

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790423

研究課題名(和文)腸管病原性大腸菌 I I I 型分泌装置による宿主獲得免疫の制御機構と感染における意義

研究課題名(英文) Type III effectors of Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) regulate the host immunity.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、多くの病原性グラム陰性菌が保有するIII型分泌装置(TTSS)が、感染した宿主の免疫系、特に獲得免疫をどのように制御しているのかについて検討を行った。TTSSを保有する菌として、腸管病原性大腸菌(EPEC)とマウスに感染するCitrobacter rodentiumを用いて実験を行った。

今回我々は、マウスによるin vivo、および単離した細胞を用いたin vitroの両環境において、これらの菌が宿主の獲得免疫のうち、TTSSを用いて特にTh2分化を誘導していることを明らかにした。また一部のTh2サイトカインは、病原性を亢進させていることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and Citrobacter rodentium (C. rodentium) cause severe colitis in human and mouse respectively. These bacteria have type III secretion system (TTSS) to regulate the infection. Although it has been reported that some type III effectors regulate innate immune responses, it is still unclear whether TTSS regulates the host adaptive immunity. Here, we focused on the regulation of host adaptive immunity by bacterial TTSS.

As a result, we found that these bacteria induced Th2 differentiation by TTSS in vivo and in vitro. And this Th2 differentiation was induced by inhibition of Th1 cytokines such as IL-12 and IL-27 by TTSS. Furthermore, Th2 cytokines enhanced bacterial infection in vivo. In this study, we revealed that EPEC and C. rodentium regulated host adaptive immunity and Th2 differentiation was induced by TTSS in order to enhance their virulence.

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：腸管病原性大腸菌 III型分泌機構 感染免疫 樹状細胞 T細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、粘膜病原細菌の感染戦略が分子レベルから個体レベルに至るまで、詳細に明らかになってきた。その中で、とくに粘膜病原細菌が保有する III 型分泌機構によって宿主の機能を操作し、感染を成立させていることが明らかになっている。しかしながら、III 型分泌機構が宿主の免疫機構をどのように制御しているかに関しては、未だに不明な点が多い。多くの III 型分泌機構が自然免疫の誘導を阻害していることが知られているが、獲得免疫系をどのように制御しているかについてほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

III 型分泌機構を保有する腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*; EPEC) は、主に腸管の上皮組織に感染し、水溶性の下痢を引き起こすことが知られている。感染の際、III 型分泌機構は必須の病原因子である。そこで、EPEC および同じ病原機構を保有しマウスに感染する *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) を用いて、III 型分泌機構が、どのように宿主の獲得免疫系を制御しているかについて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス感染実験

感染実験には C57BL/6 マウス (雌、6 週齢) を用いて行った。*C. rodentium* の培養液を経口ゾンデを用いて胃内投与した。ただし、III 型分泌機構欠損株を用いた感染実験時には、マウスを麻酔下で開腹し、小腸から直接菌液を投与した。

それぞれの感染期間後、採血および解剖を行い、大腸の病理切片作成、定着菌数の測定などを行った。また、腸間膜リンパ節をすり潰して、*C. rodentium* の死菌とともに培養後、培養上清中の分泌されたサイトカインを ELISA 法により測定した。それにより、感染時における T 細胞の分化バランスを測定した。さらに、得られた血清中の抗 *C. rodentium* 抗体の抗体価を ELISA 法により測定した。

Th2 サイトカインが感染に及ぼす影響を解析するときには、リコンビナントのサイトカインを *C. rodentium* 感染時に、マウスに腹腔内投与して、その影響を調べた。

(2) *in vitro* 感染実験

in vitro の T 細胞分化制御実験には付着性や変異株の関係で EPEC を

用いた。骨髄由来樹状細胞に各種 EPEC を ovalbumin 存在下感染させ、その後 OT-II マウスの脾臓から単離したナイーブ T 細胞と共培養した。4 日後 T 細胞を回収し抗 CD3 抗体により再刺激し、更に 1 日培養した。その培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。

EPEC の III 型エフェクターによるサイトカイン産生抑制について、各種エフェクター欠損株を作成し、樹状細胞に感染させた。サイトカインの発現をリアルタイム PCR および産生を ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

(1) III 型分泌機構による *in vivo* での免疫系の制御機構の解析

実際、III 型分泌機構が宿主の獲得免疫系を制御しているかについて *C. rodentium* の野生株および III 型分泌機構欠損株を用いて解析した。その結果、どちらの菌株でも強い Th1 反応が見られたが、野生型のみ Th2 反応も観察された。(図 1)

