

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06382

研究課題名(和文)細胞内侵入した口腔内細菌の排除および疾患の進行におけるIFN-gammaの役割

研究課題名(英文) Role of IFN-gamma in elimination of intracellularly invaded oral bacteria and disease progression.

研究代表者

大嶋 淳 (Ohshima, Jun)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：30755450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、IFN-gamma誘導性GTPaseの一種であるGbpの結合分子を探索し、その機能解析を足掛かりにIFN-gamma誘導性GTPaseの細胞内動態の制御機構の解明を試みることに、さらに細胞内に侵入した口腔細菌とIFN-gammaを介した宿主防御を検討することにより、歯周疾患の進行・遷延化メカニズムを明らかにすることである。結果として、Gbp2と結合してその機能を負に制御する新規分子としてRabGDI-alphaを同定することができた。また、IFN-gammaが細胞内侵入した口腔細菌の排除とそれに続く炎症性サイトカインの産生に關与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the binding molecule of Gbp, a kind of IFN-gamma-inducible GTPase, and to try to elucidate the regulatory mechanism of IFN-gamma-induced GTPases' function. In addition, we aimed to clarify the mechanism of progression and prolongation of periodontal disease by examining the relationship between host defense through IFN-gamma and oral bacteria invading into the host cells. As a result, we were able to identify RabGDI-alpha as a novel molecule that binds to Gbp2 and negatively regulates its function. Also, it was suggested that IFN-gamma is involved in elimination of intracellularly invaded oral bacteria and subsequent production of inflammatory cytokines and that P. gingivalis has an unknown mechanism to negatively control IFN-signaling.

研究分野：歯学

キーワード：微生物学

1. 研究開始当初の背景

口腔内には、う蝕や歯周病の原因となる病原性細菌を含め 700 種類にもものぼる多様な微生物が生息し、複雑なマイクロフローラを形成しています。また近年では、これまで細胞外でのみ増殖すると考えられていた *Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* といった一部の歯周病原性細菌が細胞内に侵入することで宿主の免疫系を回避し、病態を進行・遷延化させている可能性が示唆され、その細胞内における動態の解明が急務となってきました。

一方、細胞内に侵入した病原体に対する宿主側の感染防御には、インターフェロン - ガンマ (IFN-gamma) によって誘導される免疫機構がきわめて重要であることが知られています。IFN-gamma は T 細胞やナチュラルキラー細胞などの免疫細胞から主に分泌される炎症性サイトカインであり、さまざまな細胞に作用して約 2,000 種類にもおよぶエフェクター分子群の遺伝子発現を誘導します。IFN-gamma 自体は病原体を直接破壊するような構造を持っていないので、これらの誘導された分子群が病原体排除機能に関わっているものと考えられています。しかし、それら分子群のうち現在までに細胞内病原体の排除への関与が示されているものはごく一部であり、IFN-gamma 誘導性の感染防御機構はいまだ解明されていません。

IFN-gamma によって誘導される分子の中でも特に、IFN-gamma 誘導性 GTPase は細胞内の病原体含有空胞 (Pathogen containing vacuole : PCV) に集積し、膜構造を破壊することによって病原体を排除することが知られています。さらに近年では、マクロファージにおけるグラム陰性細菌の PCV の破壊がインフラマソームを活性化し、さら

なる炎症反応を促進する可能性も示されています。このように IFN-gamma 誘導性 GTPase は、膜破壊を伴う病原体の排除とその後の炎症応答に重要な働きをもつことが明らかになっているものの、その細胞内動態を制御する機構は不明のままです。

2. 研究の目的

本研究では、IFN-gamma 誘導性 GTPase の一種である Gbp の結合分子を同定し、その機能解析を足掛かりに IFN-gamma 誘導性 GTPase の細胞内動態の制御機構の解明を試みました。さらに、細胞内に侵入した口腔細菌と IFN-gamma を介した宿主防御を多角的に検討し、根尖性および辺縁性歯周疾患の進行・遷延化メカニズムの一端を明らかにすることを目指しました。

3. 研究の方法

(1) IFN-gamma 誘導性 GTPase 群の機能を制御する分子の同定

まず、Gbp に対する大規模免疫沈降および質量分析の結果から、Gbp2 に結合する候補分子として RabGDI-alpha を同定しました。次に、RabGDI-alpha を好中球やマクロファージといったミエロイド系細胞で特異的に欠損するマウスを作製し、代表的な細胞内寄生性病原体として *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) を腹腔内投与によって感染させ、マウス内での *T. gondii* の感染拡大をルシフェラーゼ活性による発光を指標に生体イメージング装置を用いて検討しました。

