

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

研究課題
「病原細菌の粘膜感染と宿主免疫反応抑制機構の
解明とその応用」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

研究代表者：笹川 千尋
(東京大学医科学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

1. 研究実施の概要

研究の背景とねらい

病原細菌が粘膜感染を成立させるためには、菌と粘膜上皮の一連の相互作用が円滑に進行するとともに、その間に誘導されるさまざまな生体防御反応と対峙する必要がある。感染初期に病原体の侵入を認識し増殖を阻止する自然免疫系とそれに続き発動される獲得免疫系の起動は、生体側にとって感染を効果的に阻止するとともに免疫記憶を誘導するためにも不可欠な機能であるが、赤痢菌をはじめとする粘膜病原細菌は、感染を持続・拡大するために、その反応を抑制あるいは回避する能力を備えている。

粘膜上皮へ密着あるいは侵入する腸管病原性大腸菌や赤痢菌は、その感染に必要な宿主機能を誘導する過程で、さまざまなシグナル経路を刺激する。また赤痢菌等の侵入性細菌では、菌は細胞内で増殖する過程でさまざまな菌体成分を細胞質へ遊離する結果、自然免疫系を活性化する。したがって、菌の感染は宿主に強い炎症応答を誘導し、粘膜はその恒常性維持機構に異常が発生したことを周囲に警告するとともに、生体防御に必要な一連の免疫系の発動を促す。したがって、病原細菌が感染の初期に免疫反応の開始を一時的に抑制することは、粘膜感染を成立させるために極めて重要な要件となる。本研究ではこのような背景から、赤痢菌をモデルに病原細菌の腸粘膜バリアー感染と免疫抑制という、感染成立の鍵となる二つの重要な局面における病原因子と宿主因子の相互作用を解明し、粘膜病原細菌の感染戦略の理解に新たな視点を導入する。

成果の概要

本研究では、赤痢菌をモデルに、病原細菌の腸粘膜バリアーへの感染における普遍的な感染現象を発見し、その知見をワクチンや感染動物モデルの開発へ応用することを目的とした。本研究では、細胞生物学的手法を基盤に、赤痢菌の III 型分泌装置を通じて宿主細胞へ分泌する一群のエフェクターに注目して、腸上皮細胞への感染に関わるエフェクターとその標的となる宿主因子を同定し、それらの相互作用の感染に果たす役割の解明を行なった。また同様に、赤痢菌の生体防御・自然免疫抑制・回避に関わるエフェクターおよびその標的となる宿主炎症・免疫シグナルを同定し、菌とオートファジーの攻防、および炎症応答抑制機構の解明を行なった。さらに、これらの知見を利用して弱毒化赤痢ワクチンおよび感染モデル動物の開発を行なった。以下に実施した研究およびその成果の概要を述べる。

1. 赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究

赤痢菌は極性化した腸上皮細胞の側底面に大規模なラッフル膜（貪食様運動）を誘起して細胞へ侵入する。本研究では、本菌の上皮細胞侵入に係る菌の III 型分泌装置（以下 TTSS と略す）から分泌される IpgB1、IpgB2 および VirA に関して、各々細胞侵入と

細胞内拡散における新たな役割を見いだした。IpgB1 は ELM0-Dock180 と機能的な結合を行ない、Rac1 を活性化して菌の細胞侵入に不可欠な大規模なラッフル膜の形成に中心的な役割を果たしていることが明らかとなった (JBC, 2005; Nat. Cell Biol, 2007)。一方、IpgB2 は IpgB1 機能と拮抗する活性を有し、IpgB1 により形成されたラッフルの終結に関わる新たな役割を担っていた (未発表)。興味あることに、いずれのエフェクターもその役割を終えると同時にプロテアソーム依存的な分解を受けていた (未発表)。VirA は細胞質においてアクチン重合により運動する菌から TTSS を通じて菌体表面へ分泌され、VirA の微小管崩壊活性を通じて、菌の移動に障害となる微小管を破壊して菌の円滑な移動を助けていることを明らかにした (Science, 2006)。これら一連の研究により、赤痢菌の上皮細胞への侵入と細胞間拡散に関わる主要なエフェクターの機能を同定するとともに、それらの分子機構を明らかにした (Nat Rev. Microbiol, 2008)。

2. 免疫抑制、生体防御回避に関わるエフェクターの研究

2-1. 炎症抑制

赤痢菌の腸粘膜への感染は強い炎症を誘導する。赤痢菌はマクロファージへ侵入すると、食胞を破壊して細胞質で分裂・増殖する。この過程で菌体から遊離するLPSを含む菌体成分は、IpaF (CARD12)-inflammasomeの活性化を介してカスパーゼ-1を活性化する。一方上皮細胞内では、菌体から遊離したペプチドグリカンがNod1-RICKを活性化し下流でMAPK及びNF- κ Bを活性化する。その結果、炎症性サイトカイン、ケモカイン、及び抗菌性ペプチドの産生が誘導される。この炎症・免疫応答は、生体防御機構および自然免疫系を活性化させ菌の排除に働く。これに対抗して赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌は、自然免疫を回避あるいは抑制するためにさまざまな因子 (エフェクター、分泌性毒素等) を分泌する。赤痢菌は、病原細菌の中でこれに関連するエフェクターを最も多数分泌する。本研究では、赤痢菌属に共通に存在する220-kbプラスミドと染色体上には、互いに相同性の高い3個 (*ipaH9.8*, *ipaH7.8*, *ipaH4.5*) と7個 (*ipaH0722*, *ipaH1383*, *ipaH1880*, *ipaH2610*, *ipaH0887*, *ipaH2022*, *ipaH2202*) の *ipaH* 遺伝子が各々存在し、いずれもTTSSを通じて分泌されていることを明らかにした (Mol. Microbiol, 2007)。一方、他のグループよりIpaH9.8はE3リガーゼ活性をもつことが報告された。そこで本研究ではIpaH9.8に焦点を絞りその役割を精査した。菌から分泌されたIpaH9.8は最終的に細胞質と核の両方に局在した。IpaH9.8は、細胞質でNF- κ Bの活性を制御するIKK複合体を標的にNEMO/IL-1 γ およびABIN1と結合する一方 (論文投稿中)、核内ではスプライシングファクターの一つ (U2AF³⁵) へ結合して (BBRC, 2005)、NEMOおよびU2AF³⁵をユビキチン化してプロテアソーム依存的な分解を促進した (未発表)。その結果、炎症性サイトカインを含む多数の遺伝子発現が抑制された。これらの結果より、IpaH9.8 (およびIpaHファミリー) は、炎症応答の抑制に中心的な役割を担うエフェクターであることが明らかとなった。

2-2. オートファジー回避

細胞質へ侵入した菌は、オートファジーにより認識され最終的にオートファゴソームにより分解される。赤痢菌とリステリア・モノサイトゲネスは、アクチンを重合して細胞内を運動して周囲の細胞へ拡散する。いずれの菌も一旦はオートファジーにより認識されるが、それを巧みに回避し生存することができる。本研究では、赤痢菌がTTSSを通じて分泌するIcsBが、オートファジーの回避に不可欠なエフェクターであることを示すとともに、本菌のアクチン重合を誘導するVirGがオートファジーの標的となることを明らかにした (Science, 2005)。一方、リステリアでは、アクチン重合を誘導するActAがオートファジーの回避に不可欠であることを見いだした。リステリアのActAは菌体表面に発現し、これが宿主のアクチン重合を行なうタンパク質であるArp2/3およびVASPタンパク質と結合する。その結果、菌体表面が宿主タンパク質で覆われ、オートファジーによる認識が攪乱されることを見いだした。(論文投稿中)。本研究では、粘膜バリアーへ侵入し増殖・拡散する代表的な二つの病原細菌が、いずれもオートファジーによる異物認識機構を巧みに回避する高度なシステムを備え、それが感染成立に極めて重要であることを初めて示した。

2-3. 上皮細胞維持

腸粘膜上皮は数日の周期で再生と剥離を繰り返すことにより、病原体の粘膜への定着を阻止する。また、感染を受けた細胞は基底膜より剥脱することにより、病原体を粘膜バリアーから取り除く。しかし赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌は、このような粘膜バリアー機能を回避して粘膜上皮を足場として定着する。本研究では、赤痢菌のTTSSから分泌されるIpaBは、腸前駆体細胞の核内へ移行し細胞周期調節を行なうAPC-Cdh1を負に抑制するMad2L2へ結合する結果、前駆体細胞の増殖を低下させていることを見いだした。この、陰窩における赤痢菌の腸管上皮前駆体細胞の増殖抑制は、ウサギグループ試験により腸管粘膜への菌の定着に重要であることが示された。赤痢菌はIpaBを通じて、腸管上皮細胞を増殖の足場として利用するために、感染後期において陰窩近傍の前駆体細胞の細胞増殖を制御する能力を有していることが示唆された (Cell, 2007)。

