形成し、細胞内で増殖できることが知られている。しかし、その後どのように全身に拡散されるのか不明な点が多い。本研究では、サルモネラはT3SS-2を用いることで、好中球の「エフェロサイトーシス」を誘導し、自身が感染したマクロファージを取り込ませることを見出した。さらに、一緒に取り込まれたマクロファージにより、好中球が産生する活性酸素種の強い殺菌作用を減弱し、好中球内での生存性を上げることににより、侵襲感染を増悪することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主の恒常性に関わるエフェロサイトーシスを悪用した、サルモネラの好中球内における生存戦略は、本菌のみならず他の細胞内寄生菌においても共通な侵襲感染発症機構である可能性を見出している。また感染症関連の国際誌の中でもインパクトの高いCell Host and Microbe誌に掲載されたことから本研究の成果における学術的な意義は高いと考える。現在、薬剤耐性のサルモネラが、アフリカや東・東南アジア諸国で問題となっているが、我々の研究により明らかにされたサルモネラ感染メカニズムを基盤とした、抗生物質だけに頼らない新規治療薬の開発につながる事が今後期待される。

研究成果の概要(英文)：Salmonella can cause severe invasive infections under certain conditions. It has been shown that a virulence factor called type III secretion apparatus (T3SS-2) allows "Salmonella-containing vacuoles (SCVs)" to form and multiply within macrophages. However, their spread throughout the body remains unclear. In this study, we found that Salmonella can induce "efferocytosis" in which neutrophils take up the bacteria with each dead macrophage, through perforation of SCV using T3SS-2. Furthermore, they showed that this mechanism neutralizes the reactive oxygen species produced by neutrophils and enhances the viability of Salmonella within neutrophils, which in turn exacerbates invasive infections. The results were presented at conferences and published in an international journal (Cell Host Microbe 2022).

研究分野：細菌感染症学

キーワード：サルモネラ 好中球 エフェロサイトーシス 侵襲感染 T3SS

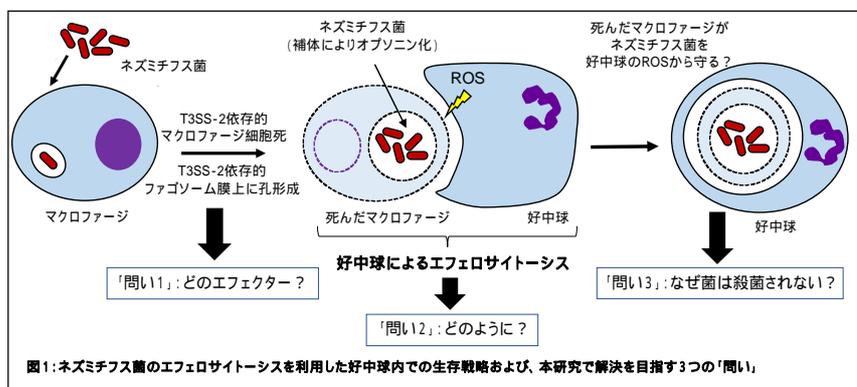
1. 研究開始当初の背景

サルモネラは、汚染された肉や卵、乳製品等の摂食により感染する食中毒起因菌である。本菌に感染したヒトのほとんどが炎症性の腸炎を示す一方、他の感染(マラリアやエイズ等)などにより免疫が低下した患者への二次感染や、5歳以下の子供(特にサブサハラアフリカ地域)は、**重篤な侵襲(全身)感染**に至るケースも少なくない。それによる感染者の死亡率は非常に高く(20%)、世界の推定年間死者数は68万人に及ぶと報告されている(Hiyoshi et al., FEMS Microbiol Rev, 2018)。

これまでに、ネズミチフス菌(マウスを宿主としたサルモネラ属菌)のマウス全身感染モデルを用いて、Salmonella Pathogenicity Island 2 (SPI-2)上にコードされた3型分泌装置(T3SS-2)が侵襲感染に必須であることが明らかにされている。T3SS-2は、菌体内で作られたエフェクターと呼ばれるタンパク質を、宿主細胞質内に直接注入できる病原因子のデリバリーシステムである。T3SS-2の機能欠損(分泌される全てのエフェクターを注入出来ない)により、マクロファージ内における増殖能が著しく低下する(Ochman et al., PNAS, 1996)。しかし、活性酸素種(Reactive Oxygen Species; 以下、ROS)を産生できないgp91phox欠損マウスにおいては、野生株と同程度の病原性であることが示された(Vazquez-Torres et al., Science, 2000)。このような知見から、ネズミチフス菌は、T3SS-2を用いてマクロファージが産生するROSを介した殺菌活性に対抗することにより細胞内で増殖し、そのマクロファージ内での増殖活性が、侵襲感染を引き起こす直接的な原因であると広く考えられてきた。

2. 研究の目的

ところが、in vitroの実験を主とした上記の解析とは反し、その後の詳細なマウス感染モデルの解析においてT3SS-2機能欠損株でも組織中のマクロファージ内で増殖できることが報告された(Grant et al., PLoS Pathog, 2012)。そのため我々は、T3SS-2の全身感染における役割は、より多くROSを産生するマクロファージ以外の貪食細胞(好中球や炎症性単球)への抵抗性に関与しているのではないかと、という仮説を立て解析を始めた。その結果、これまでに以下の(1)~(4)に示すような知見を見出すことで、宿主の「エフェロサイトーシス(死細胞を貪食する作用)」を利用した、ネズミチフス菌の好中球内生存戦略が侵襲感染に関与する可能性を導き出した。本研究では、この見出された仮説をさらに深く解析を進めることで、ネズミチフス菌の侵襲感染発症メカニズムの解明を目指した(図1)。



(1) 好中球枯渇マウスを用いた競争感染より、ネズミチフス菌はT3SS-2で好中球の殺菌活性に対抗している。

(2) T3SS-2依存性のマクロファージ内

のファゴソーム（サルモネラ含有液胞：SCV）膜の孔形成（穴を開ける）と細胞死の誘導、補体による細胞内のネズミチフス菌のオプソニン化がエフェロサイトーシスの引き金になる。

（3）好中球は、ネズミチフス菌の感染したマクロファージをエフェロサイトーシスにより貪食するが、T3SS-2機能欠損株の感染したマクロファージは貪食しない。

（4）エフェロサイトーシスにより好中球に貪食されたネズミチフス菌は、好中球に殺菌されない。

3. 研究の方法

目的の達成のため、本研究申請時に3つの学術的「問い」を設け（**図1**）、その解答を導くために下記の示す実験計画を遂行した。

（1）「問い1」：どのT3SS-2エフェクターが好中球のエフェロサイトーシスを誘導するのか？

T3SS-2 から少なくとも 33 種のエフェクターが分泌される（Jennings et al., Cell Host Microbe, 2017）。エフェロサイトーシスの誘導に T3SS-2 が必要であることは明らかだが、未だ寄与するエフェクターが特定されていない。そのため、それら 33 種の T3SS-2 エフェクター欠損株をマウスマクロファージ株の RAW264.7 細胞に接種し、好中球がどのくらい感染細胞を取り込むのか測定するエフェロサイトーシス誘導活性試験や、サルモネラ含有液胞（SCV）の孔形成による細胞質内への移行活性など、それに関連する生物活性を測定した。

（2）「問い2」：感染マクロファージは、どのようにエフェロサイトーシスで好中球に貪食されるのか？

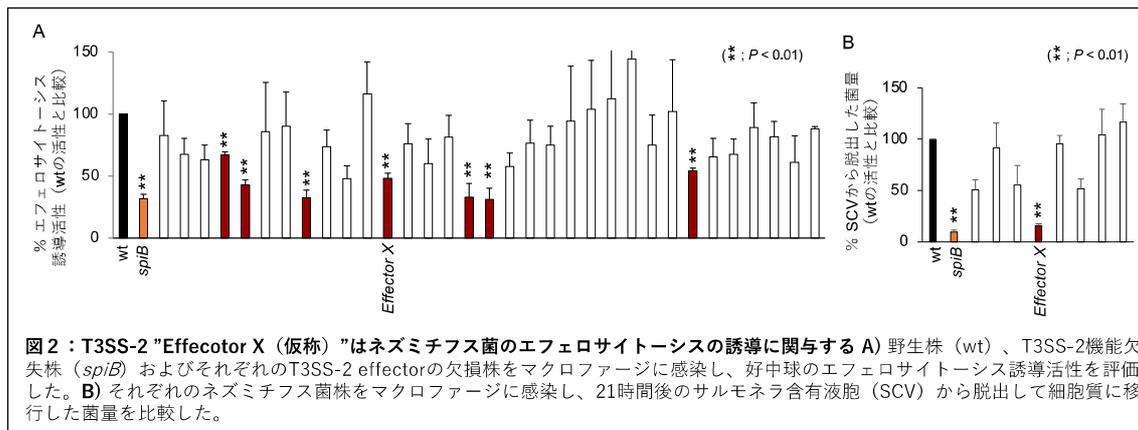
好中球が、エフェロサイトーシスによりネズミチフス菌に感染したマクロファージを貪食している静止画イメージングに成功していたが、動画やタイムラプスイメージングの撮影には至っていない。そこで、GFP を発現したネズミチフス菌の野生株や T3SS-2 機能欠損株を RAW264.7 細胞に感染させ、24 時間後に回収し、PKH26 による膜蛍光染色を行った感染細胞に、マウス骨髄細胞から回収した好中球を加えたタイムラプスイメージングを行うことで、どのように好中球が感染マクロファージをエフェロサイトーシスにより取り込むのか、視覚的にとらえて解析することを試みた。

（3）「問い3」：好中球のエフェロサイトーシスで貪食された菌は、なぜ ROS で殺菌されないのか？

ネズミチフス菌は、通常ファゴサイトーシスで好中球により貪食されると、ROS により即座に殺菌される。しかし、好中球がエフェロサイトーシスにより貪食した際は、ROS 産生は認められるものの、それによりネズミチフス菌が殺菌されることは無い。このことから、死んだマクロファージが ROS から守るシェルターになっていると仮説を立てた（**図1**）。その仮説を説くために、ROS のレポータープラスミド（*PkatG::gfp*）を導入したネズミチフス菌を、骨髄から分離した好中球に接種（ファゴサイトーシス試験）または同様に RAW264.7 細胞に感染し、24 時間後に回収した感染細胞を好中球と共培養し（エフェロサイトーシス試験）、Ly-6G 抗体による好中球のラベルおよび GFP 発現（ROS 暴露）した菌を顕微鏡下で観察した。

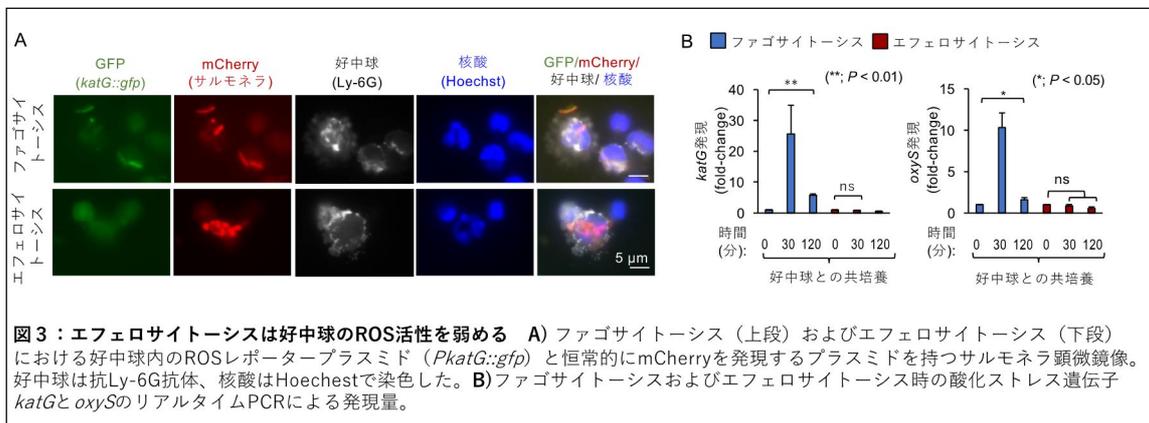
4. 研究成果

申請時における3つの問いの内、2つを本研究課題の期間中に解決することが出来た。「問い1」のエフェロサイトーシスを誘導するエフェクターの特定においては、33種のT3SS-2エフェクターのうち7種類がエフェロサイトーシスの誘導に関わっていることが分かった(図2A)。ま



た、T3SS-2 依存的に SCV 膜に小孔を開けて細胞質内に移行する活性は、結果的にマクロファージの細胞死を誘導し、その後起きる好中球のエフェロサイトーシスを容易にするが、最初のスクリーニングで選ばれた7つのエフェクターの中で、Effector X (仮称) が非常に重要であることが分かった(図2B)。これまで Effector X は、他の活性に関わることが報告されているが、本研究で見出した新たな活性については、今後も解析を続ける予定である。

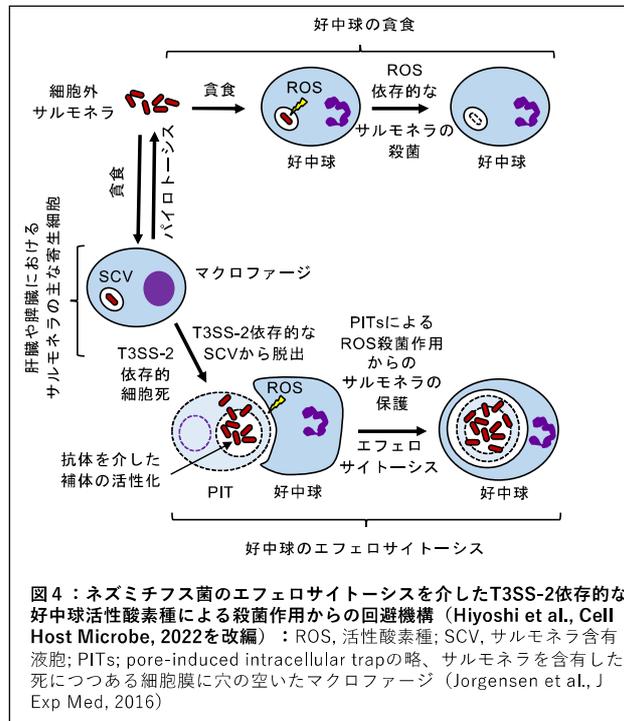
「問い3」では、エフェロサイトーシスにより死んだマクロファージと共に取り込まれた菌が、好中球内で殺菌されない理由を、ROS のレポータープラスミド (*PkatG::gfp*) で評価した。その結果、好中球にファゴサイトーシスされたサルモネラの GFP 発現は見られたが、エフェロサイトーシスにより死んだマクロファージと共に取り込まれたサルモネラにおいては、GFP の発現は認められなかった(図3A)。さらに、酸化ストレス下で発現する *katG* および *oxyS* 遺伝子発現も、その ROS レポータープラスミドの発現パターンに一致していた (図3B)。ROS はランダムな対象への作用により活性が弱まる (Herb et al., Front Cell Dev Biol, 2021)。このことから、恐らくサルモネラと共にエフェロサイトーシスで取り込まれたマクロファージのデブリが、好中球の ROS 活性を希釈 (減弱) している可能性が考えられた。



一方で、「問い2」のタイムラプス観察において、PKH26 による膜蛍光染色は上手くいったが、動きが非常に速い好中球を、限られたコマ数で解析するのが困難であることや、顕微鏡の不調なども重なり進展が遅れ、助成期間中での解決は叶わなかった。しかし今後も、動画撮影に切り替

えるなど改善を行い、好中球によるエフェロサイトーシスの瞬間を撮影したいと考えている。

本研究の成果の一部をまとめ、国際誌の公表に至った(図4, Hiyoshi et al., Cell Host Microbe, 2022)。また本研究によって得られた、まだ公表していない内容においても解析を進め、今後さらなるサルモネラの侵襲感染発症メカニズムの解明を目指している。現在、薬剤耐性のサルモネラが、アフリカや東・東南アジア諸国で問題となっているが、我々の研究で明らかにされていくサルモネラ感染メカニズムを基盤とした、抗生物質だけに頼らない新規治療薬の開発につながることを今後期待される。



<引用文献>

Hiyoshi H, Tiffany CR, Bronner DN, Baumler AJ, Typhoidal Salmonella serovars: ecological opportunity and the evolution of a new pathovar, FEMS Microbiol Rev, 2018.

Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA, Identification of pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells, Proc Natl Acad Sci USA, 1996.

Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC, Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase, Science, 2000.

Grant Aj, Morgan FJ, McKinley TJ, Foster GL, Maskell DJ, Mastroeni P, Attenuated Salmonella Typhimurium lacking the pathogenicity island-2 type 3 secretion system grow to high bacterial numbers inside phagocytes in mice, PLoS Pathog, 2012.

Jennings E, Thurston TLM, Holden DW, Salmonella SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences, Cell Host Microbe, 2017.

Herb M, Gluschko A, Schramm M, Reactive oxygen species: not omnipresent but important in many locations, Front Cell Dev Biol, 2021.

Hiyoshi H, English BC, Diaz-Ochoa VE, Wangdi T, Zhang LF, Sakaguchi M, Haneda T, Tsoilis RM, Baumler AJ, Virulence factors perforate the pathogen-containing vacuole to signal efferocytosis, Cell Host Micro, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhang Lillian F., Lepenies Bernd, Nakamae Sayuri, Young Briana M., Santos Renato L., Raffatellu Manuela, Cobb Brian A., Hiyoshi Hirotaka, Baumberg Andreas J.	4. 巻 13
2. 論文標題 The Vi Capsular Polysaccharide of Salmonella Typhi Promotes Macrophage Phagocytosis by Binding the Human C-Type Lectin DC-SIGN	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.02733-22	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 Liou Megan J., Miller Brittany M., Litvak Yael, Nguyen Henry, Natwick Dean E., Savage Hannah P., Rixon Jordan A., Mahan Scott P., Hiyoshi Hirotaka, Rogers Andrew W.L., Velazquez Eric M., Butler Brian P., Collins Sean R., McSorley Stephen J., Harshey Rasika M., Byndloss Mariana X., Simon Scott I., Baumberg Andreas J.	4. 巻 30
2. 論文標題 Host cells subdivide nutrient niches into discrete biogeographical microhabitats for gut microbes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 836 ~ 847.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chom.2022.04.012	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 Hiyoshi Hirotaka, English Bevin C., Diaz-Ochoa Vladimir E., Wangdi Taming, Zhang Lillian F., Sakaguchi Miako, Haneda Takeshi, Tsolis Ren?e M., Baumberg Andreas J.	4. 巻 30
2. 論文標題 Virulence factors perforate the pathogen-containing vacuole to signal efferocytosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 163 ~ 170.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chom.2021.12.001	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10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Lillian F. Zhang, Andreas J. Baumberg, Hirotaka Hiyoshi
2. 発表標題 The Vi capsular polysaccharide of Salmonella Typhi promotes macrophage phagocytosis by binding the human C-type lectin DC-SIGN
3. 学会等名 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lillian Zhang, 中前早百合, 児五年央, Andreas Baumber, 日吉大貴
2. 発表標題 チフス菌のVi抗原を介した侵襲感染性発揮機構の解析
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lillian F. Zhang, Andreas J. Baumber, Hirotaka Hiyoshi
2. 発表標題 The Vi capsular polysaccharide of Salmonella Typhi promotes macrophage phagocytosis by binding the human C-type lectin DC-SIGN
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirotaka Hiyoshi
2. 発表標題 Virulence factors perforate the pathogen-containing vacuole to generate a find-me signal for efferocytosis
3. 学会等名 U.S. Panel on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lillian F. Zhang, Andreas J. Baumber, 日吉大貴
2. 発表標題 Vi capsular polysaccharide of Salmonella Typhi promotes macrophage phagocytosis by binding DC-SIGN
3. 学会等名 第96回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiyoshi Hirotaka, Tsolis M. Renee, Baumber J. Andreas
2. 発表標題 Virulence factors perforate the pathogen-containing vacuole to generate a find-me signal for efferocytosis
3. 学会等名 The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hoan T Pham, Hirotaka Hiyoshi, Toshio Kodama
2. 発表標題 Functional analysis of Vi capsular polysaccharide on an alternative Salmonella enterica serovar Typhi infection model.
3. 学会等名 The 21st Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirotaka Hiyoshi
2. 発表標題 An alternative S. Typhi mouse infection model.
3. 学会等名 Gordon Research Conference Salmonella Biology and Pathogenesis (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hoan T Pham, Hirotaka Hiyoshi, Toshio Kodama
2. 発表標題 A mouse model of human typhoid fever.
3. 学会等名 第1回AMED SCARDA「ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業」合同シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hirota Hiyoshi
2. 発表標題 Analysis of alternative human typhoid mouse infection model.
3. 学会等名 21st Bay Area Microbial Pathogenesis Symposium (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Intracellular bacteria use sophisticated 'hack' https://health.ucdavis.edu/news/headlines/intracellular-bacteria-use-sophisticated-hack-to-evade-a-hosts-immune-system/2022/02 Intracellular bacteria use sophisticated 'hack' https://www.eurekalert.org/news-releases/942947 Intracellular bacteria use sophisticated 'hack' https://phys.org/news/2022-02-intracellular-bacteria-sophisticated-hack-evade.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
---------	---------