(2) RabGDI-alpha 欠損の IFN-gamma 誘導性 GTPase 群の細胞内動態への影響に対する検討

IFN-gamma による細胞内寄生性病原体の排除機構において、IRG・GBP といった IFN-gamma 誘導性 GTPase 群の病原体周囲への集積と、それに伴う寄生胞膜の破壊する

ことが重要であることが知られています。そこで、RabGDI-alpha の欠損が、IRG あるいは GBP の病原体への集積に影響を及ぼしているかどうかを蛍光免疫染色で検討しました。

(3) IFN-gamma 依存的な病原体排除における Gbp2 の機能解析

RabGDI-alpha が Gbp2 と相互作用することで IFN-gamma 依存的な細胞内寄生性病原体排除を抑制していることが示されたので、Gbp2 の病原体排除における機能についてさらなる詳細な検討を加えました。まず、病原体感染時の Gbp2 と Irga6 の細胞内局在について検討しました。IFN-gamma 刺激したのち *T. gondii* を感染させた細胞において、*in situ* PLA キット®を用いて Gbp2 と Irga6 の細胞内での局在を評価しました。次に、CRISPR/Cas9 を用いて Gbp2 欠損細胞を作製し、野生型細胞と Gbp2 欠損細胞をそれぞれ IFN-gamma で刺激したのち、ルシフェラーゼ発現 *T. gondii* を感染させて 36 時間後の *T. gondii* の存在量をルシフェラーゼアッセイにより定量化しました。

(4) RabGDI-alpha の非標準的インフラマソームへの関連性の検討

近年、マクロファージにおける IFN-gamma 誘導性 GTPase 群によるグラム陰性細菌の寄生胞の破壊が、非標準的インフラマソームを活性化している可能性が示されています。そこで次に、非標準的インフラマソームの活性化における Gbp2 の作用に対する RabGDI-alpha の関与について検討しました。野生型および RabGDI-alpha 欠損マクロファージに *Salmonella enterica* serovar Typhimurium や *Citrobacter koseri* を感染させ、培養上清中の IL-1-beta と IL-1-alpha の濃度については ELISA によって、細胞死の程度については乳酸デヒドロゲナーゼの放出量によって評価しました。

(5) 細胞内に侵入した歯周病原細菌に対する IFN-gamma 依存的な病原体排除能の評価

歯周病原細菌に対する IFN-gamma 依存的な病原体排除の有無を評価するために、*P. gingivalis* または *F. nucleatum* を感染させたマクロファージを滅菌蒸留水で溶解したのち血液寒天培地に播種し、嫌気条件下で培養した際のコロニー形成単位を計測しました。また、それに引き続いて起こるインフラマソームへの関連性についても評価するため、各細菌に感染したマクロファージの培養上清中に含まれる炎症性サイトカイン (IL-1-alpha、IL-1-beta) の濃度を ELISA によって測定しました。

(6) *P. gingivalis* 感染による宿主遺伝子発現パターンの変化についての検討

P. gingivalis 感染がヒト口腔粘膜上皮細胞の遺伝子発現にもたらす影響を評価するために、RNA シーケンス解析を行いました。

4. 研究成果

RabGDI-alpha を欠損するマウスでは野生型マウスと比べて *T. gondii* の腹腔内での拡がり有意に抑えられており、生存率の測定結果においても RabGDI-alpha コンディショナルノックアウトマウスは *T. gondii* 感染に対してより高い抵抗性を示しました。このことから、RabGDI-alpha は IFN-gamma 依存性の病原体排除機構に対して抑制的に機能することが示唆されました。さらに、蛍光免疫染色の結果から、RabGDI-alpha の欠損が Irga6 および Gbp2 の病原体周囲への集積を有意に増加させることを見出しました。また、PLA アッセイの結果より Gbp2 と Irga6 が病原体周囲のきわめて近接した位置に局在し相互作用していることが明らかとなり、野生型と比べて Gbp2 欠損細胞では IFN-gamma によ

る病原体排除能が有意に低下していることもわかりました。以上の結果より、Gbp2がIFN-gamma 依存的な病原体排除に重要な役割を示し、Gbp2 と Irga6 は病原体周囲に集積し協調して機能していることが示唆されました。

細菌感染した RabGDI-alpha 欠損マクロファージの培養上清における IL-1-alpha と IL-1-beta の濃度は、野生型細胞におけるものより有意に上昇しており、RabGDI-alpha 欠損マクロファージの細胞死も野生型細胞に比べて有意に増大していました。対照的に、大腸菌 LPS を細胞質に直接導入した場合には、IL-1-beta の産生および細胞死の程度は野生型と RabGDI-alpha 欠損細胞との間で有意な差は認めませんでした。これらの結果から、RabGDI-alpha は、*T. gondii* だけでなく、*S. Typhimurium* や *C. koseri* といった寄生胞形成グラム陰性細菌に対する Gbp2 依存的細胞免疫応答を阻害し、非標準的インフラマソームによって引き起こされる過度の炎症を抑制するために重要である可能性が示されました。

歯周病原性細菌を感染させたマクロファージを用いた CFU アッセイの結果から、IFN-gamma 刺激が口腔内細菌の細胞内での生存を抑制することがわかりました。また、各細菌に感染したマクロファージの培養上清中の炎症性サイトカイン濃度は、GBP 欠損細胞で有意に低下していました。さらに *P. gingivalis* 感染の有無によるヒト口腔粘膜上皮細胞の遺伝子発現の違いを RNA シーケンス解析したところ、*P. gingivalis* 感染細胞では STAT1、IRF7、GBP1 といった IFN 誘導性遺伝子の発現が有意に抑制されていました。これらの結果から、IFN-gamma が細胞内侵入した口腔細菌の排除とそれに続く炎症性サイトカインの産生に関与していること、そして *P.*

gingivalis は IFN シグナルを負に制御する未知のメカニズムを有していることが示唆されました。

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3件)

Lee Y, Sasai M, Ma JS, Sakaguchi N, Ohshima J, Bando H, Saitoh T, Akira S, Yamamoto M. p62 Plays a Specific Role in Interferon- γ -Induced Presentation of a Toxoplasma Vacuolar Antigen. Cell Rep , 査読有, Vol.13, No.2, 2015, pp.223-233, DOI: 10.1016/j.celrep.2015.09.005

Ito D, Nojima S, Nishide M, Okuno T, Takamatsu H, Kang S, Kimura T, Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y, Hosokawa T, Toyofuku T, Ohshima J, Kamimura D, Yamamoto M, Murakami M, Morii E, Rakugi H, Isaka Y, Kumanogoh A. mTOR Complex Signaling through the SEMA4A-Plexin B2 Axis Is Required for Optimal Activation and Differentiation of CD8⁺ T Cells. Journal of Immunology, 査読有, Vol.195 No.3, pp.934-943, DOI: 10.4049/jimmunol.1403038

Ohshima J, Sasai M, Liu J, Yamashita K, Ma JS, Lee Y, Bando H, Howard JC, Ebisu S, Hayashi M, Takeda K, Standley DM, Frickel EM, Yamamoto M. RabGDI is a negative regulator of interferon- γ -inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity to Toxoplasma gondii. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 査読有, Vol.112, No.33, pp.E4581-4590, DOI: 10.1073/pnas.1510031112

[学会発表](計4件)

Lee Y, Sasai M, Ma JS, Sakaguchi N, Ohshima J, Bando H, Saitoh T, Akira S, Yamamoto M. p62 plays a specific role in IFN-g-induced presentation of a Toxoplasma vacuolar antigen. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月19日, 札幌.

Sasai M, Ohshima J, Ma JS, Lee Y, Takeda K, Yamamoto M. RabGDI is a negative regulator of interferon- γ -inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity to Toxoplasma gondii. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月19日. 札幌.

Lee Y, Sasai M, Ma JS, Sakaguchi N, Ohshima J, Bando H, Saitoh T, Akira S, Yamamoto M. p62 plays a specific role in IFN-g-induced presentation of a Toxoplasma vacuolar antigen. Forum Cheju17, 2015年11月13日. 大阪吹田.

Ma JS, Sasai M, Ohshima J, Lee Y, Bando H, Takeda K, and Yamamoto M. Selective and strain-specific NFAT4 activation by the Toxoplasma gondii polymorphic dense granule protein GRA6. Forum Cheju17, 2015年11月13日. 大阪吹田.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 淳 (OHSHIMA, Jun)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30755450

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし