

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07083

研究課題名(和文) 炎症抑制エフェクター欠損株を利用した細菌感染病態の解析

研究課題名(英文) S.flexneri effector Ospl controls the accumulation of gamma-delta T cells to prevent epithelial cell death

研究代表者

眞田 貴人 (Sanada, Takahito)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：00569957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、上皮細胞の宿主免疫応答を抑制するospIに着目し、宿主免疫担当細胞による赤痢菌排除機構回避におけるospIの役割に関して、生理的な意義を明らかにすることを試みた。上皮細胞内の宿主免疫応答を抑制できないospI欠損株を用いて、モルモットとマウスの赤痢菌感染動物モデル実験を行なった。その結果、ospIは、個体レベルにおいても炎症抑制性のエフェクターとして機能することを示した。さらに、上皮細胞でのFas発現量を抑制し T細胞による上皮細胞の細胞死を抑えることにより、赤痢菌の定着増殖に寄与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の通常の病原細菌感染実験では見落としていた 新たな炎症像解析を、抑制性エフェクター欠損株と野生株の感染による個体レベルでの比較解析 によって明らかにできる点が独創的である。実験動物の視点からは、複数のげっ歯類感染モデル の実績がある赤痢菌を用いることで、動物モデル間での病原体感染時宿主応答の比較も可能となる点が特色である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the physiological roles of Ospl in vivo, we performed animal infection model to discern the physiological role of Ospl. As expected from our previous study, Guenia pig and mice infected with ospI exhibited increased production of proinflammatory cytokines and chemokine, thereby demonstrating the negative regulatory role of Ospl in vivo. In addition, the analysis of mice infected with ospI led us to identify previously unknown function of Ospl as negative regulator of T cell-mediated epithelial cell death. We found that T cells exhibited a cytotoxic activity against epithelial cells infected with Shigella though Fas/FasL pathway, which could be avoided by Ospl. Furthermore, Ospl downregulated Fas induction in epithelial cells after Shigella infection. Together, the results of our study provide the first evidence supporting the negative regulatory role of Ospl in host immune response.

研究分野：微生物学

キーワード：赤痢菌 炎症 病原細菌 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原細菌が感染すると、宿主は菌体排除を目的として宿主免疫応答を誘導し、炎症を惹起する。病原細菌は宿主に炎症を起こすことが感染の本質であると理解されていたが、近年の研究から、宿主免疫応答を抑制調節することで自己の定着、増殖を可能にし、感染を成立させることが明らかになってきた。すなわち、その宿主と野生型病原細菌の攻防の結果である「病態として認められる炎症」の解析だけでは、病原細菌が誘導するポテンシャルのある炎症の全体像は理解できない。本研究では、赤痢菌をモデルとして、宿主免疫応答抑制タンパク質欠損株と野生型病原細菌が誘導する炎症像を個体レベルで比較解析して、従来の野生型病原細菌感染モデルではマスクされていた「病原細菌が抑制する炎症」を調べるためのモデル確立と解析を目的とする。

2. 研究の目的

赤痢菌感染動物モデルとしてすでに確立され頻用されているモルモット感染系に加えて、遺伝背景が明確であり、解析のための抗体等のツールが充実しているマウスを用いるマウス赤痢菌盲腸感染モデルも並行して確立し、適用する。さらに、マウス腸管結紮パリエル板感染モデルを導入し、経口的に感染した赤痢菌の初期感染臓器であるパリエル板周辺の上皮細胞層を精査することで、感染における宿主応答を個体レベルのみではなく、臓器、細胞、およびサイトカイン等の分子レベルでも解析する。その結果から、病原細菌が誘導するポテンシャルのある炎症の総体を考察する。モルモット直腸感染モデルの予備検討の結果、野生型株と比較して、*ospI* 欠損株の直腸組織内生菌数は、24 時間後に約 1/100 に減少しており (図 2)、*OspI* は赤痢菌の宿主への定着に重要な炎症抑制エフェクターであると考えられた。さらにマウス赤痢菌盲腸感染モデルの予備的検討において、蛍光免疫染色法によって、赤痢菌感染組織への免疫細胞の集積を調べたところ、*ospI* 欠損赤痢菌を感染させた場合、野生型赤痢菌と比べて γ/δ T 細胞の感染部位への集積が、いち早く認められた (Data not shown)。しかし、赤痢菌の排除に直接的に寄与する細胞として報告されている好中球の集積は、野生型と同程度であることから (Data not shown)、好中球以外の赤痢菌排除システムの存在も想定された。以上のことから、炎症抑制エフェクター欠損赤痢菌を用いた宿主免疫応答の性質の詳細な検討によって、従来の野生型感染モデルでは検出しづらい、病原細菌が抑制する炎症とその役割を明らかにして、病原細菌が誘導するポテンシャルのある炎症の総体を理解することを発意した。

3. 研究の方法

赤痢菌の感染モデル (マウス盲腸感染モデル、モルモット直腸感染モデル、マウスパリエル板感染モデル) を用いて、炎症抑制エフェクター欠損赤痢菌が感染した場合の宿主免疫応答を調べるために、次の 3 点について検証する。

- 1) 赤痢菌が *OspI* によって抑制している炎症サイトカイン、ケモカイン群を特定する。
- 2) 赤痢菌が *OspI* によって抑制している免疫担当細胞を特定する。
- 3) *OspI* による免疫担当細胞の抑制機序を明らかにする。

4 . 研究成果

本研究で我々は、上皮細胞の宿主免疫応答を抑制する *ospI* に着目し、宿主免疫担当細胞による赤痢菌排除機構回避における *ospI* の役割に関して、生理的な意義を明らかにすることを試みた。上皮細胞内の宿主免疫応答を抑制できない *ospI* 欠損株を用いて、モルモットとマウスの赤痢菌感染動物モデル実験を行なった。その結果、*ospI* が、個体レベルにおいても炎症抑制性のエフェクターとして機能すること、上皮細胞での Fas 発現量を抑制し T 細胞による上皮細胞の細胞死を抑えることにより、赤痢菌の定着増殖に寄与していることを示した。盲腸上皮細胞の剥離が進んでいない赤痢菌投与後 4 時間と 16 時間にて、盲腸組織内生菌数を測定し、野生型と *ospI* 欠損株を比較した。その結果、投与後 16 時間後の *ospI* 欠損株の生菌数は、野生型と比べて顕著に減少した。モルモット同様に、感染部位で上皮層の破壊と好中球、単球系細胞の集積が認められる。モルモット赤痢菌感染モデルにおいても、赤痢菌感染盲腸組織における Fas、FasL の mRNA 発現量上昇が認められ、*ospI* 欠損株感染盲腸組織における FasL の mRNA 発現量上昇は、野生型感染と比較して高値を示しており、赤痢菌動物感染モデルにおいても Fas-FasL による細胞死は、*ospI* 欠損株感染組織で増強していることが予想された。次に、Fas ブロック抗体を用いて FasL-Fas 経路を阻害した場合の効果を調べた。陽性細胞による *ospI* 欠損株の細胞内菌数の減少は野生型と同程度まで回復した。以上の結果から、*ospI* は、赤痢菌が感染した上皮細胞で生じる NF- κ B 活性化を抑制することで、上皮細胞由来のサイトカイン、ケモカインの発現を抑えることで、陽性細胞の集積を抑える一方で上皮細胞の Fas 発現を抑えて、上皮細胞の細胞死を抑制することで、赤痢菌の増殖定着に寄与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----