

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成28年5月23日現在

機関番号：12601  
研究種目：特別推進研究  
研究期間：2011～2015  
課題番号：23000012  
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  
研究者番号：70114494  
交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：418,500,000円

研究成果の概要（和文）：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。

研究成果の概要（英文）：The intestinal epithelium equips multiple layers of innate defense system and acts as defensive barriers against microbial invaders. Nevertheless, many mucosal pathogenic bacteria can circumvent these defenses and exploit the intestinal epithelium as a replicative niche, a shelter from the host immune surveillance, or a port of entry for dissemination into deeper tissues. In this project, we have concentrated our efforts to (1) Elucidate how *Shigella* modulate host innate immune response and define the bacterial and host targeting factors, (2) Construct mice intestinal infection model of *Shigella*, (3) Isolate small compounds that inhibit *Shigella* effectors.

研究分野：医菌薬学

キーワード：自然免疫、赤痢菌、エフェクター、感染モデル、インフラマソーム

## 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応答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-K0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. 研究成果

(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。①赤痢菌の上皮細胞侵入に誘導して、ジアシルグリセロール-CBM複合体-TRAF6経路でNF- $\kappa$ 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)。②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。③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- $\kappa$ 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)。④赤痢菌は腸粘膜上皮細胞侵入に先立ち、マクロファージ内へ侵入し細胞質で増殖しつつ細胞死を誘導する。本研究ではマクロファージ細胞死に関わるNLRインフラマソームおよび菌側の因子を同定し、それによる細胞死誘導メカニズムを解明した(PLoS Pathogen 2014)。さらに赤痢菌はIpaH7.8エフェクターを分泌してNLRC4及びNLRP3インフラマソームを活性化し、Caspase-1依存的な炎症性細胞死を誘導することを見いだした。興味あることに、IpaH7.8の宿主標的因子としてインフラマソーム抑制因子であるGlomulin(GLMN)(Culin Ring Ligase Inhibitor)を同定した。IpaH7.8は、そのE3ユビキチンリガーゼ活性に依存してGLMNをユビキチン化してプロテアソーム依存的にGLMNを分解した(PNAS 2014)。即ち、赤痢菌は、IpaH7.8を通じてマクロファージのGLMN-NLRインフラマソーム経路を活性化して、マクロファージの破壊(細胞死)

を自ら操作する、高度に進化した戦略を発揮していることが示唆された (Nature Rev Microbiol 2014; Cell Microbiol 2014)。⑤ピロリ菌の胃粘膜への定着におけるマイクロRNAの役割を精査したところ、炎症誘発性のmiR-210のエピジェネティックなサイレンシングがピロリ菌感染時に慢性胃疾患を誘導する機序であることを明らかにした (Nature Commun 2014)。

(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-KO 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-KO 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-KO マウスの腸内細菌の一部も変化していた。さらに Tecpr1-KO マウスの赤痢菌自然感染マウスモデルとしての有効性を発展させるため、野生型マウスでのマウスモデル構築を試みた。腸管免疫における腸内細菌叢の重要性に注目し、野生型マウスへの抗生物質投与により腸内細菌叢を変動させた群では、未処理群に比べて腸管での著しい定着菌数増加および腸管粘膜剥離、炎症応答が確認された。ヤクルト中央研究所との共同研究により、抗生物質処理群のフローラ解析、メタボローム解析を行ったところ、腸内細菌叢および短鎖脂肪酸量の低下が赤痢菌易感染性の原因であることが示唆された。以上の結果より、腸内細菌叢の変動を用いた新たな赤痢菌自然感染マウスモデルが確立された。

