

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10088

研究課題名(和文) 微生物・細胞内共生現象の解明とその破綻に起因する日和見感染発症機構の解析

研究課題名(英文) Molecular basis of host-microbe symbiosis within tissue resident macrophages

研究代表者

高橋 一郎 (takahashi, ichiro)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：20206791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸粘膜常在マクロファージは、胎生期由来のものが生後骨髄単球由来マクロファージによって置換される。しかし骨髄単球由来マクロファージが大腸粘膜常在マクロファージ固有の形質を獲得する機序については不明のままであった。本研究は「大腸常在マクロファージに持続感染する微生物とその発現産物が、同マクロファージに固有の形質賦与に寄与する」という実験仮説に沿って企画遂行され、大腸粘膜常在マクロファージ内に持続感染する *Stenotrophomonas maltophilia* および同菌に由来する *smIt2713* を、同マクロファージ固有の形質を賦与する共生因子として見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物細胞内共生という独自の視点から、宿主と微生物の間で繰り返されている感染現象を理解し、共生関係構築の端緒となる微生物側因子とその宿主作用点を明らかにし、当該生体分子を起点として発動される免疫応答の全貌を解明することは、Covid-19に代表される新興感染症重症化の分子基盤解明につながり、その成果は創薬として人類社会に新たな福音をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Interactions between the microbiota and the mucosal immune system are absolutely important in shaping mucosal immune responses. It is becoming clear that specific microbes influence specific lymphoid and non-lymphoid populations. We showed that *Stenotrophomonas maltophilia* is constitutively present in vivo in colonic lamina propria macrophages but not in lymphoid-tissue resident macrophages. Clinically isolated *S. maltophilia* enter bone marrow-derived macrophages (BMDMs) in vitro and persistent colonization increases mitochondrial respiration and IL-10 production. Colonization by *S. maltophilia* is impaired by IL-10 deficiency. The bacteria secrete a 25-KDa protein encoded by *smIt2713*. Expression of *smIt2713* in BMDMs induces IL-10 production. Bacteria deficient in *smIt2713* show reduced colonization and IL-10 production. We thus identify a novel symbiotic network between commensal bacteria and colonic macrophages.

研究分野：免疫学

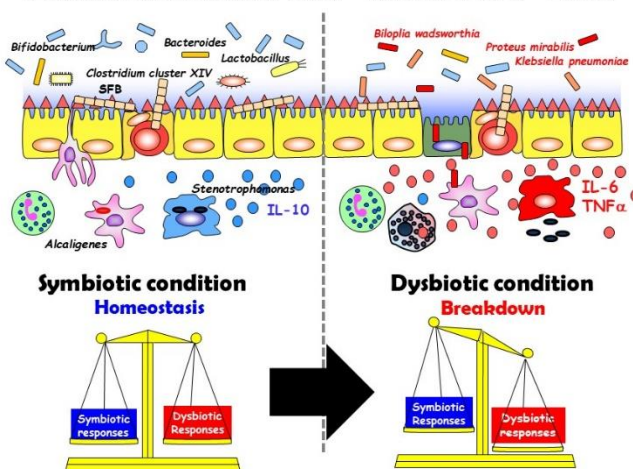
キーワード：host microbe symbiosis mucosal immunology tissue macrophage interleukin-10 mitochondrial OCR

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 健康なヒトの腸管には約1000種、100兆個におよぶ細菌が共生的に棲息しており、これら腸内細菌と腸管粘膜組織を構成する免疫細胞、内分泌細胞、神経細胞との相互作用が、正常な腸管・生態系の形成に重要であることはよく知られている。しかしながら反面、この健康な腸管生態系の破綻は、「クローン病」や「潰瘍性大腸炎」などの消化管を原発巣とする慢性炎症性疾患、さらに肥満、糖尿病、食物アレルギーなどの全身の慢性炎症疾患の発症トリガーになることが明らかになってきた。

自然免疫細胞における微生物細胞内共生現象

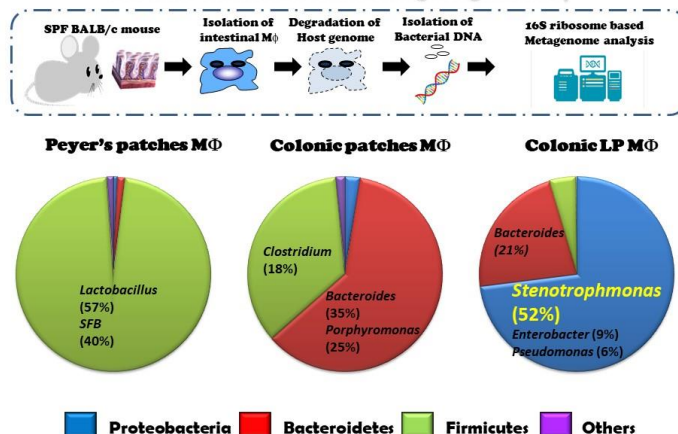


する慢性炎症性疾患、さらに肥満、糖尿病、食物アレルギーなどの全身の慢性炎症疾患の発症トリガーになることが明らかになってきた。

(2) メタゲノム解析の目覚ましい進展の中で、植物・昆虫細胞で報告のあった微生物の細胞内共生現象がヒトやマウスなどの多種多様な常在細菌や食餌性抗原に曝されている腸管関連リンパ組織 GALT において見出された (Obata T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010)。さらに GALT に共生する微生物は GALT を構成する樹状細胞やストローマ細胞の機能制御を介して消化管粘膜の組織恒常性、炎症制御に寄与する事が明らかにされつつある (Sonnenberg GF. et al., *Science.* 2012, Kurashima Y. & Kiyono H. *Annu. Rev. Immunology.* 2017)。しかし消化管粘膜に持続感染する共生微生物が発現する微生物由来共生因子とそれに対応する宿主免疫細胞側標的分子、またこれら分子間相互作用については不明のままである。

(3) 報告者は *S. maltophilia* が大腸常在マクロファージに共生的に持続感染することを見出し、この *S. maltophilia* が大腸常在マクロファージに固有の形質をエピジェネティックに賦与するのではないかという研究仮説を設定し、ヒト由来 *S. maltophilia* の骨髄分化マクロファージ (BMDM) への持続感染系を立ち上げ、*S. maltophilia* の骨髄分化マクロファージ (BMDM) への共生的持続感染を可能にする分子の探索を行い、*S. maltophilia* が産生する 2 型タンパク質の中

Existence of *Stenotrophomonas* 16S rRNA in the colonic lamina propria Mφ



中から TOFF-MAS 解析によって smlt2713 を見出した。この smlt2713 をコードする遺伝子を欠損する *S. maltophilia* 変異株では BMDM 内での共生的持続感染は維持されず、感染 BMDM のピロトーシス様の細胞死が観察された。さらに smlt2713 をコードする遺伝子を導入した Mφ を炎症性腸疾患のモデルマウスへ移入すると、CD45RB^{high}T 細胞によって惹起される大腸炎が軽減

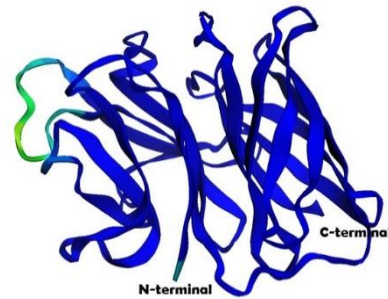
されることが明らかになり、smlt2713 は BMDM に対して大腸粘膜常在マクロファージ固有の形質を賦与することが示唆された。

2. 研究の目的

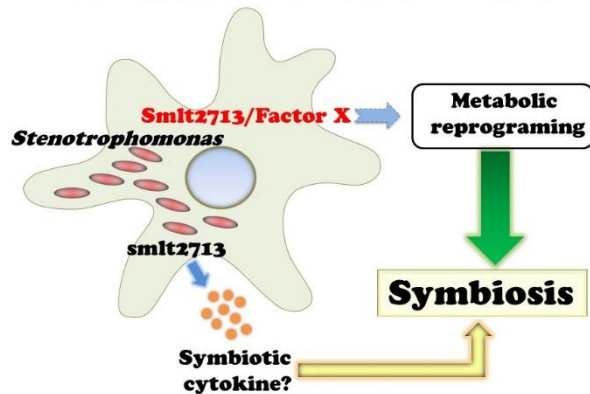
(1) *S. maltophilia* の BMDM への持続感染系を用いて、常態下における *S. maltophilia* のマクロファージへの共生的持続感染機構を smlt2713 とその生体標的分子 X との相互作用を中心に分子レベルで明らかにする。

(2) *S. maltophilia* ならびに共生因子 smlt2713 が微生物細胞内共生の成立において果たす役割を、宿主・共生細菌における物質代謝要求性の視点から理解することを目的に、*S. maltophilia* あるいは共生因子 smlt2713 適応宿主 Mφ と共生微生物における栄養要求性・物質代謝関連の遺伝子発現を RNA-sequence にて網羅的に検討し、共生宿主 Mφ ならびに共生微生物それぞれの代謝特性を調べ、微生物細胞内共生現象がもたらす生体恒常性の成立・維持機構の一端を物質代謝・生体エネルギー応答の観点から明らかにする。

α-fold 2 predicts 3D structure of smlt2713



本研究の目的 微生物細胞内共生の分子基盤解明



3. 研究の方法

(1) **免疫メタボリズム解析①** *S. maltophilia* が持続的に定着した BMDM、または共生因子 smlt2713 曝露 BMDM のミトコンドリア酸素消費速度 (OCR) および細胞外酸 (乳酸) 生成速度 (ECAR) を Seahorse フラックス アナライザーを使用して分析した。

(用語説明) : Seahorse flux analyzer の原理 : ミトコンドリア酸素消費速度を、水素イオン濃度の変化として、高感度・低侵襲性にルミネッセンスの励起反応を利用して検出し、蛍光強度の変化としてリアルタイムで定量する。

(2) **免疫メタボリズム解析②** 共生因子 smlt2713 曝露 BMDM における mTOR リン酸化と核 HIF-1α 発現の定量的測定のため、ウェスタンブロッティング分析を実施した。

(3) **smlt2713 標的分子(Factor X)の同定** 共生因子 smlt2713 に対する宿主 BMDM 内の標的分子を同定するため、smlt2713 固定化 FG-NHS ビーズ (玉川精機) に会合する BMDM 由来の細胞質タンパクを液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/MS) 解析で検討した。

(4) **smlt2713 固有の発現変動遺伝子の解明** smlt2713 曝露 BMDM において顕著な発現が観察される差次的遺伝子を網羅的に解明する目的で、bulk RNA-seq 解析を実施した。

(5) **smlt2713 標的分子 X の機能解明** CRISPR/Cas9 システム (IDT) を用いて、標的分子欠損骨髄由来マクロファージの構築を行った。

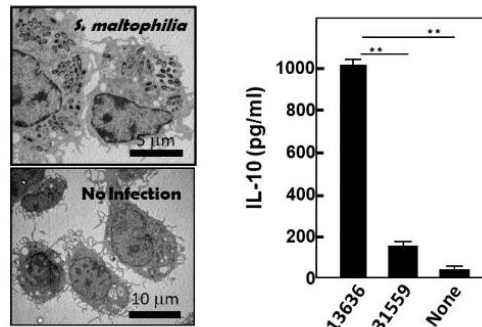
4. 研究の成果

(1)組織常在マクロファージと *S. maltophilia* の共生コロニー形成の分子基盤の探索

➤ *Stenotrophomonas*

maltophilia 共生 BMDM から分泌されるサイトカインの ELISA 解析の結果から、同微生物共生 BMDM からの**顕著な IL-10 産生**が明らかになった (右図)。

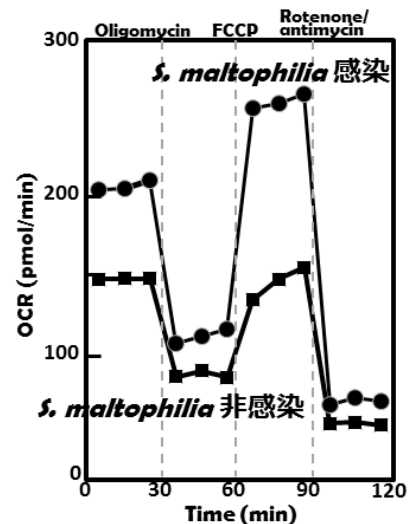
Persistent colonization of *S. maltophilia* induces robust IL-10 production in BMDM



➤ さらに、共生因子 *smlt2713* をコードする遺伝子を導入した BMDM においても**顕著な IL-10 産生**が観察された。

➤ *S. maltophilia* 持続定着 BMDM、または *smlt2713* 曝露 BMDM の代謝要求性を Seahorse フラックスアナライザーで評価したところ、グルコースの異化反応に依存するミトコンドリア酸素消費率 (OCR) の**顕著な増加**が観察された (右図)。

S. maltophilia 感染マクロファージ・ミトコンドリア酸素消費



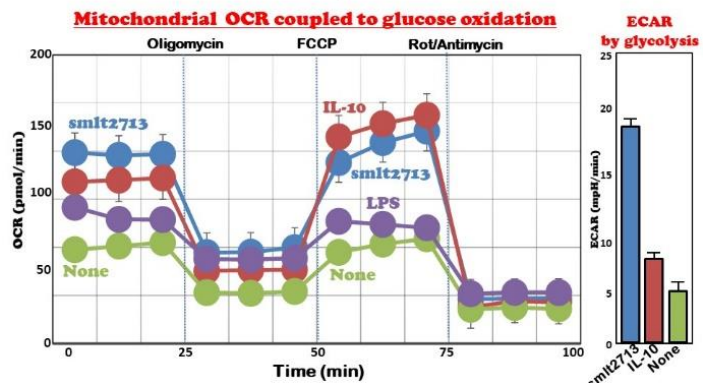
(2)共生因子 *smlt2713* が宿主マクロファージを調節する仕組みの分子解析-1

➤ ウェスタン解析を利用して、*smlt2713* 曝露 BMDM における栄養物代謝特性を制御する転写因子のタンパク質レベルでの発現を検討したところ、*smlt2713* 曝露 BMDM においては細胞質における **mTOR** リン酸化と核内での **HIF1- α** 発現の増加が観察された。

➤ また Seahorse フラックスアナライザーによるリアルタイム酸素消費速度の解析実験から、*smlt2713* 曝露

BMDM においては、(1) 好氣的なグルコース酸化に依存したミトコンドリア OCR ならびに乳酸生成に起因する ECAR の**顕著な増加** (右図) が観察されたが、(2) 反面、脂肪酸 (パルミチン酸) 酸化に依存したミトコンドリア OCR の著しい低下が観察された。

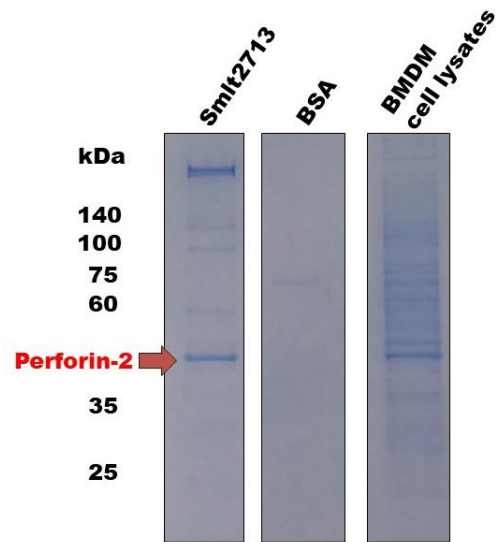
smlt2713 exposed BMDMs enhance mitochondrial glucose oxidation



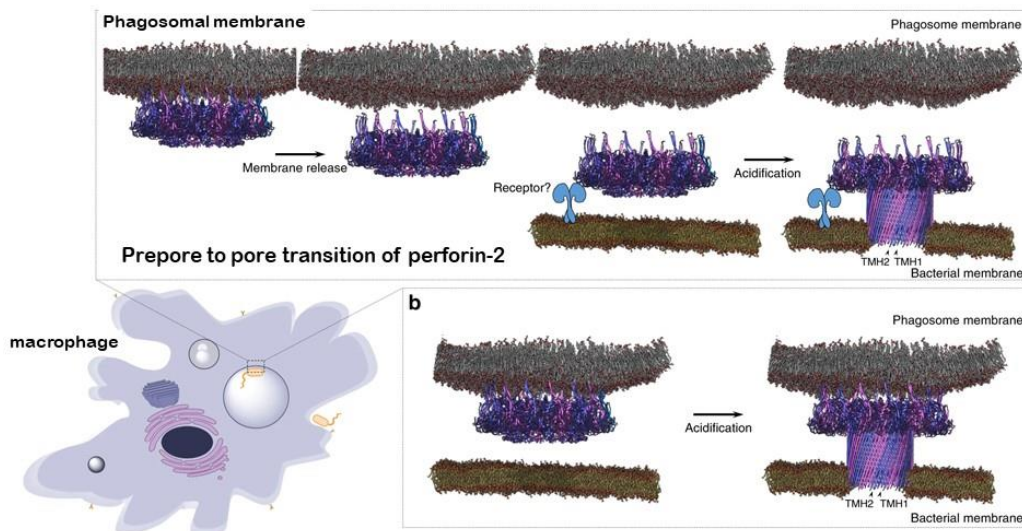
(3)共生因子 *smlt2713* が宿主マクロファージを調節する仕組みの分子解析-2

➤ *smlt2713* のリガンド (第 X 因子) の同定 共生因子 *smlt2713* に会合する宿主 BMDM

標的分子を明らかにするため、smlt2713 固定化 FG-NHS ビーズ（玉川精機）に会合する BMDM 細胞質タンパクの LC-MS/MS 解析を実施し、*mpeg1* 遺伝子によってコードされるパーフォリン 2 が、smlt2713 に強く会合する標的分子であることが推測された（右図）。現在、当該微生物細胞内共生におけるパーフォリン 2 の生物学的意義を明らかにするため（下図）、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を利用して *mpeg1* 遺伝子欠損 BMDM 株を作製し、*mpeg1* 欠損 BMDM における当該微生物の感染動態を共焦点レーザー顕微鏡で解析中である。



LC-MS/MS analysis of target molecule against smlt2713 revealed perforin-2 as a candidate



Cited from , Whisstock, et al., Nature communications (2019) 10:4288. The cryo-EM structure of the acid activatable pore-forming immune effector macrophage expressed gene 1

- smlt2713 曝露 BMDM の網羅的 RNA-seq 解析。smlt2713 曝露 BMDM から調製した mRNA の全 RNA-seq 解析から、**IL-1 β** 、**SAA3**（血清アミロイド A3）、**Acod1**（アコニン酸デカルボキシラーゼ 1）、**Arg1**（アルギナーゼ 1） / **Arg2**（アルギナーゼ 2）、および **Lcn2**（リポカリン 2）遺伝子などの顕著な発現亢進が観察され、これら複数遺伝子の相乗的な発現亢進が、当該微生物の BMDM 細胞内共生現象成立に寄与していることが示唆された。

本研究成果の一部は下記の原著論文として出版された。

Takahashi I, Hosomi K, Nagatake T, Toubou H, Yamamoto D, Hayashi I, Kurashima Y, Sato S, Shibata N, Goto Y, Maruyama F, Nakagawa I, Kuwae A, Abe A, Kunisawa J, Kiyono H. Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int. Immunol.* (2020) 32:133-141.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yanagisawa, A., K. Nagasaki, I. Takahashi, M. Miyauchi, T. Takata, et al.	4. 巻 17 (2)
2. 論文標題 Oral administration of bovine lactoferrin suppresses the progression of rheumatoid arthritis in an SKG mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0263254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0263254	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 該当する

1. 著者名 Takahashi I, Hosomi K, Nagatake T, Toubou H, Yamamoto D, Hayashi I, Kurashima Y, Sato S, Shibata N, Goto Y, Maruyama F, Nakagawa I, Kuwae A, Abe A, Kunisawa J, Kiyono H.	4. 巻 32
2. 論文標題 Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by Stenotrophomonas maltophilia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 133-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz071	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 該当する

1. 著者名 Ogita T, Miyamoto J, Hirabayashi Y, Rossi M, Mazzarella G, Takahashi I, Tanabe S, Suzuki T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of hypoxia-associated dendritic cells in colitic mice and effects of probiotics on IL-10 production in inflammatory dendritic-cells under hypoxia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Beneficial Microbes	6. 最初と最後の頁 801-810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3920/BM2018.0171	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 該当する

〔学会発表〕 計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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------