

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08241

研究課題名(和文) 微生物接着シグナルによる粘膜免疫誘導機構の解明と粘膜アジュバント開発への応用

研究課題名(英文) Elucidation of mucosal immunity induction mechanism by microbial adhesion signal and application to mucosal adjuvant development

研究代表者

杉山 剛志 (Sugiyama, Tsuyoshi)

岐阜医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：70268001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌やシトロバクター・ローデンティウムはIII型分泌機構と呼ばれる仕組みによって感染宿主に菌体由来のタンパク質を打ち込み、宿主細胞に様々な影響を及ぼす。これらの菌はIII型分泌機構のエフェクター、Tirを接着の受容体として結合し、アクチン重合を誘導することによって宿主細胞に強固に接着する。この接着の際に起こる細胞内のアクチン重合が及ぼす影響についてin vitroとin vivoの両面から検討した。in vitroの結果からアクチン重合の有無によって種々の遺伝子発現に違いが生じることが、in vivoの結果からアクチン重合が粘膜免疫誘導に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜は様々な感染症の病原体の侵入門戸となるため、粘膜免疫が誘導されることは病原体の侵入を阻止する感染防御に最も有効な免疫を付与するものと考えられる。本研究では粘膜免疫を誘導する細菌が細胞に接着し、アクチン重合を誘導することに着目し、アクチン重合が粘膜上皮細胞の遺伝子発現に変化を与え、粘膜免疫誘導になんらかの影響を及ぼすことを示唆する結果を得た。このアクチン重合の働きをさらに解明し応用することによって、感染防御に有効な粘膜免疫を誘導するワクチンの開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Enterohemorrhagic Escherichia coli and Citrobacter rodentium inject proteins derived from the bacterium into the infected host by a mechanism called type III secretion system, then, exert various effects on the host cell. These bacteria bind Tir, which is an effector of the type III secretion system, as a receptor for adhesion, and firmly adhere to host cells with induction of actin polymerization. The effect of intracellular actin polymerization during this adhesion was examined both in vitro and in vivo. The in vitro results suggest that the differential expression of various genes depending on the presence or absence of actin polymerization, and the in vivo results suggest that actin polymerization influences mucosal immunity induction.

研究分野：微生物学

キーワード：腸管出血性大腸菌 シトロバクター・ローデンティウム III型分泌機構 アクチン重合 RhoGEF

1. 研究開始当初の背景

粘膜面は多くの感染性微生物の侵入門戸であり、粘膜免疫はその第一線で感染防御を行う重要な免疫系である。粘膜免疫において分泌型 IgA は微生物が宿主へ侵入する前に微生物の持つ感染に必要な機能分子をブロックできることから、免疫系において最も有効な感染防御機能分子として古くから認識されている。しかし、血中抗体の産生を誘導するのと同じように分泌型 IgA を誘導するのは容易ではない。Toll 様受容体 (TLR) は自然免疫受容体の中心的存在であり、その機能は単に自然免疫系を活性化するのみではなく適応免疫系にも影響を及ぼし、TLR リガンドはアジュバント作用を有することが明らかになってきている。しかし粘膜免疫誘導においては単に TLR シグナルだけでなく、何らかの他のメカニズムによる刺激が必要と考えられる。

我々の過去の研究で、抗菌薬処理したマウスに腸管出血性大腸菌 (EHEC) を持続感染させる実験系を確立し、EHEC 野生株を感染させると EHEC 特異的な IgA 産生が誘導されるが、III 型分泌装置に關与する遺伝子を破壊した変異株を感染させても IgA 産生は誘導されないことを明らかにした。近年、IgA 産生と Th17 細胞の誘導との関連を指摘する報告が多数なされている。我々は EHEC および *Citrobacter* を含む腸管上皮細胞にアクチン重合を引き起こすような、上皮細胞へ密接な結合をする微生物は、Th17 細胞を誘導するという知見を得、報告した。このアクチン重合が粘膜免疫誘導に必要な何らかのシグナルに關与することが示唆されるが詳細は明らかではない。EHEC 接着に伴うアクチン重合は、N-WASP-Arp2/3 の活性化により起こることがわかっている。N-WASP は通常、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rho GTPase) の一種である Cdc42 により活性化される。しかし、EHEC は細菌由来のエフェクター分子 TccP によりアクチン重合を誘導し A/E 病変を形成する。このように、細菌の腸管上皮細胞への接着に伴うアクチン重合は巧妙な仕組みによりコントロールされており、この作用を模倣することにより病原性とは無関係に抗原特異的 IgA 産生や Th17 細胞等の粘膜免疫を誘導できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では EHEC と同様の機構で接着する *Citrobacter rodentium* (CR) の translocated Intimin receptor (Tir) の C 末端領域を欠失する変異株を作成し、EHEC や CR 感染時の特異的 IgA 産生誘導に対する菌体の上皮細胞への接着およびアクチン重合の意義を明らかにすることを目的とした。in vivo において菌体特異的 IgA 産生誘導能にどのような影響を与えるか解析するとともに、in vitro の培養細胞への感染実験において接着による遺伝子発現がどのように変化するか、特に IgA 産生誘導に關与すると考えられる遺伝子を中心に明らかにする。また、感染においては微生物關連分子パターンによってパターン認識受容体の活性化が起こるが、EHEC や CR の接着においても接着シグナルのみならず、同時に TLR 等のシグナルが活性化すると考えられる。そこで、アクチン重合を誘導する Rho 特異的グアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF) を用いて、TLR シグナル活性化とアクチン重合同時に引き起こすことによって、EHEC や CR の接着時の刺激を模倣し、遺伝子発現パターンを解析する。これらを総合して自然免疫シグナル、細菌の接着およびアクチン重合が粘膜免疫誘導に及ぼす影響の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) CR のマウス大腸上皮細胞株 CMT-93 細胞への in vitro 感染実験系を用いて、CR 接着時にマウス腸管上皮細胞株がどのようなタンパク質を発現するか、LC-TOF/MS によるペプチドマッピングを用いて網羅的な解析を行った。

(2) CR の Tir 欠損菌株を、クローン化した Tir またはその変異体を細胞内で発現させた腸管上皮細胞株に感染・接着させることで、アクチン重合を起こす場合と起こさない場合の感染状態を in vitro で再現し、宿主細胞の RNA を抽出して qRT-PCR 法によって種々の遺伝子発現を検討した。

(3) in vivo での腸管上皮細胞に接着およびアクチン重合の意義を検討するため、CR のゲノム上の遺伝子を改変して、III 型分泌機構によって上皮細胞に注入される Tir のアクチン重合の誘導に必要な C 末端側を欠失した変異株 (NM 株) および接着に必要な細胞外ドメインから C 末端までを欠失した変異株 (N 株) を作製し、CMT-93 細胞に in vitro で両株および CR 野生型を感染させ、菌体を DNA に結合する蛍光試薬で、Tir を蛍光抗体で、重合したアクチンを蛍光標識したファロイジンで染色して観察し、接着およびアクチン重合の有無を共焦点レーザー蛍光顕微鏡等を用いて確認した。

(4) In vivo における微生物接着シグナルを解析するために CR 変異株を用いて感染実験を行った。接着しない変異株を定着させるため、変異導入のマーカーとして同時に導入したカナマイシン耐性遺伝子を利用して、マウスにカナマイシンを自由飲水投与した状態で感染させた。さら

に、複数の抗菌薬を前投与して腸内細菌を減少させた後にカナマイシンを自由飲水投与したマウスに感染させた。これらのマウスの感染後 4 週間までの血中および糞便中の抗体価を測定した。

(5) 微生物接着シグナルによって引き起こされるアクチン凝集に関連するシグナル伝達の解析として、Rho GTPase の活性型を腸管上皮細胞株で発現させ、種々の転写因子の活性化について検討した。また、Rac1 および Cdc42 を活性化する RhoGEF である KIAA0599 の TLR シグナルへの影響を検討した。また、その他のアクチン重合を誘導する RhoGEF として KIAA0362 について TLR シグナルへの影響を検討した。