3. 赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用

3-1. 細胞死誘導

赤痢菌は、M細胞直下の常在マクロファージや樹状細胞へ侵入し、IpaBエフェクターを分泌してカスパーゼ-1を活性化する。これによって、マクロファージの細胞死を伴う強い炎症が局所に惹起される。しかし、*ipaB*欠損変異株をカスパーゼ-1ノックアウトマウス由来のマクロファージに感染させ、さらに菌を細胞質へ移行させると、最終的に野生株型マウス由来のマクロファージとほぼ同程度の細胞死が誘導された。この原因物質を精査した結果、リピドAを含む画分にその原因物質が含まれることが示唆された (JBC,

2005)。興味あることに、このリポD4画分により誘導される細胞死はTLR4にも依存しない。そこで、リポD4によるIpaB/カスパーゼ-1に非依存的なマクロファージ細胞死誘導に関わる宿主因子として、IpadfおよびASCの関与について各々の欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いて精査した。その結果、ASC欠損マウスにおいては、カスパーゼ-1の活性化は消失したものの依然として細胞死が誘導されていた (PLoS Pathogen, 2007)。

3-2. ワクチンへの応用

一般に細胞侵入能を保持している弱毒赤痢ワクチン株は、マクロファージに細胞死を誘導する結果、従来型ワクチンで認められた炎症（発熱、下痢といった副作用）の一原因と見なされていた。そこでマクロファージへの侵入能は保持するが、食胞から離脱不能となった弱毒赤痢変異株を作製して、低炎症性のより安全なワクチン株となるかを調べた。具体的には、赤痢菌の細胞侵入性欠損株 (*ipaB*) ヘエルシニアのインベイシン遺伝子 (*inv*) を導入した。インベイシンはM細胞表面の β 1-インテグリンに親和性を示し、菌はマクロファージに対する細胞侵入性を示したが、*ipaB* 遺伝子の欠損によりマクロファージの食胞から離脱できず、その結果マクロファージへ感染しても細胞死は全く誘導されなかった。この変異株をマクロファージへ感染させると、細胞死に伴って大量に分泌されるIL-1 β およびIL-18の産生は著しく低下した。インベイシン発現変異株による感染防御効果をマウス経鼻感染モデルで調べた結果、投与後の肺病理所見では中程度の好中球浸潤像がみられたが各種炎症性サイトカインの顕著な上昇は認められなかった。また病的症状、体重減少等の副作用も観察されなかった。一方、投与1ヶ月後の血清中および気管支肺洗浄液中の抗赤痢菌LPS-IgG、-IgA抗体価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高い防御効果が示された (J. Immunol. 2006)。

§ 2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

赤痢菌をはじめとするグラム陰性病原細菌に広く分布しているIII型分泌装置を通じて分泌される一群のエフェクターは、感染のさまざまな局面で重要な役割を演じていることが次第に明らかとなってきた。そこで本研究では赤痢菌のエフェクターに注目し、それらが感染成立に果たす役割を明らかにして、新たな感染現象を発見するとともに、それらの知見を応用して、安全な赤痢ワクチン等新しい治療・制御法の確立を目指して以下4つの研究項目を計画した。(1)赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究、(2)免疫抑制、生体防御回避に関わる赤痢菌のエフェクターの研究、(3)赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用。(4)動物感染モデルの開発。いずれも、本研究グループが主体となり、以下述べるような多くの研究者との共同研究により、ゲノミックス、プロテオミックス、細胞生物学、免疫学、生化学、感染病理学、動物感染モデル等を駆使して、細菌と宿主の両方から、菌の腸粘膜上皮の感染と宿主防御に関わる各々の因子の相互関係を、タンパク分子、細胞、組織、個体の各々のレベルで解明を実施した。

1. 赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究

本研究では、赤痢菌の粘膜上皮バリアーへ感染の開始において最も重要な細胞侵入機構の解明を計画し、九大生医研の福井教授との共同研究により、IpgB1はRhoG機能を擬態してELMO-Dock180-Rac1を活性化する新規な病原因子であることを明らかにした。また北里研究所の阿部教授らおよび医科研の片山教授との共同研究により、VirAによる微小管の崩壊活性を明らかにした(笹川グループの半田、Kim, 小川、鈴木(仁人)吉田らが担当)

2. 免疫抑制、生体防御回避に関わる赤痢菌のエフェクターの研究

菌の粘膜感染に対して宿主は炎症・免疫系を発動して対抗する。これに拮抗して、感染を成立させるために、赤痢菌はTTSSを通じてさらに幾つかのエフェクターを分泌する。本研究では、それらのエフェクターの一つIpaH9.8に焦点を絞り、その細胞内動態および免疫抑制に果たす役割について、細胞生物学的、免疫学的、および実験病理学的観点から解析を行なった。IpaH9.8は上皮細胞の細胞質および核へ移行し、核へ移行したIpaH9.8は、スプライシングファクターの一つ(U2AF³⁵)へ結合して炎症性サイトカインを含む多数の遺伝子発現を抑制する作用を示した。また、赤痢菌がこの能力を失うと炎症が亢進し、菌の定着が逆に低下した。即ち、粘膜感染において示される赤痢菌の炎症抑制は、菌の感染に必要な機能であることが示唆された。本研究の4年次以降は、細胞質内におけるIpaH9.8の役割を精査した。その結果、IpaH9.8はIKK複合体のIKK γ /NEMOへ結合してNF- κ Bの活性化を抑制することが明らかとなった。(笹川グループ、芦田、Kim、

豊留、奥田ら)

一方、本研究では細胞内へ侵入した赤痢菌がオートファジーによる認識を受けていること、およびその認識を菌は回避することを、現阪大微研の吉森教授らとの共同研究で明らかにした。一方、リステリアのオートファジー認識と回避機構の解明は、ドイツ Justus-Liebig大学のChakraborty教授らとの共同研究で実施した。(笹川グループの小川、吉川らが担当)

3. 赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用

本研究では、菌が誘導する細胞死はアポトーシスではなく、むしろネクロシス様の細胞死が誘導されていることを示した。またミシガン大学のNunez教授との共同研究で、赤痢菌の原因物質が菌体表面のリポドAを含む画分にあることを示した。本研究基盤を基に、新規な低炎症誘導型の弱毒赤痢ワクチンを作製した。(笹川グループの鈴木(敏彦)、三室、鈴木(志穂)、吉川らが担当)

その後の展開で生じた計画変更

4. 動物感染モデルの開発

本研究ではマウス経口感染において示される赤痢菌に対する非感受性の要因を明らかにして、本菌のヒト特異性規定因子を推定することを計画した。種々の遺伝子改変マウス(C57BL/6, C3H/HeN, C3H/HeJ, IL-5R KO, IL-1RA KO, AID KO等)を導入して、B群赤痢菌(YSH6000)およびそれにエルシニアのインベイン(β1-インテグリンと結合してM細胞への親和性を示す)を導入したYSH6000/Invの各々をGFPで可視化出来るようにした後、菌の経口感染および腸管ループ内接種を行なった。しかしながら、いずれのマウスの腸管粘膜内にも菌の定着はみとめられず、また赤痢菌のインベインの有無では体重減少、炎症病理像において有意な差は認められなかった。赤痢菌に対してマウス腸管が示す抵抗性の原因が、菌側にあるのか宿主側にあるのか以上の予備的実験では依然として不明であった。(笹川グループ、大屋、吉川ら)

そこで本研究では、韓国ソウルのInternational Vaccine InstituteのKweon部長らのグループと共同研究で、モルモットを麻酔で処理後、直腸よりさまざまな菌量(10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} CFU)の赤痢菌を注入した。感染2, 6, 12, 24, 48時間後の腸管組織内定着菌数および炎症病理像を調べた。その結果、いずれの菌量でも感染後24時間および48時間では、直腸粘膜内への定着とともに腸管組織に強い炎症が引き起こされていた。また、野生株を投与した個体では、体重減少、裏急後重(tenesmus)、肛門裏急後重(rectal tenesmus)、粘血性下痢等の、ヒトの細菌性赤痢に特徴的な症状を呈することが明らかとなった。一方、細胞侵入性を失った赤痢変異株では、これらの症状は全く見られず、また腸管組織の病理像も非感染の場合と同様であった。(笹川グループ、鈴木敏彦、小川、三室、吉川ら)

(2)実施体制

グループ名	研究代表者	所属機関・部署・役職名	研究題目
笹川グループ	笹川 千尋	東京大学・医科学研究所・教授	病原細菌の粘膜感染と宿主免疫反応抑制機構の解明とその応用

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 病原細菌の粘膜感染と宿主免疫反応抑制機構の解明とその応用 (東京大学医科学研究所、笹川千尋グループ)