(3) エフェクター機能阻害剤の同定：抗生物質の代替創薬を目指して、初めに赤痢菌の 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時間分解蛍光共鳴エネルギー転移検出法 (FRET) により確立した。蛍光タンパク MiCy/mKO 融合ユビキチンを精製し、E1、E2、および E3 リガーゼ活性を有する赤痢菌 IpaH エフェクターを ATP と MgCl<sub>2</sub> 存在下でユビキチン化反応させた。ユビキチン化反応が誘導されると、MiCy と mKO の接近により FRET 誘導が起こる。この FRET 測定によりユビキチン化を数値化することで、E3 リガーゼ活性の阻害剤スクリーニングの評価手段とした (Genes Cells 2016)。このスクリーニング系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ヒット化合物をいくつか得た。得られたヒット化合物を用いて IpaH 活性阻害能 (IC50) を測定し、さらにスクリーニング系

とは異なる評価系を用いて精査し、阻害活性の強い化合物を得た。

#### 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 37 件)

- (1) Ashida H & Sasakawa C. *Shigella* IpaH family effectors as a versatile model for studying pathogenic bacteria. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 5, 100 (2016). 査読有 doi: 10.3389/fcimb.2015.00100
- (2) Otsubo R, Kim M, Lee J, & Sasakawa C. Midori-ishi Cyan/monomeric Kusabira-Orange-based fluorescence resonance energy transfer assay for characterization of various E3 ligases. *Gene Cells.* (2016) 査読有 doi: 10.1111/gtc.12369.
- (3) Ashida H, Mimuro H, & Sasakawa C. *Shigella* manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific roles. *Front Immunol.* 6, 219 (2015). 査読有 doi: 10.3389/fimmu.2015.00219
- (4) Suzuki S, Mimuro H, Kim M, Ogawa M, Ashida H, Toyotome T, Franchi L, Suzuki M, Sanada T, Suzuki T, Tsutsui H, Núñez G, & Sasakawa C. *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, E4254-4263 (2014). 査読有 doi: 10.1073/pnas.1324021111.
- (5) Ashida H, Kim M, & Sasakawa C. Manipulation of the host cell death pathway by *Shigella*. *Cellular Microbiology.* 16, 1757-1766 (2014) 査読有 doi: 10.1111/cmi.12367.
- (6) Ashida H, & Sasakawa C. *Shigella* hacks host immune responses by reprogramming the host epigenome. *EMBO Journal.* 33, 2598-2600 (2014) 査読有 doi: 10.15252/embj.201489934.
- (7) Kiga K, Mimuro H, Suzuki M, Shinozaki-Ushiku A, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Ogawa M, Iwasaki YW, Kayo H, Fukuda-Yuzawa Y, Yashiro M, Fukayama M, Fukao T, & Sasakawa C. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. *Nat Commun.* 5:4497 (2014) 査読有 doi: 10.1038/ncomms5497.
- (8) Ashida H, Kim M, & Sasakawa C. Exploitation of the host ubiquitin system

- by human bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 12, 399-413, (2014) 査読有 doi: 10.1038/nrmicro3259.
- (9) Goto Y, Obata T, Kunisawa J, Sato S, Ivanov II, Lamichhane A, Takeyama N, Kamioka M, Sakamoto M, Matsuki T, Setoyama H, Imaoka A, Uematsu S, Akira S, Domino SE, Kulig P, Becher B, Renauld JC, Sasakawa C, Umesaki Y, Benno Y, Kiyono H. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science.* 345, 1254009 (2014) 査読有 doi: 10.1126/science.1254009.
- (10) Irving AT, Mimuro H, Kufer TA, Lo C, Wheeler R, Turner LJ, Thomas BJ, Malosse C, Gantier MP, Casillas LN, Votta BJ, Bertin J, Boneca IG, Sasakawa C, Philpott DJ, Ferrero RL, Kaparakis-Liaskos M. The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling. *Cell Host Microbe.* 15, 623-35 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.chom.2014.04.001.
- (11) Suzuki S, Franchi L, He Y, Muñoz-Planillo R, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C, Núñez G. *Shigella* type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation independently of Pkc  $\delta$ . *PLoS Pathog.* 10, e1003926 (2014) 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1003926.
- (12) Ashida H, Nakano H, & Sasakawa C. *Shigella* IpaH0722 E3 ubiquitin ligase effector targets TRAF2 to inhibit PKC-NF- $\kappa$ B activity in invaded epithelial cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003409, (2013) 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1003409.
- (13) 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) 査読有 doi: 10.1016/j.chom.2013.04.012.
- (14) 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) 査読有 doi: 10.1016/j.chom.2012.03.001.
- (15) 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) 査読有 doi: 10.1038/nature10894.
- (16) Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, & Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol.* 8, 36-45 (2012) 査読有 doi: 10.1038/nchembio.741.
- (17) Sanada T, Kim M, Mimuro H, Ashida H, Ogawa M, Mizushima T, Sasakawa C. A bacterial effector targets the TRAF6-NF  $\kappa$ B pathway to modulate the acute inflammatory response to bacterial invasion of epithelial cells. *Virulence.* 3, 518-21 (2012) 査読有 doi: 10.4161/viru.21451.
- (18) Fukumatsu M, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Uptake of *Shigella*-containing pseudopodia by neighboring epithelial cells at tricellular junctions via non-canonical clathrin-dependent trafficking pathway. *Virulence.* 3, 515-8 (2012) 査読有 doi: 10.4161/viru.21740.
- (19) Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, & Sasakawa C. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J Cell Biol.* 195, 931-42 (2011) 査読有 doi: 10.1083/jcb.201108081.
- (20) Suzuki M, Kiga K, Kersulyte D, Cok J, Hooper CC, Mimuro H, Sanada T, Suzuki S, Oyama M, Kozuka-Hata H, Kamiya S, Zou QM, Gilman RH, Berg DE, Sasakawa C. Attenuated CagA oncoprotein in *Helicobacter pylori* from Amerindians in Peruvian Amazon. *J Biol Chem.* 286, 29964-72 (2011) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.263715.
- (21) Ogawa M, Sasakawa C. The role of Tecpr1 in selective autophagy as a cargo receptor. *Autophagy.* 7, 1389-91 (2011) 査読有 doi: 10.4161/auto.7.11.17151.
- (22) Ogawa M, Mimuro H, Yoshikawa Y, Ashida H, & Sasakawa C. Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit. *Microbiol Immunol.* 55, 459-71 (2011) 査読有. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00343.x.
- (23) Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, Mimuro H. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem.* 286, 25256-64 (2011). 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.233601.

[学会発表] (計 49 件)

(1) COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES, Suzhou, China, 2015年11月4日, “*Shigella*

deploy multiple systems to modulate host innate immune responses”

(2) Damage-associated molecular patterns & Innate immunity (WRII). Seoul, Korea, 2015年10月1日, “*Shigella*, a prominent DAMPs creator, deploy multiple systems to modulate host innate immune responses”

(3) France-Japan Joint Forum “Frontiers in Innate Immunity, Strasbourg, France, 2013年6月6日-7日, ” Bacteria and gut interplay: Circumvention of intestinal mucosal barriers by *Shigella* “

(4) Doug’s symposium, St.Louis, USA, 2012年12月4日, “A New Paradigm of Bacterial-Gut Interplay Brought Through the Study of *Shigella*”

(5) THE 34th NAITO CONFERENCE on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, Sapporo, Japan, 2012年10月16日-19日, ” *Shigella* circumvention of the gut mucosal barriers”

(6) VTEC2012, Amsterdam, Netherlands, 2012年5月6日-9日, “*Shigella* manipulation of mucosal barriers”

(7) 2011 International Meeting of FKMS, Seoul, Korea, 2012, “New Insights into *Shigella*-gut Epithelial Interaction”

[図書] (計 3 件)

笹川千尋 実験医学増刊 感染・共生・生体防御システム 羊土社 2012年 222 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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  
研究者番号：70114494