

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成23年度採択分

平成26年5月30日現在

研究課題名（和文） **病原細菌の自然免疫克服戦略の解明と
その応用**
研究課題名（英文） Study of bacterial stratagem to circumvent
host innate immune system and its application
研究代表者
笹川 千尋 (SASAKAWA CHIHIRO)
東京大学・医科学研究所・名誉教授



研究の概要：消化管粘膜には粘膜固有バリアーと自然免疫バリアーが幾重にも構築されている。しかし腸管病原細菌はバリアーを巧みに回避して粘膜へ定着する。本研究は赤痢菌をモデルにして、(1) 病原細菌の自然免疫バリアー回避戦略の包括的な解明、(2) 赤痢菌自然感染モデルマウスの開発、(3) 抗生物質の代替創薬となる赤痢菌エフェクター機能阻害物質の探索を目的にして実施した。

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：バリアー、腸管、自然免疫、赤痢菌、感染モデル

1. 研究開始当初の背景

消化管粘膜バリアーは、粘膜上皮に固有のバリアーと感染に反応して誘導される自然免疫バリアーから成り立っている。粘膜上皮へ侵入する病原体の自然免疫による認識と免疫応答は、感染初期の防御機構として重要であるが、未だ不明な点が多い。消化管粘膜に定着する赤痢菌やピロリ菌をはじめとする粘膜病原菌は、粘膜バリアーを巧みに回避・克服する高度に進化した感染システムを備えていることが明らかになってきた。赤痢菌等のグラム陰性病原菌は、感染と定着を促進し、また同時に感染に反応して誘導される自然免疫を克服するために、III型分泌装置を通じて多様に機能分化したエフェクターを宿主細胞へ分泌して自然免疫を克服するが、その機能の多くは不明であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、赤痢菌をモデルにして、粘膜病原菌の自然免疫バリアーの回避戦略の解明とその応用を目的とする。具体的には、赤痢菌のIII型分泌装置より分泌される機能未知エフェクターの宿主細胞における機能と感染における役割に着目して、それらの標的宿主因子との相互作用の解明を通じて、本菌の基本的な感染戦略を明らかにする。また他の病原菌と比較して、赤痢菌に特異的及び他の菌にも認められる普遍的な感染戦略を、分子、細胞、個体の各レベルで明らかにする。
(2) 本研究ではこれまでの研究成果を基盤に赤痢菌の自然感染動物マウスモデルを確

立すると同時に、赤痢菌に対する宿主感受性獲得の分子機構を解明する。

(3) 病原菌で広く用いられているエフェクター機能を特異的に遮断する化合物のハイスループットスクリーニングを行い、抗生物質の代替創薬を目指す。

3. 研究の方法

(1) 赤痢菌のエフェクター機能とその宿主標的因子を同定し、また両者の相互作用を解明する。具体的には、①エフェクター欠損赤痢菌とその野生株の培養細胞および腸管感染に対する腸管炎症と免疫応答を解析する。②エフェクタータンパク質の生化学的および細胞生物学的解析を行う。③宿主標的因子の細胞生物学的解析を行う。

(2) 赤痢菌自然感染動物モデルの確立では、マウス腸管感染系を確立する。具体的には、オートファジー関連因子、Tecpr1-KOマウス及びその抗生剤処理マウスを用いて、赤痢菌経口感染マウスモデルを確立する。

(3) エフェクター機能を特異的に遮断する化合物のスクリーニングでは、赤痢菌のE3ユビキチンリガーゼ活性を示すエフェクターを標的に、そのE3リガーゼ活性を特異的に阻害する低分子化合物を東大創薬オープンイノベーションセンターとの共同研究で実施する。

4. これまでの成果

(1) 赤痢菌エフェクター機能と標的宿主因子の解明：赤痢菌の高度に進化した自然免疫回避戦略ならびに上皮細胞およびマクロ

ファージにおける新たな自然免疫応答機構を以下に明らかにした。(i)赤痢菌の上皮細胞侵入に反応して、ジアシルグリセロール-CBM 複合体-TRAF6 経路で NF- κ B が活性化され炎症が惹起された。これに対して赤痢菌は OspI エフェクターを分泌し、TRAF6 の活性化に必須な Ubc13 の 100 番目のグルタミン酸を脱アミド化することにより炎症を抑制していることを明らかにした (Nature 2012)。(ii) 赤痢菌をはじめサルモネラや腸管病原性大腸菌が上皮細胞へ感染すると、カスパーゼ 4 依存的な細胞死が誘導されることを見いだした。赤痢菌はこれを回避するため、カスパーゼ 4 に特異的な阻害活性を有する OspC3 エフェクターを分泌して、細胞死を抑制していることを見いだした (Cell Host Microbe 2013)。本研究により、カスパーゼ 4 は腸管系病原細菌に対する自然免疫として極めて重要な役割を果たしていることが示された。またカスパーゼ 4 を標的とする化合物が、新たな腸炎抑制剤となりうることを示唆された。(iii) 赤痢菌やサルモネラをはじめとするグラム陰性病原細菌から E3 ユビキチンリガーゼ活性を有するエフェクターが分泌されている。今回、赤痢菌の細胞侵入に伴い生ずる膜断片を DAMPS として自然免疫が認識して PKC-TRAF2-NF- κ B に依存した炎症を誘導することを見いだした。一方赤痢菌は、TRAF2 を標的として E3 活性を有する IpaH0722 を分泌して、上述の炎症応答を抑制していることを明らかにした (PLoS Pathog 2013)。(2) 赤痢菌自然感染マウスモデルの開発：赤痢菌はヒトと霊長類を自然宿主として腸粘膜へ感染して赤痢を発症する。一方、マウスは赤痢菌に対して抵抗性を示すが、先行研究で作製した Tecpr1-K0 マウス（オートファジー関連因子の欠損）は赤痢菌に対して感受性を示した。これまで Tecpr1 及びその野生株マウスを BALB/c 及び C57BL の各々バックグラウンドで 10 代純化した。その結果、BALB/c 由来 Tecpr1-K0 マウスは、野生型に比べて、赤痢菌に対して優位に感受性が増加するとともに肥満も出現していた。また Tecpr1-K0 マウスの腸内細菌の一部も変化していた。(3) エフェクター機能阻害剤の同定：赤痢菌の E3 リガーゼ活性を示すエフェクターを特異的に阻害する化合物の探索に必要なハイブリッドスクリーニング系を確立した。これを用いて東大創薬イノベーションセンターの化合物ライブラリーより IpaH ファミリーに対して特異的な阻害効果を示す化合物を得た。

5. 今後の計画

(1) 赤痢菌エフェクター機能と標的宿主因子の解明：E3 ユビキチンリガーゼ活性を示すエフェクター機能とその感染に果たす役割

の解明を中心に研究を行う。特に赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導において見出された IpaH エフェクターによるインフラマソーム活性化及び抑制機構の解明を行う。

(2) 赤痢菌自然感染マウスモデルの開発：Tecpr1-K0 マウスのマウス感受性因子について、腸内細菌との関係を明らかにする。また腸内細菌叢の変動と赤痢菌感受性との関係を解明するために、野生型マウスを種々抗生剤で処理して、感受性に対する影響を精査する。(3) エフェクター機能阻害剤の同定：得られた化合物の IpaH ファミリーに対する特異性を調べるために、IpaH ファミリーの代表的なエフェクタータンパク質 2 種類を選び、阻害能をヒト E3 リガーゼと比較する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）
（研究代表者は二重線）（主要なもの）

[論文]

- (1) Ashida H, Kim M, Sasakawa C. Exploitation of the host ubiquitin system by human bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 12, 399-413, 2014
- (2) Ashida H, Nakano H, Sasakawa C. *Shigella* IpaH0722 E3 ubiquitin ligase effector targets TRAF2 to inhibit PKC-NF- κ B activity in invaded epithelial cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003409, 2013
- (3) Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, Mimuro H, Kim M, Ashida H, Akakura R, Yoshida M, Kawalec M, Reichhart JM, Mizushima T, Sasakawa C. The *Shigella* OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection. *Cell Host Microbe.* 13, 570-83, 2013
- (4) Fukumatsu M, Ogawa M, Arakawa S, Suzuki M, Nakayama K, Shimizu S, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. *Shigella* targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells. *Cell Host Microbe.* 11, 325-36, 2012
- (5) Sanada T, Kim M, Mimuro H, Suzuki M, Ogawa M, Oyama A, Ashida H, Kobayashi T, Koyama T, Nagai S, Shibata Y, Gohda J, Inoue J, Mizushima T, Sasakawa C. The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. *Nature.* 483, 623-6, 2012

[受賞]

- ・笹川千尋 平成 24 年 日本細菌学会浅川賞
- ・笹川千尋 平成 24 年 秋の紫綬褒章

ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/saikan/index.html>