4. 研究成果

(1) CR を CMT-93 細胞への *in vitro* で感染させ、LC-TOF/MS によるペプチドマッピングを行ったところ、細胞質タンパク質として約 500 種類、細胞培養上清中のタンパク質として約 300 種類のタンパク質が検出され、感染した細菌の産生する III 型分泌機構のエフェクタータンパク質も検出された。しかし、報告されているようなサイトカイン、ケモカインや IgA 産生誘導に関与するようなタンパク質は検出されなかったことから、さらに検出率を上げるために試料採取の時間の検討や試料の分画等が必要と考えられた。

(2) CMT-93 細胞に Tir 全長または C 末端側のアクチン重合に必須のドメインを欠損した Tir を発現させ、Tir 欠損変異株を感染させたところ、CXCL1 等、アクチン重合を誘導する接着に比べ誘導しない接着の場合にむしろ発現が高いもの、TGF- β 等、感染時全てで発現が高いもの、MIP-1 等、アクチン重合を誘導する接着の場合に発現が高いものなどがみられた。

(3) CMT-93 細胞に *in vitro* で CR 野生型および MN 株、N 株を感染させ、接着およびアクチン重合の有無を共焦点レーザー蛍光顕微鏡等を用いて確認したところ、野生型では CMT-93 細胞への接着と、その菌体に隣接する Tir およびアクチン重合が観察された。一方、MN 株は接着菌量がやや少ないものの、上皮細胞への接着と菌体に隣接する Tir が観察されたが、アクチン重合は観察されなかった。N 株については接着自体が確認されなかった。

(4) マウスにカナマイシンを自由飲水投与した状態で CR 野生型および変異株を感染させたところ、野生型は定着したが、変異株の定着菌数は十分ではなかった。このとき、野生型感染マウスの血中および糞便中の CR 特異的抗体価は上昇した。N 株感染マウスでは抗体価の上昇は見られなかったが、MN 株感染マウスでは一部抗体価が上昇したマウスが見られた。

複数の抗菌薬を前投与して腸内細菌を減少させた後にカナマイシンを自由飲水投与したマウスに感染させると、変異株も野生型と同様に腸内に菌は定着した。感染 4 週間後の野生株感染マウスの血中および糞便中の CR 特異的抗体価は上昇し、LPS によって吸収した血清の抗体価測定から、大半の抗体は LPS (O 抗原) 特異的な抗体であることがわかった。また、III 型分泌機構に関連するタンパク質である Tir、Intimin および EspB に対する抗体価も上昇することがわかった。変異株感染マウスの血中および糞便中の抗体価を測定したところ、LPS 特異的な抗体価は野生株同様に上昇がみられた。Tir、Intimin および EspB に対する抗体価は、N 株感染によっては上昇しなかった。NM 株感染の場合、一部抗体価の上昇がみられたものの明確な結果は得られなかった。過去に EHEC 感染モデルによって得られた結果では、接着しない変異株では LPS 特異的な糞便中抗体価は上昇しておらず、今回の結果と異なる。しかし、アクチン重合の誘導の有無で一部異なる結果が得られており、菌の接着のみならずアクチン重合が特異的な抗体誘導に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。

(5) Rho GTPase である RhoA、Rac1 および Cdc42 の活性型を CMT-93 細胞で発現させ、種々の転写因子の活性化について検討したところ、Rho GTPase のうち Cdc42 は NF- κ B を活性化したが、RhoA および Rac1 は活性化しなかった。Rac1 および Cdc42 を活性化する RhoGEF である KIAA0599 の TLR シグナルへの影響を検討したところ、TRIF 依存的シグナルを増強することを見出した。この活性化増強は、RhoA、Rac1 または Cdc42 の不活性型変異体を共発現させても抑制されなかった。さらに、KIAA0599 の Rho GTPase 活性化ドメイン欠失変異体でも増強活性がみられた。よって、KIAA0599 は Rho GTPase の活性化とは無関係に TRIF 依存的シグナルを増強すると考えられた。また、Cdc42 を活性化する RhoGEF である KIAA0362 について、TLR シグナルへの影響を検討したところ、やはり Rho GTPase の活性化を介することなく TLR シグナルの TRIF 依存的経路に関与するリン酸化 IRF-3 による PRD III/I プロモーターの転写活性を増強することを見出した。さらに、アクチン重合を誘導する RhoGEF のうち KIAA0362 について TLR シグナルへの影響を検討したところ、KIAA0362 は TLR 刺激によって活性化する TRIF 依存的および MyD88 依存的シグナルを増強し、特に TRIF 依存的シグナルでは転写因子である IRF-3 の核内への移行が促進されることによってシグナルを増強するメカニズムが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishikawa Masashi, Nakano Shun, Nakao Hiromu, Sato Katsuya, Sugiyama Tsuyoshi, Akao Yukihiko, Nagaoka Hitoshi, Yamakawa Hisashi, Nagase Takahiro, Ueda Hiroshi	4. 巻 61
2. 論文標題 The interaction between PLEKHG2 and ABL1 suppresses cell growth via the NF- B signaling pathway in HEK293 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 93~107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.04.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ayumu Yano, Keita Takahashi, Yusuke Mori, Shiori Watanabe, Yuki Hanamura, Tsuyoshi Sugiyama, Naoki Inoue	4. 巻 41
2. 論文標題 Peyer's Patches as a Portal for DNA Delivery by Lactococcus lactis in Vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 190-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00657	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Sugiyama, Kanna Nakao, Ryo Hayami, Takuya Hasegawa, Keita Takahashi, Naoki Inoue, Takahiro Nagase, Hiroshi Ueda
2. 発表標題 KIAA0599 augments TRIF- and Myd88-dependent TLR signaling
3. 学会等名 Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 患西丈彦、西科冨香、安田祐里花、村岡夏実、加藤大樹、前川洋一、井上直樹、杉山剛志
2. 発表標題 糞便移植を用いたデキストラン硫酸ナトリウム誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルにおける腸内細菌叢と病態の関係の解析
3. 学会等名 第54回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中尾莞奈、早水良、秋元奈央、長谷川拓也、高橋圭太、井上直樹、長瀬隆弘、上田浩、杉山剛志
2. 発表標題 Rhoグアニンヌクレオチド交換因子PLEKHG3によるTRIF依存的シグナル増強作用
3. 学会等名 第54回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安田祐里花、鶴見駿、早水良、恵西丈彦、高橋圭太、井上直樹、杉山剛志
2. 発表標題 A/E病変に伴うアクチンの重合が制御する宿主遺伝子発現
3. 学会等名 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 早水良、杉山剛志
2. 発表標題 Rhoグアニンヌクレオチド交換因子KIAA0362のToll様受容体シグナルへの影響
3. 学会等名 第23回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sugiyama T, Hasegawa T, Takahashi K, Inoue N., Nagase T., Ueda H.
2. 発表標題 ARHGEF15 augments TRIF-dependent pathway of TLR signaling via enhancing the phosphorylation of IRF-3
3. 学会等名 14th Biennial Meeting of International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 矢端文彦、中尾莞奈、早水良、田中秀幸、児玉雄大、高橋圭太、井上直樹、長瀬隆弘、上田浩、杉山剛志
2. 発表標題 腸管上皮細胞におけるRho GTPase活性化のToll様受容体シグナルへの影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鶴見駿、高橋圭太、井上直樹、杉山剛志
2. 発表標題 上皮細胞での型分泌装置を介したアクチン重合はCitrobacter rodentium特異的分泌型IgA産生誘導に必須ではない
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 早水良、杉山剛志	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学図書出版株式会社	5. 総ページ数 88
3. 書名 エンドトキシン・自然免疫研究 21 エンドトキシン・自然免疫研究のフロンティアをめざして	

〔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
研究分担者	上田 浩 (Ueda Hiroshi) (50253779)	岐阜大学・工学部・教授 (13701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高橋 圭太 (Takahashi Keita) (50634929)	岐阜薬科大学・薬学部・助教 (23701)	