

研究課題別評価

1 研究課題: 粘膜病原細菌の感染に対するワクチン開発を目指した新戦略の構築

2 研究者氏名: 鈴木 敏彦

グループメンバー: 光田 輝彦(研究期間: H14.4.1~H15.3.31)

吉田 整(研究期間: H14.4.1~H15.12.31)

赤倉 麗子(研究期間: H15.1.1~H16.8.31)

3 研究の狙い:

細菌性赤痢は、現在でも発展途上国の乳幼児の下痢症による死亡原因の約 5 割を占めている重要な感染症である。実際の統計においても全世界で年間 1 億 6500 万人が罹患し、そのうち 110 万人が死亡している(WHO、1999 年)。社会基盤が脆弱な開発途上国においては抗生物質による治療は経済的に困難を伴い、またその乱用により多剤耐性菌が蔓延しており、したがって効果的で安全なワクチンの開発が切望されている。これまで赤痢ワクチンの研究から現時点では生菌による O-多糖抗原に対する免疫誘導が感染防御に最も有効であり、上皮細胞への侵入性を保持したまま細胞内での増殖と拡散を不能にした二重変異株が多く作製されてきた。しかしこのようなワクチン株は依然として発熱と軽度の下痢原性を有し、特に乳幼児に対する安全性が解決されていない。このような背景から、次世代の安全性に優れた赤痢弱毒ワクチン開発に必要な分子基盤を確立することを本研究の目標とした。特に赤痢菌から分泌され粘膜感染に必須な役割を果たすエフェクター蛋白機能および抗原提示細胞の細胞死誘導機構に焦点を当てその分子機構を解明することを目指し、さらに得られた知見をもとに弱毒でかつ高い防御免疫誘導能を有するワクチン株の試作を行った。

4 研究結果:

(1) 赤痢菌のアクチン重合機構と宿主細胞特異性

赤痢菌は細胞内に侵入後菌の一極にアクチンの重合を誘導して細胞質中を運動し、さらに隣接細胞へ拡散する。このアクチン重合に基づく細胞間拡散は菌のエフェクター蛋白 VirG と N-WASP との結合を介した Arp2/3 complex の活性化機構による。N-WASP は N-WASP、WASP、WAVE-1、-2、-3 からなる WASP ファミリーの 1 分子であるが、我々は赤痢菌の VirG が N-WASP とのみ特異的に結合することを見出した。またマクロファージ等の血球系細胞では特異的に WASP が発現しているが N-WASP の発現は抑制されており、そのためマクロファージ内では赤痢菌はアクチンコメットを形成しない。このことから VirG-N-WASP の特異的結合が赤痢菌の細胞内運動機構における宿主細胞特異性を決定していることが明らかとなった。

(2) 宿主細胞侵入性に関与する VirA エフェクターの機能の解明

赤痢菌のエフェクターの 1 つ VirA の宿主標的分子は宿主細胞のチューブリンであることを見出した。試験管内で VirA は微小管の不安定性を増大する活性をもっていたが、VirA の細胞内発現や細胞への微量注入を行うと VirA は微小管に局在し細胞辺縁からラッフル膜の形成を認めた。一方赤痢菌の感染や VirA の細胞内発現によって低分子量 GTP 結合蛋白 Rac1 の活性化がみられた。したがって VirA は微小管の不安定性を増大させることによって Rac1 を活性化し、これによって細胞による菌の貪食を誘導することが明らかとなった。

(3) 抗原提示細胞に対する細胞死誘導機構の解明

赤痢菌が樹状細胞(DC)やマクロファージといった抗原提示細胞に侵入する(あるいは貪食されると)、ファゴゾームを溶解して細胞質へ離脱し、その後細胞死を誘導することが知られている。菌による細胞死誘導はカスパーゼ-1 の活性化によると報告されてきたが、我々はカスパーゼ-1 の

活性化は菌の細胞死誘導に促進的に働くが必須ではないことを明らかにした。各種赤痢菌変異株を用いた実験の結果、赤痢菌や大腸菌といったグラム陰性細菌に共通の因子がマクロファージの細胞質へ移行することによって細胞死の誘導が起きることが示された。さらに細胞死誘導因子の同定を行い最終的に Lipid A が細胞死誘導分子の 1 つであることを明らかにした。実際に Lipid A (あるいは LPS)が TLR4 を介してアポトーシス活性あるいは抗アポトーシス活性を誘導することは広く知られている。しかし、TLR4 欠損マクロファージに赤痢菌が感染しても依然細胞死の誘導が認められた。したがって感染細胞の細胞質において赤痢菌から放出される lipid A が TLR4 を介さない全く別の細胞死誘導シグナルを刺激していることが示唆された。

(4)新規弱毒ワクチン株の作製とその評価

赤痢菌がマクロファージに侵入し細胞質に遊離すると細胞死の誘導とそれに伴い IL-1 β の分泌が引き起こされる。これらによる強い炎症は細胞侵入性を有する赤痢菌株であれば誘導される。したがってマクロファージの細胞死は従来の細胞侵入性弱毒ワクチン株でみられる炎症(ひいては発熱といった副作用)の誘導に関わると考えられた。そこで細胞侵入能は有するがマクロファージに感染後のファゴゾーム膜溶解能を欠失した変異株を作製できれば低炎症性の新規のワクチン株になる可能性があると考えられた。エルシニアの細胞侵入因子 *invasin* の遺伝子を細胞侵入能欠損株(IpaB エフェクター欠損株)に導入した。本変異株は細胞侵入性を持つがマクロファージに感染後細胞死を誘導せず、細胞死に伴って大量に分泌される IL-1 β および IL-18 量も低下していた。次にマウスに対する肺炎惹起モデルを用い、*invasin* 発現変異株のワクチンとしての効果の有無を検討した。投与後の血清中および気管支肺洗浄液中の抗赤痢菌 LPS-IgG, -IgA の有意な上昇がみられ、さらに致死量の赤痢菌野生株感染に対する感染防御効果が示された(投稿準備中)。

5 自己評価:

本研究の期間に赤痢菌が有しているエフェクターの多彩な機能の一部を明らかにすることができたが、新規に開始した未知のエフェクターの解析が思うように進行しなかったことは反省すべき点である。その一方で、赤痢菌が誘導する細胞死のメカニズムの一端を明らかにし、その応用として新たに作製したワクチン株による感染防御誘導は、低炎症性新規赤痢ワクチン株のプロトタイプとして有用な基礎知見となりえた。

6 研究総括の見解:

赤痢菌の新世代ワクチンの開発を目指した研究である。赤痢菌の感染は粘膜細胞に侵入して成立するが、この粘膜感染に必須のエフェクター蛋白が数多く報告されている。これらエフェクター蛋白の機能の一部を明らかにしたことは評価に値する。また、赤痢菌は抗原提示細胞の細胞死を誘導するが、この細胞死の分子機構の一端を明らかにした。さらに、これらの成果を踏まえて新たなワクチン候補株を作製し感染防御を誘導することを示した。今後の新世代ワクチン開発の基礎を示したものとして期待される。

7 主な論文等:

1. Suzuki, T., Mimuro, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Sasakawa, C. 2002. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for *Shigella* VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading. *Cell. Microbiol.* 4: 223-233.
2. Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A., Mimuro, H., Suzuki, T., and Sasakawa, C. 2002. *Shigella* deliver an effector proteins to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *EMBO J.* 21: 2923-2935.
3. Mimuro, H., Suzuki, T., Takaka, J., Asahi, M., Haas, R., and Sasakawa, C. 2002. Grb2 is a key

- mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. Mol Cell. 10: 745–755.
4. Ogawa, M., Suzuki, T., Tatsuno, I., Abe, H., and Sasakawa, C. 2003. IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity. Mol. Microbiol. 48: 913–931.
 5. Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H., and Sasakawa, C. 2003. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. Cell. Microbiol. 5: 395–404.
 6. Jang, M.H., Kweon, M.N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Pennert, P.D., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., and Kiyono, H. 2004. Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
 7. Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. 2005. Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy. Science 307: 727–731.
 8. Suzuki, T., Nakanishi, K., Tsutsui, H., Iwai, H., Akira, S., Inohara, N., Chamaillard, M., Nunez, G., and Sasakawa, C. 2005. A novel caspase-1/Toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. J. Biol. Chem. In press.

学会発表 国際 1 件 国内 5 件
招待講演 国内シンポジウム 1 件