

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：病原微生物の宿主免疫系との共生戦略の解明による治療・制御法の開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

小安 重夫 (慶應義塾大学医学部 教授)

主たる共同研究者

笹川 千尋 (東京大学医科学研究所 教授)

矢原 一郎 ((株)医学生物学研究所 伊那研究所長)

3. 研究内容及び成果

病原微生物は宿主の免疫反応に巧みに干渉し、感染を成立・持続させる。本研究は、消化管、中でも胃と腸に炎症を起こすヘリコバクターピロリと病原性大腸菌(EPEC)を主な対象とし、病原因子と宿主免疫担当細胞、特に樹状細胞と肥満細胞との相互作用に注目し、その解析を通じて、病原微生物の共生戦略と宿主の感染防御戦略の分子機構を解明することを目指した。そして、その成果を基に新たな感染制御法の開発を目指した。

(1) ヘリコバクターによる胃炎の発症機構の解明(小安グループ)

明確なリンパ組織が存在しない胃においてどのような分子機構で抗原特異的な T 細胞の活性化が誘導されるかは全く不明であったが、様々なマウスを用いた実験から、T 細胞感作には腸管のパイエル板が必要であることが明らかになった。ヘリコバクターは貪食に抵抗することが知られる。しかし、嫌気性条件下ではラセン状から球状に形態を変化し、球状菌は容易に樹状細胞によって貪食された。小腸結紮モデルを用いて精査したところ、腸管内に接種したラセン状ヘリコバクターは時間経過とともに球状化し、ラセン状菌は上皮の管腔側に留まるのに対し、パイエル板から樹状細胞に取り込まれた菌体は球状化していることが示された。これらのことから、ヘリコバクターは微好気性の胃においてはラセン状を保つが、腸管へ移行した場合にはラセン状から球状へ変化し、パイエル板経由で樹状細胞に取り込まれ宿主免疫系を活性化すると結論された。活性化された CD4 陽性 T 細胞が胃上皮へ浸潤し、さらに抗原特異的にケモカインを生産することで好中球がさらに浸潤し、胃炎が発症すると考えられる。

(2) EPEC の感染戦略の解明(小安グループ、笹川グループ)

EPEC は III 型分泌装置を介して宿主細胞内に様々なエフェクター分子を注入し、宿主細胞の性質に変化を与えることが知られるが、感染時に宿主側で Th1 反応が優位に起こる場合には定着増殖して炎症や下痢などの症状が誘導される。興味深いことに、EPEC はマクロファージと共培養した場合、TLR 刺激で活性化された PI3K の下流に位置する Akt が速やかに不活化されることが報告されていた。研究代表者らはこれまでに、PI3K が樹状細胞からのインターロイキン(IL)-12の発現を負に制御することを明らかにしてきた。IL-12はTh1反応の起動に必須のサイトカインである。これらの事実から、我々は「EPECが樹状細胞のPI3K活性を抑制することでIL-12の発現を亢進し、自らに有利なTh1反応を誘導する戦略をとる」という仮説を立てた。

樹状細胞とEPECを共培養すると、PI3Kの下流に位置するAktは一旦リン酸化されるものの速やかに脱リン酸化された。III型分泌装置から注入されるエフェクターの一つであるEspHの変異体においてはこの脱リン酸化が障害されていた。これと並行し、感染後の樹状細胞におけるIL-12の発現は野生型のEPECの場合に高く、IL-10の発現は低いのに対し、*espH*変異株の感染ではIL-12の発現は低く、IL-10の発現が亢進した。そこでマウスのEPECである*C. rodentium*の*espH*変異体を作製してマウスに感染させたところ、*espH*変異体では野

生型の *C. rodentium* と比較して菌の定着が低く、炎症も軽微であり、感染性が低下することが明らかになった。この際に、腸間膜リンパ節由来の細胞を用いた二次免疫応答において インターフェロン(IFN)の生産が低下しており、Th1 反応の低下が確認された。興味深いことに、同じ *espH* 変異体を PI3K 欠損マウスに感染させた場合には、病勢は野生型の *C. rodentium* を感染させた場合とほとんど差はなく、野生型も変異体もほぼ同程度の増殖・定着が見られ、EPEC が PI3K を標的とするという解釈と矛盾しない結果が得られた。これらの実験結果は、我々の仮説を支持する。

(3) 樹状細胞における PI3K 経路の精査

樹状細胞を用い、TLR 刺激によって活性化される PI3K 経路の下流を精査した。その結果、Akt の下流において 2通りのシグナル伝達経路が IL-12 の発現を制御することが明らかになった。1 つは Akt によって活性が正に制御される mTOR である。IL-10 は IL-12 発現を抑制する機能を持つことが知られる。mTOR は IL-10 の発現を正に制御しており、IL-10 がオートクリンに作用することで IL-12 の発現を間接的に抑制することが明らかになった。一方、Akt の別の基質である GSK3 は IL-10 とは独立に IL-12 の発現を正に制御することが示された。GSK3 は Akt によってリン酸化されることで活性が抑制される。ゆえに PI3K を阻害することで GSK3 の活性が上昇し、IL-12 の発現が亢進されると理解された。

(4) 病原細菌の感染戦略の理解に基づく治療法の開発: PI3K 経路への干渉による EPEC の感染制御(小安グループ)

樹状細胞における PI3K 経路の解析結果から、IL-12 の発現を人為的に制御する方法が浮かび上がった。すなわち、mTOR を阻害することで IL-12 の発現を亢進することができる一方で、GSK3 を阻害することで IL-12 の発現を抑制できる。

EPEC による Th1 反応の亢進という戦略に対して Th1 反応を抑制する方向で対抗するために、GSK3 の阻害剤であり、かつ精神科領域で実際に臨床において用いられるリチウムに注目した。野生型の *C. rodentium* を感染させて3日後から飲水中に炭酸リチウムを添加したところ、その3日後には菌の定着が対照に比較して有意に低く、炎症も軽微であり、感染性が低下することが明らかになった。腸間膜リンパ節由来の細胞を用いた二次免疫応答において IFN の生産が低下しており、Th1 反応の低下が確認された。したがって、PI3K 経路への干渉で Th1 反応を制御することで EPEC の感染制御が可能になると考えられる。

一方、*in vitro* で Rapamycin が Th1 反応を亢進することが明らかになり、これは将来的にはがん治療における樹状細胞療法などに応用できる可能性が示された。

(5) 樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの分子機構の解明と抗原提示の増強を介した効率の良い免疫賦活化法の開発(矢原グループ)

細胞傷害性T細胞は CD8 陽性の T 細胞から分化するが、そのためには微生物抗原の MHC クラス I 経路への抗原提示が重要である。樹状細胞は細胞外から取り込んだ抗原を MHC クラス II 経路のみならず MHC クラス I 経路へも提示するというクロスプレゼンテーションの能力を持つことが特徴である。本研究から、クロスプレゼンテーションでは樹状細胞は貪食などによって取り込んだ抗原を小胞体における小胞体品質管理機構 (Endoplasmic reticulum-associated degradation: ERAD) を介して細胞質内へ輸送した後に分解し、MHC クラス I に提示することを明らかにした。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

病原細菌、特に EPEC, ヘリコバクターピロリの感染に伴う宿主の免疫応答について、PI3K 経路を中心に解析し、着実に成果を出している。PI3キナーゼが感染免疫系を干渉することを示した点は評価したい。PI3キナーゼは生体制御系に必須であるので、得られている EPEC 感染結果が宿主免疫系のみの影響なのか結論するのが困難であり、アプローチの仕方に独創性を感じない。これらの研究成果は、論文(海外 27 件)、総説(海外 8 件)、学会発表(海外 8 件、国内 70 件)、招待講演(海外 25 件、国内 9 件)として発表された。Nat. Immunol., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., J. Exp. Med.等の質の高い国際誌や国際会議で成果が発表された。また、国内 3 件、海外 2 件の特許申請を行い、知財の確保に努めた。

下記はその中の特筆すべきものである。

- 1) 胃に定着するヘリコバクターピロリに対する免疫反応の開始に腸管のパイエル板が必要であること、胃と腸の免疫系にクロストークが存在することを明らかにした。
- 2) 免疫担当細胞における PI3K の機能を精査した。樹状細胞においては、PI3K 経路が IL-12 の発現を負に制御することを明らかにした。B細胞における PI3K の機能は、従来いわれていた Btk の活性化ではなく、NF- κ B 経路の活性化であることを明らかにした。
- 3) 腸管病原性大腸菌は、宿主の PI3K 経路を抑制し、自らに有利な Th1 環境に誘導する。この宿主の PI3K 経路に干渉して Th1 誘導を抑える方法を開発し、新しい治療法の可能性を示した。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

PI3キナーゼの免疫系における役割に関する研究成果は評価したい。病原微生物の宿主免疫系との共生をPI3キナーゼに限局して研究を展開している点から、科学的、技術的インパクトがでにくい。微生物サイドからの研究を進めることが重要であり、今後の展開を期待したい。

腸管病原性大腸菌に対する新たな治療法を提案し、特許申請も行なわれた。また、本研究で明らかになった PI3K下流への人為的干渉は広く免疫制御に利用できる可能性があり、今後癌に対する樹状細胞療法などへの応用を見据えた研究の発展を期待したい。耐性菌の問題が深刻になる中で抗生物質とは別の方向からの制御法として今後の進展を期待したい。ヘリコバクターピロリの研究からは、球状菌が胃炎を起こすことなくパイエル板から効率良く取り込まれることから、ドラッグデリバリーやワクチンの新たなキャリアーとしての可能性が示された。

4-3. その他の特記事項

本研究を通じて多くの若手研究者、技術者が育成された。小安グループの慶應義塾大学医学部専任講師の松田達志は関西医科大学の独立准教授、笹川グループの東京大学医科学研究所講師の鈴木敏彦は琉球大学医学部の教授に、矢原グループの今井純(特別研究講師として慶應義塾大学医学部に所属)は高崎健康福祉大学の助教授に栄転した。

小安グループの永井重徳慶應義塾大学医学部助教は本プロジェクトのヘリコバクターピロリの研究のよって「上原H. pylori優秀賞」を受賞した。