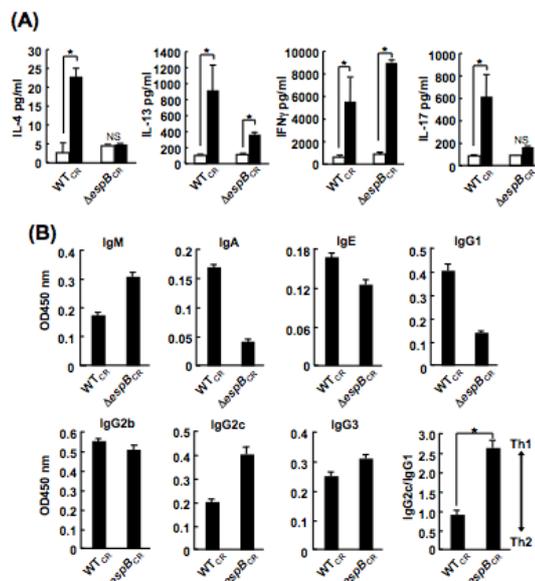


図 1 マウスに *C. rodentium* (野生株 WT, III 型分泌装置欠損株 *espB*) を投与し、3 週間後腸間膜リンパ球を死菌で再刺激した。その後の培養上清中のサイトカインを測定した (A)。血清中の抗 *C. rodentium* 抗体の抗体価を ELISA 法によって測定した (B)。

その結果、*C. rodentium* は III 型分泌機構を用いて Th2 分化を誘導していることが示唆された。次に、野生株による Th2 誘導が菌の感染戦略にとって有利な現象なのかをリコンビナントの Th2 サイトカインを用いて

検討を行った。Th2 サイトカインである IL-4, IL-5 および IL-13 を *C. rodentium* 感染マウスに投与した。その結果、IL-4 と IL-13 を投与したマウスが、コントロールに比べて激しい下痢症状、体重減少および強い炎症を起こした(図2)。つまり、野生株が誘導する Th2 分化誘導は、菌にとって有利に働いていることが明らかになった。

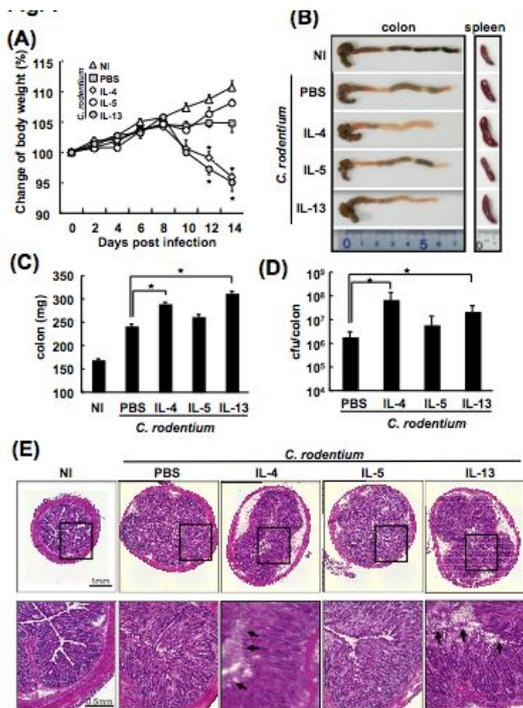


図2 マウスに野生型 *C. rodentium* を投与し、感染時に Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) を一日置きに腹腔投与した。2週間後、解剖し脾臓および大腸を摘出した。その後、定着菌数の測定、大腸の重さ、または病理切片の観察などを行った。

(2) *in vitro* 感染実験による T 細胞分化実験とエフェクターの同定

in vivo で観察された野生株による Th2 誘導の現象を、*in vitro* で再現することを試みた。EPEC、骨髄由来樹状細胞およびナイーブ T 細胞を用いることで、同様の Th2 分化を観察することができた(図3)。

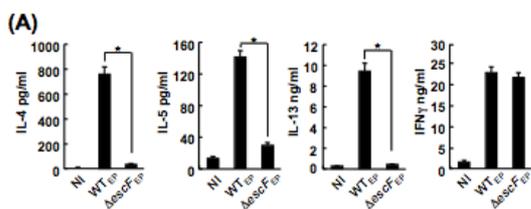


図3 *in vitro* 感染実験。骨髄由来樹状細胞に EPEC (野生株 WT、III 型

分泌装置欠損株 *escF*) を感染させ、その後ナイーブ T 細胞と共培養した。4日後、T細胞を回収後、抗 CD3e 抗体で再刺激し、培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。

そこで、実際どのエフェクター分子が Th2 誘導に関与しているのかを検討するため、各種変異株を作成した。その結果、あるエフェクター X が、*in vitro* 感染実験で Th2 誘導に関与していることが明らかになった。また、このエフェクター X は樹状細胞に対して IL-12 と IL-27 の産生を抑制することで Th2 を誘導していることも明らかにした。さらに、*C. rodentium* においてもエフェクター X が病原性および Th2 誘導に関与していることを確認した。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Takeshi Nagai, Akio Abe, Chihiro Sasakawa, and Shigeo Koyasu "Type III effectors of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) regulate the host immunity." (2013) 第79回インターフェロンサイトカイン学会・第22回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム共催, 2013年5月20日-21日、東京都 都市センタービル

[図書](計 1 件)

永井武、小安重夫 「腸管出血性大腸菌感染症モデル」モデル動物使用マニュアル p211-221 株式会社 エル・アイ・シー 2012年7月30日発行

[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〕

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