

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790415

研究課題名（和文） サルモネラ腸炎発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of *Salmonella*-induced colitis.

研究代表 羽田 健（Haneda Takeshi）

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：00348591

研究成果の概要（和文）：

サルモネラによる腸炎には本菌がもつ 3 つの III 型分泌機構（T3SS）、*Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-1、SPI-2 および鞭毛構成タンパク質が関与する。しかしながら、SPI-2 によるサルモネラ腸炎のメカニズムは不明な点が多い。本研究では SPI-2 による腸炎の分子メカニズムを明らかにする目的でサルモネラ腸炎に関わる SPI-2 エフェクターを同定することを試みた。しかしながら、このようなエフェクターを同定することはできなかった。一方、SPI-1 および SPI-2 の両方から分泌される III 型エフェクター SpvC が感染初期の炎症を回避する機能を持ち、これによって全身への本菌の拡散を可能することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Salmonella enterica serovar Typhimurium causes acute gastroenteritis. This bacterium has three Type III secretion systems (SPI-1, SPI-2 and flagella), which are required for intestinal inflammation. In this study, we tried to identify effectors secreted into host cells through T3SS-2. Unfortunately, we could not identify the SPI-2 effector associated with acute intestinal inflammation in a streptomycin pretreated mouse model. However, we showed that SpvC, both SPI-1 and SPI-2 T3SS effector, evades the immune response in the intestinal mucosa in the early stage of infection and facilitates bacterial dissemination at late stages of infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：サルモネラ、腸炎、III 型分泌機構

1. 研究開始当初の背景

非チフス性サルモネラ食中毒による腸炎患者は世界で年間 1 億人を超え、我が国にお

いても発生件数・患者数ともに上位である。このことから、サルモネラ食中毒に対する有効な感染予防・治療法の開発が望まれる。し

かしながら、サルモネラ腸炎発症の分子メカニズムは不明な点が多い。

サルモネラには 2000 以上の血清型が知られているが、ヒトに対し全身感染し重篤なチフス・パラチフス症を惹起する血清型 (Typhi および Paratyphi A) と局所感染により腸炎を引き起こす血清型 (非チフス性サルモネラ) の 2 つに大別することができる。非チフス性サルモネラによる食中毒は本菌が感染した後、1-3 日の潜伏期を経て腸炎 (腹痛 および下痢) を発症するのが特徴である。現在、非チフス性サルモネラによる腸炎の治療にはニューキノロン剤が用いられているが、多剤耐性非チフス性サルモネラの出現が臨床的に問題となっている。一方、非チフス性サルモネラはヒトを除くほ乳類、げっ歯類および鳥類に全身感染し、ヒトのチフス様症状を引き起こす。

これまでサルモネラ感染症に対する研究者の興味は、ヒトのチフス症のモデルとして血清型 Typhimurium のマウス全身感染モデルを用いて、サルモネラの全身感染に関わる因子を同定することにあつた。この結果、全身感染に関与する病原因子が多く同定されてきた。これに対し、サルモネラ腸炎においては適当な動物モデルが存在せず、主に培養細胞を用いた *in vitro* の研究が行われてきており、このことがサルモネラ腸炎の発症メカニズムの解析を困難にしてきた。しかし近年、ストレプトマイシン投与マウスがサルモネラの腸炎モデルとして使用されるようになってから、サルモネラ腸炎の新たな分子メカニズムが明らかになりつつある。

2. 研究の目的

報告者らはこれまでに、サルモネラ腸炎の指標として、腸炎マウスモデルの盲腸における CXCL10 ケモカインの発現を調べることで、量的にかつ比較的簡便に腸炎を評価することを見出した。この評価系を用いてこれまで

不明であつたサルモネラ腸炎のメカニズムを明らかにしようとするのが本研究の目的である。

サルモネラ腸炎に関わる細菌側の因子として 3 つの III 型分泌機構 (鞭毛、SPI-1 および SPI-2) が知られている。サルモネラ感染初期では、宿主腸管内で発現する *Salmonella* pathogenicity island -1 (SPI-1) III 型分泌機構により M 細胞や上皮細胞にエフェクターは宿主上皮細胞アクチン骨格を制御し、貪食運動を誘導する。SPI-1 エフェクター (SopE, SopE2 および SopD) はまた、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化により炎症性サイトカインの分泌を誘導し、腸炎を引き起こす。また、上皮細胞バリアを突破したサルモネラは鞭毛および SPI-1 III 型分泌機構より FliC および FljB (フラジェリン) を分泌することで上皮細胞管腔側に発現する Toll like receptor (TLR) 5 を介したシグナル伝達系を活性化し、炎症性サイトカインが発現される。その後、マクロファージや樹状細胞に貪食されたサルモネラは、フラジェリンをこれらの細胞の細胞質に分泌し、nucleotide-binding oligomerization (Nod)-like receptor ファミリー Ipaf を介した caspase-1 炎症性タンパク質複合体 (inflammasome) を活性化する。この結果、活性化された caspase-1 により炎症性サイトカインが発現される。さらに詳細は不明であるが、サルモネラ感染中期以降に発現される SPI-2 III 型分泌機構も腸炎発症に関与することが明らかにされている。

近年、(1) 臨床分離される非チフス性サルモネラでは SPI-1 欠失株が多く見られること、(2) 非チフス性サルモネラのうち、腸炎を起こしやすい血清型では感染後期においてより重篤な腸炎を引き起こすことから、SPI-2 がサルモネラ腸炎において重要な役割を果たしていることが予想される。

また、サルモネラでは腸炎を抑制する因子がいくつか同定されており、本菌は腸炎を誘導する一方で腸炎を回避する機構を持っていることが明らかとなってきた。III型分泌機構のエフェクタータンパク質として同定された SspH1 および SpvC は MAPK を脱リン酸化することで腸炎の回避に関わる。サルモネラ感染において、本菌が宿主細胞に炎症を誘導することは細胞の破壊を促し、その結果、宿主のバリアを容易に突破することができる。これに対し、宿主の防御反応としての炎症を回避し、増殖を可能にすることで感染を拡大し、サルモネラ特有の全身感染を誘導することが可能となる。

報告者らはヒトにチフス症を引き起こし、腸炎を全く起こさない血清型 Typhi が Vi 莢膜と呼ばれる菌体表層構造物を発現することにより、SPI-2 による腸炎を抑制することを明らかにした。血清型 Typhi はまた、転写調節因子である TviA を特異的に発現することで鞭毛と SPI-1 III 型分泌機構の発現を抑制することが知られている。これらのことから、血清型 Typhi は TviA および Vi 莢膜により鞭毛、SPI-1 および SPI-2 のすべての III 型分泌機構による腸炎を回避することが明らかとなった。このことは血清型 Typhi が腸炎を回避することによって、全身に伝播する機会を増やしていることを示唆している。

以上のように、SPI-2 による腸炎はその重要性は明らかになっているのにも関わらず、腸炎発症のメカニズムは全く明らかにされていない。そこで、本研究ではサルモネラ腸炎に強く関わる SPI-2 による腸炎発症の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

非チフス性サルモネラによる腸炎に関わる細菌側因子として3つのIII型分泌機構（鞭毛、SPI-1 および SPI-2）が知られてい

る。これまでに、血清型 Typhimurium を腸炎モデルマウスに感染後、3日以降では SPI-1 変異株においても野生株と同様に盲腸に炎症が見られるのに対し、SPI-1SPI-2 変異株では全く見られないことを確認した。また、感染3日以降では鞭毛変異株では野生株と同様の炎症が見られることを他の研究グループが既に明らかにしている。以上のことから、感染3日（感染中期）以降の炎症には SPI-2 が深く関わっていることが示唆される。そこで、SPI-2 による炎症をより詳細に解析するため、SPI-1、SPI-2、SPI-1SPI-2、鞭毛 SPI-1 および鞭毛 SPI-1SPI-2 の5つの変異株を腸炎モデルマウスに感染し、感染5日後の盲腸の炎症について、病理組織診断を行い、さらに CXC ケモカインを含む、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現の違いを qRT-PCR にて確認し、3つのIII型分泌機構と腸炎の関係を明らかにする。

SPI-2 による腸炎に関わる細菌側因子（エフェクター）の同定

これまで SPI-2 のエフェクターとして19個のタンパク質、また SPI-1 および SPI-2 の両方から分泌されるエフェクターとして3個のタンパク質が同定されている。まずこれらのエフェクターのうち、機能未知の9個のタンパク質について、腸炎に関わるか否かをマウス腸炎モデルを用いて明らかにする。

SPI-2 による腸炎の MAPK への関与

血清型 Typhimurium 鞭毛 SPI-1 変異株および鞭毛 SPI-1SPI-2 変異株をヒト子宮頸癌由来上皮様細胞 HeLa およびマウスマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 に感染し、培養上清および細胞溶解物について、抗リン酸化 p38、ERK および JNK 抗体を用いたイムノブロットングを行い、炎症により活性化

によるリン酸化された MAPKs を検出する。

4. 研究成果

III 型分泌機構とサルモネラ腸炎との関連

非チフス性サルモネラによる腸炎に関わる 3 つの III 型分泌機構（鞭毛[flagella]、SPI-1 および SPI-2）をそれぞれ欠失した 3 種類の変異株（ Δ flagella、 Δ SPI-1 および Δ SPI-2）、またそれらの組み合わせの変異株（ Δ SPI-1 Δ SPI-2、 Δ flagella Δ SPI-1、 Δ flagella Δ SPI-2 および Δ flagella Δ SPI-1 Δ SPI-2）を作成し、マウス腸炎モデルの盲腸の炎症の程度を評価した。その結果、感染 3 日後の腸炎には鞭毛および SPI-1 が関わることを確認した。一方、感染 5 日後の腸炎では、SPI-2 のみが関与することを明らかにした。

腸炎に関わる新規エフェクターの同定

前年度の当該研究において、サルモネラ感染後期の腸炎には SPI-2 III 型分泌機構が重要な役割を果たすことを明らかにした。そこで、SPI-2 による腸炎に関わる III 型エフェクターを同定するため、これまで報告されているエフェクターの欠失変異株をマウス腸炎モデルに感染し、感染マウスの盲腸における炎症程度を野生株感染マウスと比較した。しかしながら、用いた全てのエフェクター変異株において、感染マウスの盲腸の炎症の程度は、野生株感染マウスとそれと同程度であったことから、腸炎に関わるエフェクターを同定することはできなかった。

一方、SPI-1 および SPI-2 III 型分泌機構の両方から分泌される SpvC についてはその酵素活性（リン酸化スレオニンリアーゼ: PTL）が既に他のグループによって報告されていたが、サルモネラ感染における SpvC の機能は不明であった。そこで、マウス腸炎モデルを用いて SpvC の機能を詳細に解析した。その結果、サ

ルモネラは PTL 活性により宿主の MAPKs を脱リン酸化（不活化）し、感染初期の炎症を回避することで全身への本菌の拡散を可能にすることが示され、サルモネラ感染における SpvC 役割のひとつが明らかとなった。

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 2 件）

Haneda T, Sugimoto M, Yoshida-Ohta Y, Kodera Y, Oh-Ishi M, Maeda T, Shimizu-Izumi S, Miki T, Kumagai Y, Danbara H, Okada N. Comparative proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ppGpp-deficient mutant to identify a novel virulence protein required for intracellular survival in macrophages.

BMC Microbiol 2010 10:324

Haneda T, Okada N, Kikuchi Y, Takagi M, Kurotaki T, Miki T, Arai S, Danbara H. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Choleraesuis *slyA* mutant strains for use in live attenuated oral vaccines. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2011 34(5):399-409.

〔学会発表〕（計 4 件）

羽田健 サルモネラ感染における SpvC の役割 インターラボセミナー（日本細菌学会関東支部：東京）2010. 11. 26

Takeshi Haneda, Yuta Ishii, Hiromichi Shimizu, Keiko Ohshima, Hirofumi Danbara, Nobuhiko Okada. SpvC, a *Salmonella* effector, reduces intestinal inflammation during early stage of infection FEMS 2011 (Geneva) 2011. 6. 26-30 [FEMS 2011 program book p.216 2011. 6]

Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada.
Salmonella type 3 effector SpvC, a
phosphothreonine lyase, contributes to
reduction in inflammatory response during
intestinal phase of infection IUMS 2011
(Sapporo) 2011.9.6-10 [IUMS 2011 Final
program p.155 2011.9]

Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada.
Salmonella type 3 effector SpvC, a
phosphothreonine lyase, contributes to
reduction in inflammatory response during
intestinal phase of infection 第 94 回日
本細菌学会関東支部総会（東京）
2011.10.6-7 [第 94 回日本細菌学会関東支部
総会 プログラム・抄録集 p.51 2011.10]

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽田 健 (HANEDA TAKESHI)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：00348591

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし