

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590523

研究課題名(和文) 宿主自然免疫応答からの菌の回避に細菌リポ多糖の構造変化が果たす役割

研究課題名(英文) Role of structural alteration of bacterial lipopolysaccharide on bacterial evasion of host innate immune responses

研究代表者

松浦 基博 (Matsuura, Motohiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：20150089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なグラム陰性菌としてネズミチフス菌を用いて、菌のリポ多糖(LPS)のアシル基数減少変異株を作成した。野生株と変異株をマウスやヒト由来の培養細胞に感染させ、LPSのアシル基数を減少させるという構造変化を起こすことによって菌は宿主自然免疫応答から回避して感染性を増強できることを示した。サイトカイン産生活性を自然免疫応答の指標とすると変異株に対する活性低下はヒト細胞TLR4系による認識からの回避に起因するところが多いが、貪食性を指標にすると活性低下はマウス細胞でもみられTLR4非依存的でもあり、幅広い宿主に対する普遍的な回避機構である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salmonella Typhimurium was used as representative Gram-negative bacteria and generated mutant strains having reduced number of acyl groups in its lipopolysaccharide (LPS). Culture cells of mouse and human origins were infected by the wild and mutant strains and revealed the effect of structural alterations of LPS to less-acylated types on evasion of host innate immune responses that lead to enhancement of bacterial pathogenicity. Among the markers of innate immune responses, cytokine inducing activity was down-regulated by the less-acylated mutants in human cells largely caused by evasion of TLR4 stimulation. While phagocytic activity was weakened by the mutants even in mouse cells without TLR4 dependency and this evasion was suggested to occur generally in wide variety of host origins.

研究分野：感染免疫(細菌感染に対する宿主自然免疫応答)

キーワード：細菌リポ多糖LPS 自然免疫 細菌感染 免疫回避

1. 研究開始当初の背景

(1) グラム陰性菌の細胞壁成分である細菌リポ多糖 (LPS) は宿主細胞の TLR4/MD-2 受容体に認識され、自然免疫応答による感染菌排除機構を亢進させるための絶好の標的になる。LPS の構造中でこの受容体に認識されるのはリポド A と呼ばれる脂質部分の構造で、多くのグラム陰性菌では 6 個のアシル基を結合したタイプがリポド A の主成分として見出されている。ただ、菌種によっては結合するアシル基数が減少したタイプの構造を主成分とするリポド A を持つものもあり、このような構造は TLR4/MD-2 受容体に認識され難くなる。特にヒト細胞の受容体は構造要求性が厳しく、マウス受容体の応答に比べて少しの構造変化でもその応答が大きく低下することが知られている。そうすると、アシル基数が減少したタイプのリポド A を主成分として持つ菌は、ヒトに感染してもヒト細胞受容体には認識さないため、ヒトの自然免疫監視機構をすり抜けて感染を拡大してしまうのではないだろうか。

(2) この様な条件に合う菌として我々はペスト菌を見出した。この菌は環境中や菌の運び屋 (ベクター) となるノミの体内では 27 付近で生育し、6 アシルタイプのリポド A を LPS の主成分として持つが、ネズミやヒトの体温の 37 付近で生育した場合にはリポド A の主なタイプが 4 アシルタイプにシフトすることを明らかにした¹⁾。これら二つの温度で培養した菌の LPS や菌体 (ホルマリンで処理した死菌体) を用いてマウスやヒトの細胞を刺激して、LPS だけでなく菌体レベルの反応でも 37 培養菌由来のものはヒト細胞に対する刺激活性がほとんど無くなっていることを示した²⁾。即ち、ヒト自然免疫機構による菌体認識からの回避に貢献している可能性が大きいことを指摘できた。また、このアシル基数減少効果は、ペスト菌の病原因子と考えられている様々な因子の作用を上回って病原性発現に貢献していることを指摘する報告も出された³⁾。ペスト菌以外にも野兔病菌やピロリ菌その他の菌で、アシル基数減少リポド A を主成分とする LPS が菌の病原性に貢献することを示唆する報告が次第に増えつつあった。

2. 研究の目的

LPS のリポド A アシル基数減少が菌の感染性増強に関与するという現象は、これまでに知られているような限られた種類の菌の感染時のみ見られるのか、より幅広く一般的なグラム陰性菌の感染時にも起こり得るのかを明らかにすることを目的にした。また、このような LPS の構造変化に由来する効果が、生きている菌を用いて宿主細胞に感染させた時にも見られるのかどうかを調べ、実際の感染により近づけた実験条件下でも有意な効果として発現されるのかを明らかにする

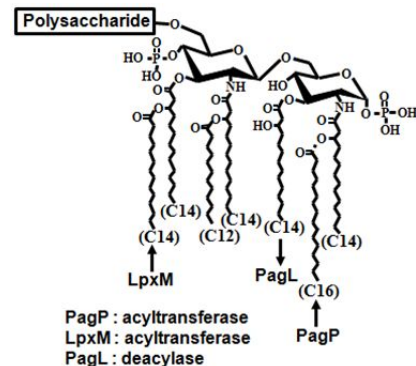
ことも目的とした。

3. 研究の方法

ネズミチフス菌はサルモネラ属に含まれる代表的なグラム陰性菌の一つで、生菌を用いる実験も通常の P2 レベルの施設で行うことができる。また、この菌の LPS 生合成経路に関する研究も進んでいるので、生合成経路上の遺伝子を変異させてリポド A アシル基数減少変異株を作成した。ここで得られた変異株の数株と親株を用いて、それらの菌株から得られた LPS でマウスあるいはヒトの培養細胞を刺激して免疫賦活作用を調べた。その後、生菌を培養細胞に感染させたときに見られる反応が LPS の反応にどの程度依存しているのかを調べた。更に、これら菌株の感染を受けた宿主細胞による菌の貪食についても検討を加え、菌の変化が貪食効率に及ぼす影響についても調べた。

4. 研究成果

(1) ネズミチフス菌のリポド A アシル基数減少変異株の作成。ネズミチフス菌野生株 LPS のリポド A には図 1 に示すように 7 個のアシル基が結合しているが、その中で 2 位に結合するアシル基の側鎖 (C16:PagP の作用を受ける部位) だけはリポド A 分子の一部 (数割) にしか結合していない。そのため野生株 (KCS015) のアシル基数を 7~6 と表示した。



Strain	Mutation	Number of acyl groups
KCS015	Wild type	7~6
KCS237	Δ PagP	6
KCS311	Δ LpxM	6~5
KCS324	Δ PagP+ Δ LpxM	5
KCS369	Δ PagP+ Δ LpxM+PagL	5~4

図 1. ネズミチフス菌野生株の LPS 構造と変異株のアシル基数の比較

この株を親株としてアシル基転移酵素 PagP を欠損させた変異株 KCS237 では 2 位アシル基の側鎖は無くなるがその他の 6 か所のアシル基は全てのリポド A 分子で保持されているのでアシル基数を 6 と表示した。PagP 以外にも作用部位が異なるアシル基転移酵素 LpxM を欠損させたり、脱アシル酵素 PagL を

導入したりして得られた変異株で本研究に用いた株を図1に示した。また、これらの菌体から抽出したリポドAを質量分析にかけて解析を行った結果に基づいて結合するアシル基数を確認して図に示した。

(2) 野生株と変異株のLPSによるマウスあるいはヒト培養細胞に対する刺激活性。マウスマクロファージ系 RAW264.7 細胞の培養系に各LPSを添加して、サイトカイン(TNF- α とIL-6)産生誘導活性を調べることにより自然免疫刺激活性の指標とした。その結果、6アシルリポドAを主成分として含む、野生株 KCS015 と変異株 KCS237 のLPSには強い活性が認められた。5アシルリポドAを主成分として含む、変異株 KCS311 及び KCS324 のLPS並びに4アシルリポドAも含有する変異株 KCS369 のLPSについては、活性の低下が見られるものの有意な刺激活性が認められた。一方、ヒトマクロファージ系 U937 細胞に対するこれらLPSの刺激活性では、KCS015 株と KCS237 株のLPSには強い活性が認められるのに対して、KCS311 株、KCS324 株及び KCS369 株のLPSには活性が全く認められなかった。これらの結果から、リポドAアシル基数が5個あるいはそれ以下に減少したLPSはヒト細胞には認識されなくなり、マウス細胞による認識とは大きな違いが出ることが分かった。

(3) ヒト細胞によるネズミチフス菌野生株と変異株の菌体レベルでの認識応答。菌をホルマリン処理することにより作成したホルマリン死菌体(FKB)および生きている菌を用いて、ヒト U937 培養細胞を刺激した場合のサイトカイン産生応答から自然免疫刺激活性を調べた。その結果を図2に示したが、生菌感染の場合でもFKB刺激の場合と類似の反応が見られ、強い活性を示す KCS015 株と KCS237 株のグループに対してその他3株のアシル基数減少菌株のグループでは大幅に活性が低下し、両グループ間で大きな差が出ることが明らかになった。

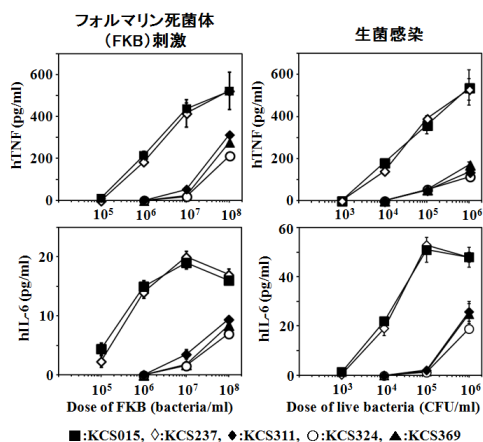


図2. 死菌体刺激並びに生菌感染に対するU937細胞のサイトカイン産生応答

菌体レベルの活性ではLPS以外の多くの菌体成分の作用による影響も大きく現れる可能性があるが、前者グループの強い活性はTLR4のアнтаゴニストあるいは抗体の作用によって大幅に抑制されることが分かった。このことから実際の生菌感染による反応でもLPSの認識応答が前面に出てくることが明らかになった。従って、LPSのアシル基数減少による活性変化の影響も菌体レベルの反応に大きく反映されるものと考えられる。

(4) ヒト細胞による野生株および変異株の貪食効果。生体内での感染菌の処理はまず食細胞による菌の貪食から始まり殺菌へと続いて行き、その過程をより効果的かつ強力にするためにサイトカインが働くと考えられる。そこで、菌の貪食段階でもLPSアシル基数減少の影響が見られるのかどうかを検討することにした。その結果、図3に示すように、アシル基数が主として6個のKCS015とKCS237のグループの菌株の被貪食菌数に対し、アシル基数が主として5個かそれ以下に減少した他の3菌株のグループの被貪食菌数は有意に減少することが分かった。このことは、LPSアシル基数を減少させた菌株はヒト食細胞による貪食からも回避し易くなっていることを示すもので、貪食抵抗性を増強したことになるかと解釈できる。

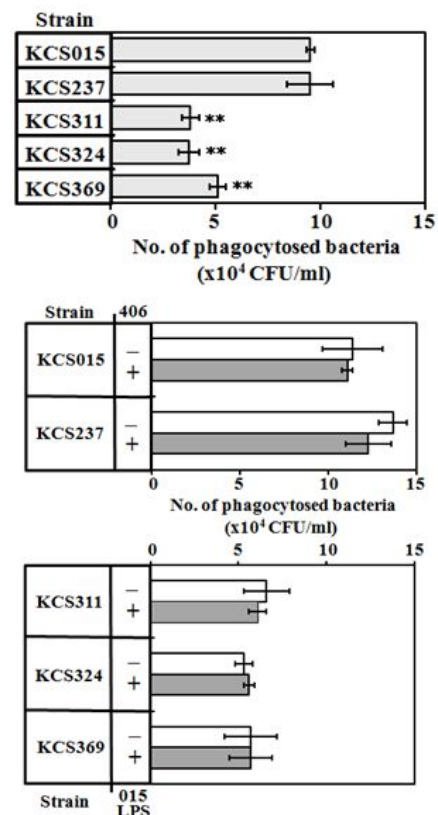


図3. U937細胞による各菌株の貪食菌数の比較、並びにTLR4アンタゴニストあるいはアゴニストがそれらの貪食に及ぼす影響

次に、U937 細胞に TLR4 アンタゴニストである化合物 406 を作用させて TLR4 情報伝達系を抑制した場合に、KCS015 株と KCS237 株の高い貪食菌数が低下するのかどうかを検討した。その結果、図 3 に示すようにアンタゴニストの作用による影響は受けなかったことが分かった。その逆に、TLR4 アゴニストとして活性型 LPS で刺激して TLR4 情報伝達系を活性化させた時に、KCS311 株、KCS324 株および KCS369 株の低い貪食菌数が上昇するのについても検討した。この場合にもアゴニストの作用による影響は認められなかった。これらの結果は、サイトカイン産生誘導活性の場合とは異なり、貪食作用には TLR4 情報伝達系の関与は無いことを示すものであった。

更に、マウス RAW264.7 細胞を用いて、これら菌株に対する貪食作用を調べたところ、ヒト細胞による貪食作用と類似の結果が得られた。このことは、LPS アシル基数の減少による貪食抵抗性増強効果は、ヒト細胞系に限らずマウス細胞系でも見られ、もっと幅広い宿主細胞系でも見られる可能性を示すものであった。

(5) 本研究ではグラム陰性菌感染の際に菌の LPS アシル基数が減少すると宿主自然免疫応答を回避して感染性を増強し易くなることを生菌感染実験によっても示すことが出来た。そしてサイトカイン応答に関してはヒト細胞の TLR4 系による認識の関与が大きい、貪食抵抗性に関しては TLR4 系に依存することもヒト細胞系に限られることもなく、幅広い宿主に対して普遍的に対応できる可能性があることも示すことができた。

引用文献

Kawahara K, Tsukano H, Watanabe H, et al. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect. Immun.* Vol. 70, No. 8, 2002, pp. 4092-4098

Matsuura M, Takahashi H, Watanabe H, et al. Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. *Clin. Vaccin Immunol.* Vol. 17, No. 1, 2010, pp. 49-55

Montminy SW, Khan N, McGrath S, et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nature Immunol.* Vol. 17, No. 10, 2006, pp. 1066-1073

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)

Matsuura M, Structural modification of bacterial lipopolysaccharide that facilitate Gram-negative bacterial evasion of host innate immunity. *Frontiers Immunology*. 査読有、Vol. 4, 2013, 00109, DOI:10.3389/fimmu.2013.00109

Matsuura M, Kawasaki K, Kawahara K and Mitsuyama M., Evasion of human innate immunity without antagonizing TLR4 by mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium having penta-acylated lipid A. *Innate Immunity*. 査読有、Vol. 18, No. 5, 2012, pp. 764-773,

[学会発表](計 3 件)

松浦 基博, リピド A アシル基数減少がグラム陰性菌の病原性増強に果たす役割、第 20 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2014 年 12 月 6 日、順天堂大学本郷キャンパス(東京都)

Matsuura M, Modification of lipid A structure in lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* that facilitate bacterial evasion of human innate immunity. Cold Spring Harbor Asia Conferences, *Yersinia 11*, 2013 年 6 月 27 日、蘇州市(中華人民共和国)

Matsuura M, Kawasaki K, Kawahara K and Mitsuyama M, Evasion of human innate immunity without antagonizing TLR4 by mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium having penta-acylated lipid A, European Congress of Immunology, 2012 年 9 月 7 日、グラスゴー市(英国)

[図書](計 1 件)

松浦 基博, 医学図書出版、エンドトキシン・自然免疫研究 18、2016、印刷中

[その他]

学会レポート、松浦 基博, 第 3 回欧州免疫学会、感染・炎症・免疫、Vol. 43, No. 1, 2013, pp. 55-56,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 基博(MATSUURA, Motohiro)
京都大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号：20150089