本研究では、赤痢菌をモデルに粘膜病原細菌が腸粘膜バリアーへの感染において示す普遍的な感染現象および感染戦略を解明し、その知見をワクチンや感染動物モデルの開発へ応用することを計画した。具体的には、赤痢菌の III 型分泌装置 (Type III secretion system, TTSS と略) を通じて宿主細胞へ分泌する一群のエフェクター (病原因子の一種) に注目し、それらが細菌の感染成立に果たす役割を明らかにし、安全な赤痢ワクチン等の、新しい治療・制御法の確立を目指して、以下三つの研究項目を実施した。(1) 赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究、(2) 免疫抑制に関わる赤痢菌のエフェクターの研究、(3) 赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用。いずれも、本研究グループが主体となり、ゲノミクス、プロテオミクス、細胞生物学、免疫学、生化学、感染病理学、動物感染モデル等を駆使して、細菌と宿主の両方から、細菌の腸粘膜上皮の感染と宿主防御に関わる菌と宿主の各々の因子の相互関係を、タンパク分子、細胞、組織、個体の各々のレベルで解明を行なった。その結果、赤痢菌の腸上皮細胞への侵入に中心的な役割を担う新規な菌と宿主因子を同定し、その感染に果たす役割を解明した。また赤痢菌の生体防御機構および自然免疫応答の抑制ならびに回避に関わるエフェクターを同定し、細胞内における菌とオートファジーの攻防、および炎症応答抑制機構の一端を明らかにした。さらに、赤痢菌のマクロファージ感染により誘導される細胞死として新規な機構が介在することを示すとともに、この知見を利用して弱毒化赤痢ワクチンを作製した。

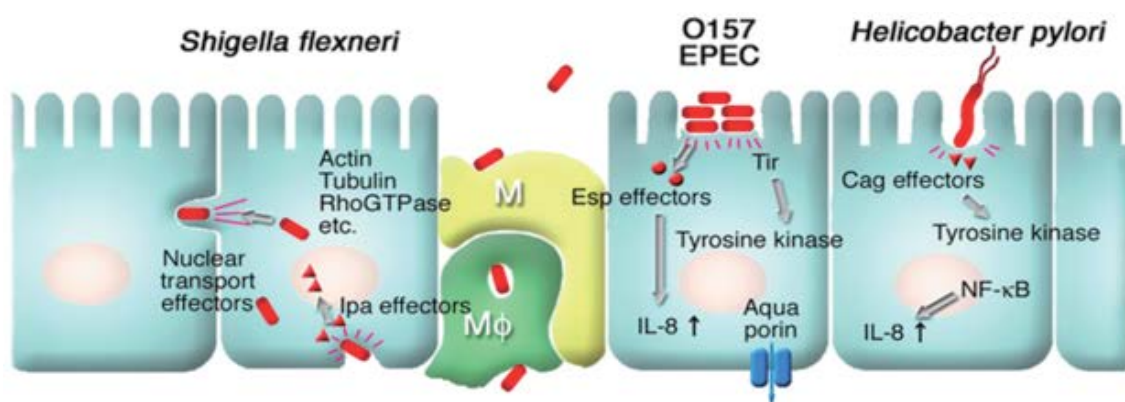
以下に、本研究で対象とする赤痢菌とそれにより引き起こされる細菌性赤痢について概略を述べ、その後具体的な研究内容および成果を示す。

細菌学的背景

赤痢菌により惹起される細菌性赤痢の主な症状は、発熱、下痢、粘血便、腹痛等で、特に乳幼児と高齢者では激症化し死亡率も高い。細菌性赤痢の発症は、我が国では輸入感染症として年間千例を数えるにすぎないが、開発途上国では乳幼児を中心に年間 1 億人以上の人々が罹患し、数十万人の人命が毎年奪われている。赤痢菌は胃酸に対して抵抗性があり、わずか 10-100 個の菌の摂取でも感染が成立する。したがって経済基盤が脆弱で衛生環境も劣悪な途上国では細菌性赤痢を防疫することは難しく、また抗生物質による治療にも限界があり有効なワクチンの開発が望まれている。しかし後述するように、赤痢菌の粘膜感染により強い炎症が誘導されるために、幼児に安全な弱毒ワクチンを作製することはいまだに容易ではない。

赤痢菌は大腸や直腸の孤立リンパ小節の円蓋部に散在する M 細胞から粘膜下へ侵入

する。菌はその直下の常在マクロファージへ侵入し、食胞を破り細胞質で増殖する。細胞外へ離脱した赤痢菌は周囲の吸収上皮細胞へ侵入し、再び細胞質で増殖しつつ菌体の一極でアクチン重合を誘導し細胞内を運動する。一部の菌は、形質膜から突起を形成し、突起の先端に包まれた赤痢菌は突起の挿入を通じて隣接細胞へ移行し細胞質で再び増殖を繰り返す。この過程で、マクロファージおよび上皮細胞から、各々 IL-1 β および IL-8 をはじめとする炎症性サイトカイン、ケモカインが分泌され、これに呼応して好中球をはじめとする炎症性細胞が粘膜固有層へ浸潤する。さらに活性化された好中球の一部は上皮細胞間の間隙から管腔側へも移動する。赤痢菌の一連の粘膜感染と細胞内増殖を通じて誘導される激しい炎症と粘膜バリアーの崩壊により、最終的に粘血性下痢（赤痢）が惹起される（図1）。



1. 赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究

1-1. 侵入

多くの病原細菌は宿主細胞へ侵入する。赤痢菌は極性化した腸上皮細胞の側底面に大規模なラッフル膜（食食様運動）を誘起して細胞へ侵入する。本研究グループは、本菌の上皮細胞侵入に必要なエフェクターとして、TTSS から分泌される IpaC が β 1-インテグリンへ結合し、そのシグナル伝達経路の下流で Rac1 を活性化して菌の侵入を促進することを示した (JEM 1996; 1997)。その後他のグループから、IpaB エフェクターが CD44 へ結合し細胞侵入を促進することが報告された。最近本研究グループは、本菌が TTSS を通じて上皮細胞内へ分泌する VirA エフェクターがチューブリンヘテロ 2 量体と結合して微小管 (MT) 崩壊をひきおこし、その MT 崩壊を通じて誘導される Rac1 の活性化がラッフル膜誘導を促進することを報告した (EMBO J, 2002; 2004)。しかし、これらのエフェクター遺伝子を欠損させた赤痢菌株は依然として低いレベルではあるが細胞侵入性を保持していた。即ちこれら以外のエフェクターが菌の細胞侵入に依然として関わっている事を暗示していた。

そこで本研究では、赤痢菌の感染初期に IpaB, IpaC, VirA 等とともに TTSS より分泌される IpgB1 に注目し、その細胞侵入における役割を調べた。ipgB1 遺伝子欠損赤痢株は、細胞侵入効率が野生株の半分にまで低下するとともに、菌の侵入部位に形成される

ラッフル膜の大きさも、野生株に比べて著しく縮小していた。また、IpgB1 を HeLa 細胞へ発現させると、Rac1 の活性化が誘導され、またラッフル形成が誘導された。以上のことから、IpgB1 は赤痢菌の細胞侵入に中心的な役割を果たすエフェクターであることが示唆された (JBC, 2005)。さらに IpgB1 依存的なラッフル形成の機序を調べるために、IpgB1 の標的宿主因子の探索を行なった。GST-IpgB1 を用いて HeLa 細胞中の結合タンパク質をプルダウンアッセイ法により探索した結果、IpgB1 は ELMO に結合した。ELMO は、これに RhoG が結合すると ELMO-Dock180 複合体が形成され、活性化された Dock180 は GEF (GTP-exchange factor) として Rac1 を活性化し、細胞運動や貪食が誘導されることが知られている。そこで赤痢菌感染細胞あるいは IpgB1 発現細胞に誘導される大規模なラッフル膜を蛍光顕微鏡で精査したところ、IpgB1、ELMO、Dock180 のいずれもがラッフル膜付近に共局在していることが認められた。また ELMO および Dock180 の各々のドミナントネガティブ変異体、あるいは各々の遺伝子発現を特異的に抑制する siRNA を導入した細胞では、赤痢菌の侵入効率およびラッフル膜形成がいずれも顕著に抑制された。IpgB1 を ELMO に結合させたキメラタンパク質は、RhoG と同様に、ELMO-Dock180 複合体を膜へ移行させ、またこれに伴いラッフル膜が誘導されたことから、IpgB1 は RhoG 機能を代行して ELMO-Dock180 を活性化し、これにより Rac1 の活性化を通じて大規模なラッフル膜の形成を誘導していることが示唆された (図 2) (Nat. Cell Biol, 2007)。これら本グループの一連の研究により、赤痢菌の上皮細胞侵入においては複数のエフェクター (IpgB1、VirA、IpaC、IpaB) と宿主因子の相互作用による相乗的な作用により Rac1 の活性化が行なわれ、その結果貪食が誘導されていることが明らかとなった (Nat. Rev. Microbiol, 2008)。

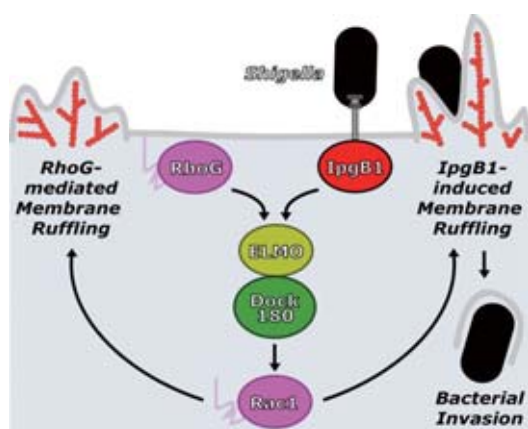


図 2. 赤痢菌の IpgB1 による ELMO-Dock180 複合体の活性化とラッフル膜誘導
RhoG を活性化すると貪食や細胞運動に伴いラッフル膜が誘導される。活性型 RhoG は ELMO-Dock180 と結合して、これにより活性化された Dock180 が GEF として作用し Rac1 を活性化する。その結果、最終的にアクチン重合化が引き起こされる。赤痢菌の IpgB1 は、RhoG の機能を代行して局所に大規模なラッフル膜を誘導して細胞内へ侵入する

(Nat. Cell Biol, 2007)。

1-2. 拡散

赤痢菌は宿主細胞中で分裂とともに菌体の一端にアクチンを重合して運動する。運動する菌は隣接細胞へ拡散し、分裂・増殖を再び行なう。これを繰り返す事により、菌は腸上皮細胞間で水平に感染を拡大することができる。赤痢菌の場合、菌が細胞質で分裂・増殖すると、菌体の一極に外膜タンパク質の一つ VirG(IcsA)が集積し、最終的に VirG-N-WASP-Arp2/3 複合体が形成される。この結果、菌体の一端でアクチン重合が誘導されその反動により菌は移動する (Cell, 1986, JBC, 1995, 1996, JEM, 2000)。赤痢菌をはじめリステリア・モノサイトゲネスおよび多くの細菌もアクチン重合を利用して細胞内運動を行なう。いずれも、菌が隣接する周囲の上皮細胞あるいはマクロファージ、単球、樹状細胞へ感染を拡大するために不可欠なメカニズムである。赤痢菌のアクチン重合に依存した細胞内運動は、したがって *virG* 遺伝子を欠損させると完全に消失する。本研究では、細胞質中を移動する赤痢菌の動態を蛍光顕微鏡下で細胞骨格との関係で精査したところ、微小管 (MT) ネットワーク構造が菌の移動に対する物理的な障害となっていることを見いだした。しかし興味あることに、運動する赤痢菌は MT を破壊しながら細胞質を移動していた。この MT の破壊活性は、すでに我々のグループから赤痢菌が TTSS より分泌する VirA にあることが報告されていたために (EMBO J, 2002)、*virA* 欠損株について細胞質中の運動性について調べた。その結果、赤痢菌は VirG に依存したアクチン重合が完全でも、*virA* 遺伝子を欠損した変異株では、菌の細胞内移動が著しく低下し、その結果、菌の細胞間拡散も不能となった。フリーズフラクチャー法による電子顕微鏡および共焦点顕微鏡で細胞内の赤痢菌の運動と細胞骨格との関係を詳細に解析したところ、赤痢菌は VirA を分泌し、その MT 崩壊活性を利用して周囲の MT を破壊しながら移動していることが示唆された (図 3) (Science, 2006)。MT による細胞内運動の障害はリステリア・モノサイトゲネスでも同様に認められることから (未発表データ)、細胞内で運動する病原菌による MT 崩壊活性は菌の細胞内移動に普遍的な機能であるかもしれない。

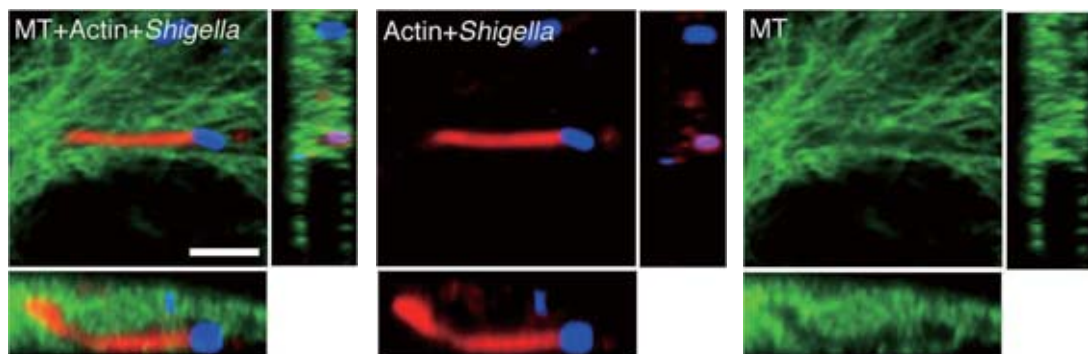


図 3. COS-7 細胞内を移動する赤痢菌による微小管破壊

赤痢菌（青）、F-アクチン（赤）、微小管（緑）を各々免疫蛍光染色により可視化した。右端の図は移動した菌体に沿って破壊された微小管が示されている（右端図）。

2. 免疫抑制に関わるエフェクターの研究

2-1. 炎症抑制と定着促進

赤痢菌の腸粘膜への感染は強い炎症を誘導する。赤痢菌はマクロファージへ侵入すると、食胞を破壊して細胞質で分裂・増殖する。この過程で菌体から遊離するLPSを含む菌体成分は、PAMPs(pathogen-associated molecular patterns)としてIpaB(CARD12) inflammasomeを活性化し、その下流でカスパーゼ-1を活性化する。一方上皮細胞内でも、菌体から遊離したペプチドグリカンがNod1(CARD4)により認識され、Nod1-RICKを活性化してその下流でMAPK経路及びNF- κ Bを活性化する。その結果、赤痢菌の感染により炎症性サイトカイン、ケモカイン、及び抗菌性ペプチドの産生が誘導される。この炎症・免疫応答は、生体防御機構および自然免疫系を活性化させ、菌の排除に働く。赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌は、これを回避あるいは抑制するためにさまざまな因子（エフェクター、分泌性毒素等）を分泌して対抗する。しかし、これら病原細菌の分泌する因子の標的となる宿主細胞およびその細胞内標的タンパク質あるいは炎症シグナルは不明な点が多い。これらの背景から、本研究では炎症抑制に関わるエフェクターおよびその標的宿主因子を同定し、その炎症抑制機構を解明することを行なった。

本研究で用いたB群赤痢菌(YSH6000株)には、220-kbプラスミドと染色体上に、互いに相同性の高い各々3個（*ipaH9.8*, *ipaH7.8*, *ipaH4.5*）と7個（*ipaH0722*, *ipaH1383*, *ipaH1880*, *ipaH2610*, *ipaH0887*, *ipaH2022*, *ipaH2202*）の合計10個の*ipaH*遺伝子が存在した（Mol Microbiol, 2006）。本研究グループは、以前にこのなかの一つIpaH9.8が細胞内において赤痢菌からTTSSを通じて分泌され最終的に細胞質および核に局在することを報告した（JBC, 2001）。本研究では、IpaH9.8とともに、IpaH7.8, IpaH4.5, IpaH0722, IpaH1383, IpaH1880, IpaH2610, IpaH0887, IpaH2022, IpaH2202 もTTSSを通じて分泌されるエフェクターであることを示唆した。これら全ての遺伝子を欠損させた変異株を作製し、その欠損変異株をマウスに経鼻感染させ、肺組織における炎症応答および定着率を野生株と比較した。その結果、欠損変異株は野生株に比べてより強い炎症を惹起したが、逆に菌の肺組織への定着率は有意に低下した（Mol. Microbiol, 2006）。これらの結果は、IpaHファミリーが炎症を抑制する役割を担っていることを強く示唆していた。そこで本研究ではIpaH9.8に焦点を絞り、本エフェクターの炎症抑制メカニズムを詳細に調べた。

赤痢菌から分泌されたIpaH9.8は、最終的に細胞質と核に局在した。IpaH9.8の核内での役割を解明する目的で、IpaH9.8の宿主結合因子をtwo-hybrid法で検索した。その結果、IpaH9.8はスプライシングファクターの一つであるU2AF³⁵へ特異的に結合する性質を持つことが明らかとなった。IpaH9.8とU2AF³⁵の結合は、U2AF³⁵に依存したスプライシン

グを阻害し、その程度はIpaH9.8の濃度に依存的であった。また、IpaH9.8を細胞内で過剰発現させると、宿主細胞は死滅するが、適度な量の発現により宿主細胞の炎症性サイトカインをはじめとする多くの遺伝子発現が抑制された。また、*ipaH9.8*欠損赤痢株を親株とともに、マウスへ経鼻感染させ肺炎病理像を比較すると、*ipaH9.8*欠損株の感染マウスでは野生株とくらべ炎症がより亢進した。また、肺組織への白血球の浸潤の程度および組織のミエロパーオキシダーゼの量も、*ipaH9.8*欠損株の感染マウスでは野生株より有意に増加していた。しかし、肺組織への菌の定着は、*ipaH9.8*欠損株は野生株と比べ10分の1以下であった。これらの結果より、IpaH9.8は菌の感染で誘導される炎症を適度に抑制するエフェクターであることを明らかにすることができた (BBRC, 2005)。

一方細胞質に存在するIpaH9.8の役割を解明する目的で、two-hybrid法で標的宿主分子の探索を行なった結果、IpaH9.8はNF- κ Bの活性を制御するIKK複合体のNEMO/IL1 γ およびABIN-1へ結合する能力を示した。NEMOは無刺激細胞中では、IKK α およびIKK β とIKK複合体を形成し、IKK α のリン酸化を抑制してNF- κ Bの活性化を抑制している。しかし、TNF, TCR, IL-1等の刺激により、NEMOがK63 (ユビキチンの63番目のリジン残基) 依存的なユビキチン化を受けるとIKK複合体は活性化される。これにより下流でNF- κ Bが活性化される。活性化されたNF- κ Bのさらなる活性化を阻止するために、NF- κ BによりA20遺伝子が誘導され、産生されたA20は細胞内のIKK複合体のNEMO-ABIN-1へ結合して、NEMOのユビキチン鎖を脱分解する。その結果、NEMOは再び不活化型となり、不必要なNF- κ Bの活性化を抑止する (図4)。本研究開始後、IpaH9.8を含むIpaHファミリーは、E3リガーゼ活性を有することが国外から報告された。そこで、IpaH9.8のE3リガーゼ活性中心のアミノ酸残基 (337番目のシステイン) をアラニンに置換した変異体 (IpaH9.8CA) を作製し、野生型IpaH9.8とIpaH9.8CAの性状について比較を行なった。細胞質中のIpaH9.8は、赤痢菌の上皮細胞への感染においてNod1-RICK-NF- κ B経路の活性化に重要な、IKK複合体を標的とする新たなエフェクターであることが明らかとなった。既に述べたように、IpaH9.8はNEMOへ結合する。この結合に依存して、IpaH9.8はNEMOのユビキチン化を誘導したが、IpaH9.8CAにはその活性が認められなかった。興味あることに、IpaH9.8によるNEMOユビキチン化では、通常認められるユビキチンのK48 あるいはK63に代わって、K27 (27番目のリジン残基) に依存したユビキチン化が行なわれていた。その結果、IpaH9.8によりユビキチン化されたNEMOは、プロテアソーム依存的な分解を受け、NF- κ Bの活性化も抑制されていた。IpaH9.8によるNEMOのユビキチン化は、IpaH9.8のABIN-1との結合により促進されていた。また、IpaH9.8およびIpaH9.8CAを産生する赤痢菌株を作製し、マウスへ経鼻感染を行ない、肺組織の炎症病理像および菌の定着率を調べた。その結果、IpaH9.8CA産生赤痢菌株の感染肺は、野生型IpaH9.8産生赤痢感染肺にくらべ、炎症が亢進するとともに、肺組織のIL-1 β およびMPOのレベルも増加していた。しかし、肺組織への定着菌数は、野生型IpaH9.8産生赤痢菌がIpaH9.8CA産生赤痢菌と比べて有意に高いことが示された (論文投稿中)。以上より、IpaH9.8はNEMOを標的として、NEMO

のプロテアソームによる分解を誘導することによりNF- κ Bの活性化を抑制する、新たなタイプのエフェクターであることが明らかとなった (図4)。一方、最近になり、IpaH9.8はU2AF³⁵に対してもE3リガーゼ活性を示し、プロテアソームによる分解を促進していることが明らかになった (未発表)。したがって、IpaH9.8 (およびIpaHファミリー) は、炎症応答の抑制に中心的な役割を担うエフェクターであることが明らかとなった。

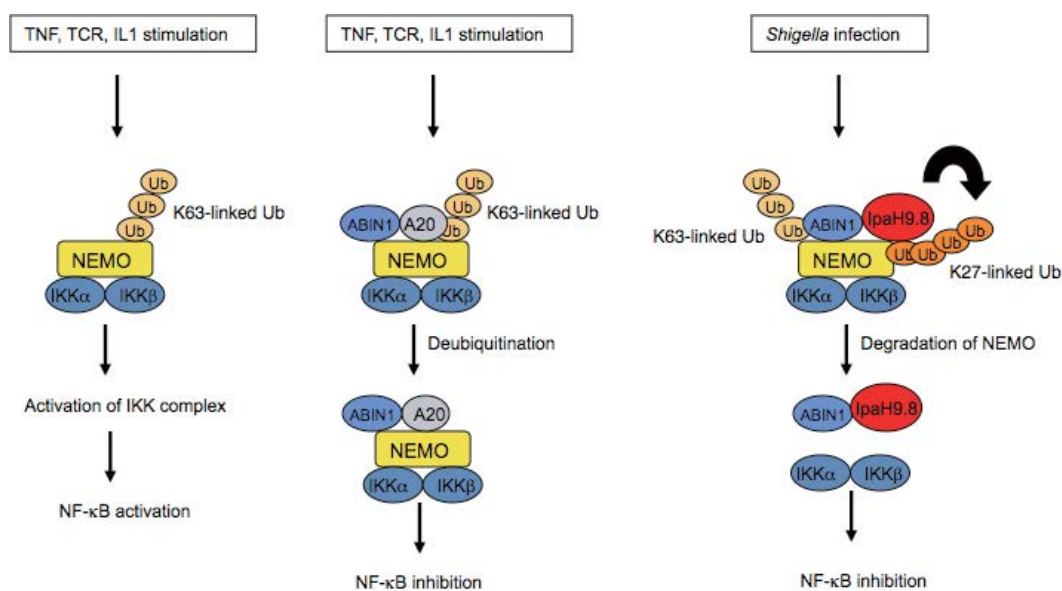


図4. IKK複合体は、NEMOのK63依存的なユビキチン化により活性化される。しかし、IpaH9.8がNEMOへ結合すると、IpaH9.8のE3リガーゼ活性によりNEMOがK27依存的にユビキチン化される。その結果、NEMOが分解されNF- κ Bの活性化が抑制される (芦田、未発表データ)。

2-2. 赤痢菌のオートファジーによる認識と菌の回避メカニズム

赤痢菌のエフェクター遺伝子の一つ、*icsB*を欠損させると菌は初期に上皮細胞内で増殖するが次第に死滅する (Mol. Microbiol, 2003)、また *icsB*変異株は細胞内に侵入数時間後には多層膜に囲まれ死滅していた。そこで、この変異株の細胞内動態を、リソソーム、オートファゴソーム等の細胞内オルガネラに特異的なマーカーで染色し野生株と比較した。また、*icsB*変異株の細胞内侵入後の動態を透過型電子顕微鏡により観察するとともに、LC3 (オートファジーの特異的なマーカータンパク質) の局在性を調べた。いずれも *icsB*変異株はオートファゴソームにより捕捉されることが示された。さらに種々のオートファジー形成阻害剤で細胞を処理すると *icsB*変異株の細胞内増殖能は回復した。*icsB*変異株をAtg5^{-/-}MEF (オートファジー誘導不能細胞) へ感染させると、*icsB*変異株も野生型赤痢菌と同様な細胞内増殖能を示した。オートファジーにより異物として認識される菌の表層タンパクを精査した結果、VirG (菌

がアクチン重合を誘導するために必要な外膜タンパク質)にその原因があることが判明した。この認識機構を調べた結果、オートファジー形成に必要な Atg5 が VirG へ直接結合する結果、何らかのメカニズムにより菌体周囲にオートファジーが誘導されることが示された。細胞内で野生型赤痢菌は TTSS を通じて IcsB 分泌し、その IcsB が VirG に対して Atg5 と競合的な結合を行なう結果、菌はオートファジーの認識を回避していることが明らかとなった (Science 2005) (図 5)。本研究では、粘膜バリアーへ侵入し増殖・拡散する菌がオートファジーによる異物認識機構を巧みに回避するシステムを備え、その機能が菌の感染成立にも極めて重要であることを例示した。

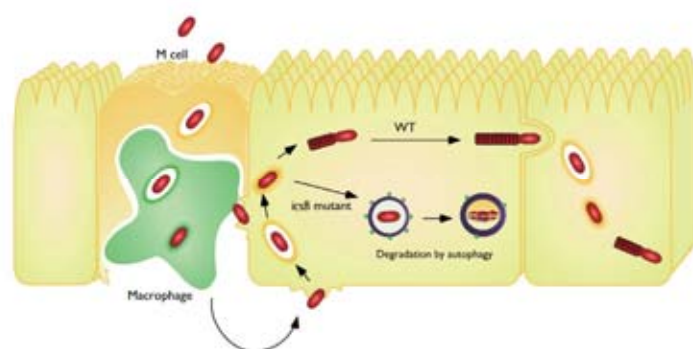


図 5. 上皮細胞内における赤痢菌によるオートファジー回避

吸収上皮細胞内へ侵入した赤痢菌は TTSS を通じて IcsB を分泌する。IcsB は直ちにオートファジーの標的となる菌表面の VirG へ結合する。その結果、VirG は Atg5 による結合とそれにより誘導されるオートファジーを回避することができる。IcsB 変異株では、VirG が Atg5 の結合によりオートファジーが誘導され最終的に菌を分解する。

赤痢菌の増殖に応答して誘導されるオートファジーは、Atg5 が菌体表層の VirG タンパク質を認識することによって引き起こされた。そこでオートファジーによる菌の認識機構をさらに理解する目的で、two-hybrid 法により Atg5 結合タンパク質の検索を行なった結果、Afp (Atg5 associating protein) という機能未知の宿主タンパク質が同定された。これまでの Afp の機能解析の結果、Afp は細胞内において Atg5 と特異的に会合し、また LC3 と同様に、Afp はオートファジー誘導を刺激すると斑状に細胞内に出現した。事実 *icsB* 変異赤痢菌の感染でも Afp は感染初期から菌体周囲に局在性を示し、また感染後期には菌を取り囲むオートファゴソームにも局在することが認められた (未発表)。現在、Afp 遺伝子を破壊したマウスを作製し、その MEF を利用して赤痢菌感染により誘導されるオートファジーにおける Afp の役割およびその誘導機構を解明する予定である。

2-3. リステリアのオートファジーによる認識と菌の回避

ActA タンパク質を菌体表面に分泌するリステリア・モノサイトゲネスが、宿主の Arp2/3 および VASP と直接結合し、これらの機能を通じて菌体の一極でアクチン重合を誘導する。これにより菌は細胞内を移動しさらに隣接細胞へ拡散する。また、本菌も赤痢菌と同様にオートファジーを回避することが報告され、さまざまなモデルが提唱されていたが、その実態は依然として不明であった。そこで本研究では、赤痢菌によるオートファジー回避とリステリアのオートファジー回避の特徴を知る目的で、リステリアに対するオートファジー認識および回避メカニズムを、細胞生物学的手法を用いて解析した。GFP-LC3 を安定発現させた MDCK 細胞を用いて、リステリア感染により誘導されるオートファジーの動態を蛍光顕微鏡および抗 LC3 抗体による免疫電顕で解析した結果、リステリアにより惹起されるオートファジーは、菌が ActA タンパク質を菌体表面に発現している場合には有意に低下していた。逆に ActA の菌体発現領域の大部分を欠失させた変異体を発現するリステリアでは、細胞内で菌体の周囲に LC3 が凝集していた。ActA の種々変異体 (in-frame deletion) のなかで、Arp2/3 および VASP の結合性を失ったものを発現する菌はオートファジーの回避も不能となった。それら ActA 変異体においては、オートファジー回避とアクチン重合による菌の運動性は必ずしも一致しなかった。即ち、リステリアの細胞内運動がオートファジーの回避の直接的なメカニズムではないことが強く示唆された。興味あることに、オートファジー回避が不能となった ActA を発現するリステリアは、細胞質中でユビキチンが表面に凝集し、またユビキチンに覆われた菌体は、p62 (ユビキチン結合タンパク質の一つで変性化した不溶性タンパク質の凝集塊を認識してオートファジーによる分解を促進する) および LC3 も同時に凝集した。即ち、ActA の宿主タンパク質 (Arp2/3 および VASP) 結合不能変異体は、宿主細胞中であたかも変性タンパク質凝集塊として、ユビキチン-p62-LC3 により認識され、最終的にオートファジーの分解を受けることが示唆された。この仮説を証明するために、変性タンパク質による凝集塊を人為的に形成するモデルとして用いられた GFP-170*を利用して、GFP-ActA-170*および GFP-ActA 欠損変異体-170*のキメラタンパク質を作製し、細胞で発現させた。いずれのキメラタンパク質も細胞内で斑状に存在することが可視化されたが、GFP-ActA-170*による斑状部位にはユビキチンおよび p62 の凝集が認められなかったが、GFP-ActA 欠損変異体-170*ではそれらの凝集が認められた。以上の結果を総合して、ActA によるリステリアのオートファジー回避は、ActA により菌体表面が宿主タンパク質で覆われることにより、菌体をあたかも自己の細胞小器官のように偽装することにより、オートファジーによる監視を回避していることが推定された。このようなリステリアの ActA を介したオートファジー回避機構は、赤痢菌の場合と全く異なり、ActA の性質を利用してオートファジーを巧みに回避する、ユニークなものであることが明らかとなった (論文投稿中)。

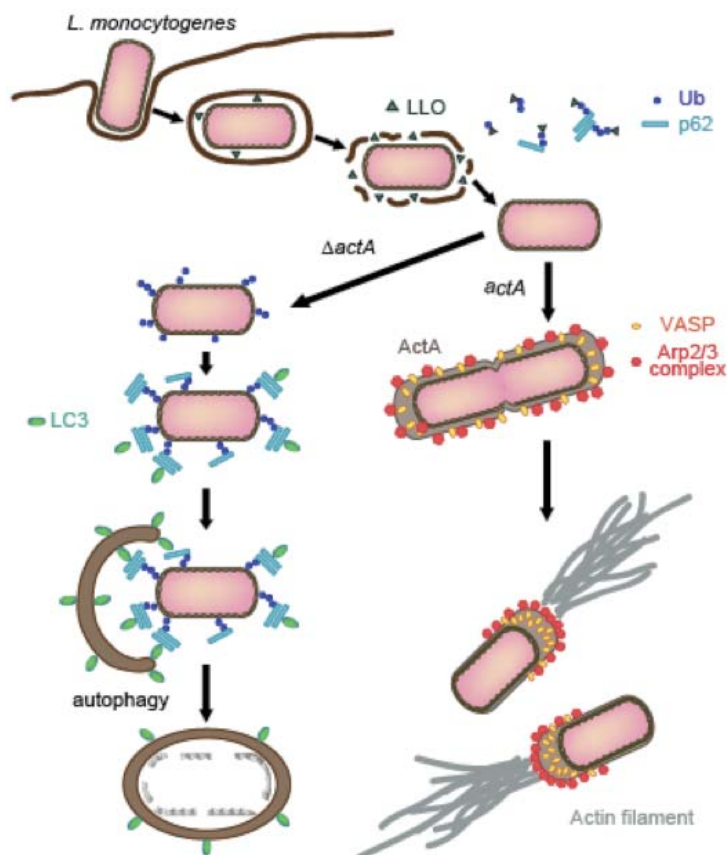


図6. リステリア・モノサイトゲネスによるオートファジー認識およびその回避モデル

ActA の発現がないと菌体表層成分がユビキチンおよび p62 により認識され、これにさらに LC3 が結合してオートファジーが誘導される。しかし、ActA が宿主タンパク質 Arp2/3 および VASP を結合した状態の菌体表面は、オートファジーにより認識されない (吉川、未発表データ)。

2-4. 感染細胞の足場としての維持戦略の解明

腸粘膜上皮は数日の周期で再生と剥離を繰り返す。この上皮細胞の再生と剥離 (ターンオーバーと呼ぶ) は、病原体の粘膜への定着を阻止するために重要な生体防御機構の一つとして知られる。さらに、菌の感染を受けた上皮細胞は、基底膜より速やかに剥離し菌の感染拡大を阻止する。しかし、赤痢菌をはじめとする多くの粘膜病原細菌はこのような粘膜上皮に固有の防御機構を巧みに回避して、そこを足場として効率よく感染・定着することができる。本研究では、これら粘膜上皮細胞の感染防御システムに対して、赤痢菌がどのようにしてそれを回避しているか、その戦略を解明することを計画し、以下に示す基本的に重要な二つの戦略を赤痢菌が備えていることを明らかにした。

(i) 赤痢菌による細胞周期抑制

赤痢菌の腸管感染の中期以降は、炎症により陰窩が開放され、その結果菌は陰窩底部にまで到達して上皮前駆体細胞へ侵入し細胞の増殖を抑制していることを見いだした。前駆体細胞へ侵入した赤痢菌は、TTSS を通じて IpaB を分泌する。IpaB の宿主標的分子を two-hybrid 法および免疫沈降法で調べたところ、IpaB は細胞周期調節に関わる APC-Cdh1 を負に抑制する Mad2L2 へ特異的に結合した。細胞内の菌から分泌された IpaB は Mad2L2 と結合し、細胞の核内へ移行し細胞周期を G2/M 期で停止していた。IpaB-Mad2L2 結合をサイクリン B1 崩壊およびユビキチン化アッセイ法で精査した結果、サイクリン B1 がユビキチン化され、その結果 APC-Cdh1 依存的なサイクリン B1 の分解が認められた。Mad2L2 への結合に必須な IpaB の 61 番目のアスパラギンをアラニンへ置換した変異体は、サイクリン B1 の分解および細胞周期抑制性が消失した。また赤痢菌をウサギ腸管ループへ接種すると、菌は感染後 12 時間後に陰窩近傍へ到達して腸管上皮前駆体細胞の増殖を抑制した。しかし IpaB の 61 番目のアラニン置換変異体を産生する変異株では、陰窩近傍へ到達するが前駆体細胞の増殖抑制は有意に低下した。さらに、IpaB 変異体を産生する赤痢菌株は、野生型赤痢菌に比べて、腸管への定着率が有意に低下していた。以上の結果から、赤痢菌は IpaB を通じて、ターンオーバーする腸管上皮細胞の寿命を延長する目的で、感染後期において陰窩近傍の前駆体細胞の細胞増殖を制御していることが明らかになった (Cell, 2007)。

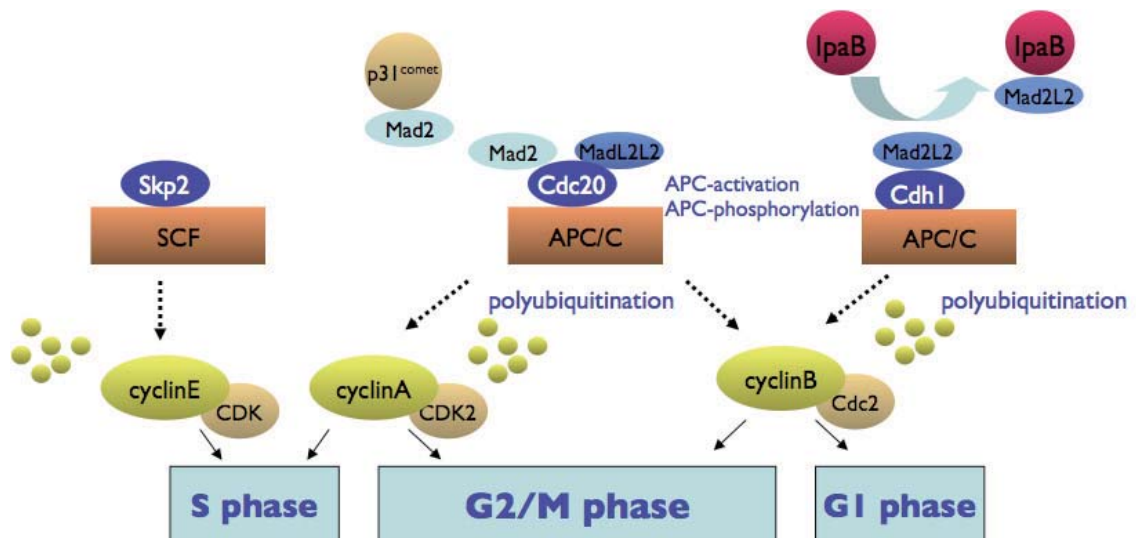


図 7. IpaB の Mad2L2 への結合による APC/C 複合体の脱制御が起こり、cyclinB1 がユビキチン化され分解される。その結果、細胞周期が G2/M 期で停止する。

(ii) 赤痢菌による上皮細胞剥離の阻止

上皮細胞を、フィブロネクチンをコートしたシャーレに単層培養させ赤痢菌を感染させると上皮細胞は最終的には球状化してシャーレから剥脱する。しかし、TTSS から分泌される OspE エフェクター遺伝子を欠損させた赤痢菌変異株は、野生株に比べて急速にシャーレから剥離することが知られていた (Miura et al., Infect Immun, 2006)。OspE とそのファミリーは、赤痢菌のみならず O157, EPEC, *Citrobacter rodentium*、サルモネラ等、TTSS を有する病原細菌からも産生・分泌されるエフェクターで、アミノ酸の一次配列の相同性も高く、したがってその機能が菌の感染に重要な役割を果たしていることが示唆されていた。本研究では、OspE の感染に果たす役割を解明するために、OspE の標的宿主分子の探索を行なった。その結果、OspE は Integrin-linked kinase (ILK) へ特異的に結合する能力を示し、OspE と ILK の結合により細胞接着斑形成が促進されるとともに、赤痢菌の感染において上皮細胞の基底膜からの剥離を抑制していた。OspE 遺伝子欠損変異株では、野生型に比べて、細胞接着斑形成が著しく低下し、その結果感染細胞のマトリックスへの接着が減弱していた。赤痢菌から TTSS を通じて分泌された OspE は、細胞接着部位に ILK、ビンキュリン、パキシリンとともに局在し、OspE の ILK への結合不能変異体ではそれが消失していた。OspE の細胞内発現により、細胞表面へ発現する β 1-インテグリンの量が増加するとともに、インテグリンのターンオーバーが抑制され、細胞接着能が亢進していた。OspE の ILK への結合により、ILK の膜親和性が増加していた。しかし OspE は、細胞接着斑においてインテグリンからのシグナル伝達に関わる、ILK 複合体の構成タンパク質 (パキシリン、Parvin, PINCH 等) の結合には影響はなかった。OspE の感染における役割を、本研究で確立したモルモット直腸感染モデルによって検証するために、野生型赤痢菌と OspE 遺伝子欠損株を各々感染させ、腸管の炎症病理像、菌定着率を精査した。その結果、OspE 欠損変異株では、炎症および菌の定着において野生株に比べ有意に低下していた。以上の結果より、赤痢菌は OspE の ILK への結合を通じて、感染細胞の基底膜より剥離することを積極的に抑制していることが明らかとなった (論文投稿中)。

3. 赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用

3-1. 細胞死誘導

赤痢菌は、M細胞直下の常在マクロファージや樹状細胞へ侵入し、IpaBエフェクターを分泌してカスパーゼ-1を活性化する。これによって、マクロファージの細胞死を伴う強い炎症が局所に惹起されることが報告されていた。しかし、*ipaB*欠損変異株をカスパーゼ-1ノックアウトマウス由来のマクロファージに感染させ、さらに菌を細胞質へ移行させると、若干の遅延が認められるものの、野生株マウス由来のマクロファージとほぼ同程度の細胞死が誘導された。この原因物質を精査した結果、リポドAを含む画分にその原因物質が含まれることが示唆された (JBC, 2005)。興味あることに、

このリポドA画分により誘導される細胞死はTLR4にも依存しない。そこで、リポドAによるIpaB／カスパーゼ-1に非依存的なマクロファージ細胞死誘導に関わる宿主因子として、IpadfおよびASCの関与について各々の欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いて精査した。その結果、ASC欠損マウスにおいては、カスパーゼ-1の活性化は消失したものの依然として細胞死が誘導されていた (PLoS Pathog, 2007)。

3-2. ワクチンへの応用

上述のように、赤痢菌がマクロファージに侵入し食胞から細胞質に離脱すると IL-1 β および IL-18 の産生と分泌が引き起こされ、同時にマクロファージにはネクローシス様細胞死が誘導される。これまでに開発されてきた弱毒赤痢ワクチン株は細胞侵入能を有しており、したがってマクロファージの細胞死誘導能も保持している。これが従来型ワクチンで認められた炎症（発熱、下痢といった副作用）および低防御免疫誘導の背景となると一般に考えられている。そこでM細胞およびマクロファージへの侵入能は保持するがマクロファージの食胞から細胞質へ離脱不能となった弱毒赤痢変異株を作製できれば、低炎症性のより安全なワクチン株となる可能性があると考えられた。そこで、エルシニアの細胞侵入因子インベイシン遺伝子 (*inv*) を赤痢菌の細胞侵入性欠損株 (*ipaB*) へ導入した。インベイシンを発現する菌はM細胞表面の β 1-インテグリンに親和性を示し、マクロファージに対する細胞侵入性も示すが、*ipaB* 遺伝子の欠損によりマクロファージの食胞から離脱できず、その結果マクロファージへ感染しても細胞死は誘導されない。J774 マクロファージ細胞へこの変異株を感染させると、食胞に菌は効率よく取り込まれるが、細胞死に伴って大量に分泌される IL-1 β および IL-18 の産生は著しく低下していた。実際に BALB/c マウス経鼻感染モデルを用いインベイシン発現変異株による感染防御効果等の免疫学的解析を行なった結果、投与後の肺病理所見では中程度の好中球浸潤像がみられたが各種炎症性サイトカインの顕著な上昇は認められなかった。また外見上の病的症状、体重減少等の副作用も極めて軽微であった。一方、投与1ヶ月後の血清中および気管支肺洗浄液中の抗赤痢菌 LPS-IgG、-IgA 抗体価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高い防御効果が示された。これらのことからインベイシン発現変異株が低炎症性赤痢ワクチンとして、今後さらなる改良を加え新規な弱毒ワクチンとして発展する可能性があることが示唆された (J. Immunol. 2006)。

3-3. モルモット感染モデルの開発

赤痢菌を、遺伝学的背景を異にするマウスの腸管へ経口的に投与し、腸管での菌の自然感染の有無を精査したが、いずれのマウスにおいても感染は認められなかった。これに替わって、Kweon らのグループ（ソウル、International Vaccine Institute）との共同研究でモルモット直腸感染モデルを開発した (J. Immunol, 2007)。本モデルは種々の赤痢弱毒変異株に対する感受性試験でも極めて再現性よく病原性を反映することが

示された。そこで今回新たに同定した新規エフェクター欠損株と野生株を用いて、本感染モデルの有効性を検証した。いずれの場合も、当該エフェクター欠損株の腸管組織内定着率および腸管炎症誘導の程度は野生株に比べ有意に低下しており、本モデルの有用性がさらに確認された。



図 8. 赤痢菌のモルモット直腸感染により発症した細菌性赤痢

(2) 研究成果の今後期待される効果

新たな感染戦略の解明

赤痢菌は感染において TTSS を通じて 50-60 個のエフェクターを分泌していると推定されている。本研究によって、エフェクターの役割は、(i) 感染に必要な細胞諸機能の誘導および制御に関わるもの、(ii) 基本的生体防御システムの克服・制御に関わるもの、(iii) 炎症・免疫応答の抑制に関わるもの、(iv) 細胞内の生存に関わるもの、4つのタイプがあることが明らかになった。しかし、感染における役割が明らかにされたものはまだ全体の3分の1に過ぎず、今後これ以外の新たな感染の局面で動員されるエフェクターが同定されることが予想される。したがって、本研究で確立されたさまざまな手法ならびに動物感染モデルを駆使して、今後さらなるエフェクター機能の解明に取り組む予定である。また同時に、本研究で得られた知見は、本研究グループではピロリ菌および病原性大腸菌の新たな感染戦略を解明したことからも明らかのように (Bioessays, 2008; Cell Host Microbe, 2007、Cell Host Microbe, 2007; PNAS, 2007; Cell Microbiol, 2006; JEM, 2005; JBC, 2005)、他の粘膜病原細菌の新たなエフェクターとそれを通じて行なわれる未知なる感染戦略を解明するために役立つことが期待される。

新たな細胞生物現象の解明への応用

本研究では、赤痢菌およびリステリアのオートファジーによる認識と回避機構を明らかにした。これらの研究では、菌体のいかなる成分がオートファジーにより認識されるのか、オートファジーの標的となる菌体表面分子を同定するとともに、オートファジー

の認識に関わる宿主因子を同定した。本研究では赤痢菌によるオートファジー形成に関わる新たな分子 (Afp) を、Atg5 結合タンパク質として同定した。しかし、Afp そのもののオートファジー形成に果たす役割は全く報告されていない。Afp は Atg6 と同様に siRNA でノックダウンさせると細胞死が誘導される。したがって、本研究で得られた知見はオートファジーによる異物認識に新たな視点を導入するとともに、オートファゴソーム形成の生理的意義の解明にツールとして貢献する可能性が十分に期待される。

ワクチンの改良

赤痢菌の腸粘膜感染において誘導される炎症応答は、菌体成分がマクロファージおよび上皮細胞の細胞質へ遊離し、それが自然免疫を刺激する結果、粘膜病原菌のなかではもっとも激しい炎症が誘導される原因と考えられている。この激しい炎症応答を抑制するために、赤痢菌は、他の菌と比べより多くのエフェクター (OspG, OspF, IpaH9.8 など) を分泌していることが推定されている (Nat. Rev. Microbiol, 2008)。赤痢菌に対する感染防御は、菌体の LPS を主体とする抗原により誘導される防御免疫が主体であることが知られている。したがって、理想的な赤痢ワクチンとは、低炎症誘導性、効率的な防御免疫誘導性、および免疫の持続性という困難な課題を克服する必要がある。近年、国外のグループおよび本研究グループの研究により、感染に応答して誘導される炎症シグナル経路に関する情報も次第に蓄積されつつある。本研究では、これらの知見を利用して新たな赤痢弱毒ワクチン候補の開発を試みたが (J. Immunol, 2006)、今後は本研究成果を基に、更なる改良を加えた赤痢弱毒ワクチンを作製して、その感染防御効果を本研究で開発したモルモット直腸感染モデルを利用して評価する予定である。

§ 4 研究参加者

① 笹川グループ(病原細菌の粘膜感染と宿主免疫反応抑制機構の解明とその応用の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	笹川 千尋	東京大学	教授	研究の総括	H15.10～H21.3
	鈴木 敏彦	東京大学	講師	赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用	H15.10～H18.5
	奥田 潤	東京大学	助手	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H15.10～H16.3
	小川 道永	東京大学	助教	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H15.10～H21.3
	三室 仁美	東京大学	助教	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H16.10～H21.3
	吉田 整	東京大学	特任助手	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H17.6～H18.7
	大屋 賢司	東京大学	研究員	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H15.10～H17.3
	豊留 孝仁	東京大学	CREST 研究員	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H15.10～H17.5
*	山下 誠二	東京大学	CREST 研究員	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H17.5～H17.8
*	Muller Daniel	東京大学	CREST 研究員	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H17.10～H19.10
	永井 武	東京大学	特任助教	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H16.1～H20.3
	祝 弘樹	東京大学	教務補佐員	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H17.4～H18.3
	石原 朋子	東京大学	教務補佐員	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H17.4～H18.3
	鈴木 仁人	東京大学	助教	赤痢菌のマクロファージ細胞死誘導機構の解明とその応用	H16.1～H21.3
	鈴木 志穂	東京大学	研究員	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H18.8～H21.3
	Kim Minsoo	東京大学	特任助教	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H19.5～H21.3
	永松 環奈	東京大学	研究員	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H17.4～H19.3
	芦田 浩	東京大学	研究員	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H17.4～H21.3
	半田 浩	東京大学	研究員	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H17.4～H21.3
	吉川 悠子	東京大学	研究員	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H17.4～H21.3
	藤田 幸裕	東京大学	大学院生	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H18.4～H19.9
	福松 真	東京大学	大学院生	赤痢菌の感染におけるエフェクター機能の役割の研究	H18.4～H21.3
	氣駕 恒太郎	東京大学	大学院生	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H19.4～H21.3
	石嶋 希	東京大学	大学院生	免疫抑制に関わるエフェクターの研究	H18.4～H20.3
*	川村 あけみ	東京大学	研究補助員	実験器具の点検、発注業務、研究機器の組立、操作	H17.4～H21.3

§ 5 招聘した研究者等

該当なし

§ 6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 22 件)

1. Jang, M. H., Kweon, M. N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Rennert, P. D., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y. and Kiyono, H. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(16): 6110-5, 2004.
2. Takahashi, T., Matsumoto, T., Nakamura, M., Matsui, H., Kiyohara, H., Sasakawa, C. and Yamada, H. A novel in vitro infection model of *Helicobacter pylori* using mucin-producing murine gastric surface mucous cells. **Helicobacter** 9(4): 302-12, 2004.
3. Matsuzawa, T., Kuwae, A., Yoshida, S., Sasakawa, C. and Abe, A. Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. **EMBO J** 23(17): 3570-82, 2004.
4. Suzuki, T., Nakanishi, K., Tsutsui, H., Iwai, H., Akira, S., Inohara, N., Chamaillard, M., Nunez, G. and Sasakawa, C. A novel caspase-1/toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. **J Biol Chem** 280(14): 14042-50, 2005.
5. Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. and Sasakawa, C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. **Science** 307(5710): 727-31, 2005.
6. Nagai, T., Abe, A. and Sasakawa, C. Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. **J Biol Chem** 280(4): 2998-3011, 2005.
7. Okuda, J., Toyotome, T., Kataoka, N., Ohno, M., Abe, H., Shimura, Y., Seyedarabi, A., Pickersgill, R. and Sasakawa, C. *Shigella* effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF(35) to modulate host immune responses. **Biochem Biophys Res Commun** 333(2): 531-9, 2005.
8. Ohya, K., Handa, Y., Ogawa, M., Suzuki, M. and Sasakawa, C. IpgB1 is a novel *Shigella* effector protein involved in bacterial invasion of host cells. Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation. **J Biol Chem** 280(25): 24022-34, 2005.
9. Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T. and Sasakawa, C. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. **J Exp Med** 202(9): 1235-47, 2005.
10. Marches, O., Batchelor, M., Shaw, R. K., Patel, A., Cummings, N., Nagai, T.,

- Sasakawa, C., Carlsson, S. R., Lundmark, R., Cougoule, C., Caron, E., Knutton, S., Connerton, I. and Frankel, G. EspF of enteropathogenic *Escherichia coli* binds sorting nexin 9. **J Bacteriol** *188* (8): 3110-5, 2006.
11. Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. and Sasakawa, C. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. **J Biol Chem** *281* (1): 599-607, 2006.
 12. Yoshida, S., Handa, Y., Suzuki, T., Ogawa, M., Suzuki, M., Tamai, A., Abe, A., Katayama, E. and Sasakawa, C. Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading. **Science** *314* (5801): 985-9, 2006.
 13. Suzuki, T., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Iwai, H., Toyotome, T., Matsui, H. and Sasakawa, C. High vaccine efficacy against shigellosis of recombinant noninvasive *Shigella* mutant that expresses Yersinia invasin. **J Immunol** *177* (7): 4709-17, 2006.
 14. Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C. and Nunez, G. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. **PLoS Pathog** *3* (8): e111, 2007.
 15. Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., Muller, D., Kirikae, T., Jackson, P. K., Kotani, S. and Sasakawa, C. A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. **Cell** *130* (4): 611-23, 2007.
 16. Iizumi, Y., Sagara, H., Kabe, Y., Azuma, M., Kume, K., Ogawa, M., Nagai, T., Gillespie, P. G., Sasakawa, C. and Handa, H. The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. **Cell Host Microbe** *2* (6): 383-92, 2007.
 17. Ashida, H., Toyotome, T., Nagai, T. and Sasakawa, C. *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. **Mol Microbiol** *63* (3): 680-93, 2007.
 18. Shim, D. H., Suzuki, T., Chang, S. Y., Park, S. M., Sansonetti, P. J., Sasakawa, C. and Kweon, M. N. New animal model of shigellosis in the Guinea pig: its usefulness for protective efficacy studies. **J Immunol** *178* (4): 2476-82, 2007.
 19. Handa, Y., Suzuki, M., Ohya, K., Iwai, H., Ishijima, N., Koleske, A. J., Fukui, Y. and Sasakawa, C. *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. **Nat Cell Biol** *9* (1): 121-8, 2007.
 20. Nagai, S., Mimuro, H., Yamada, T., Baba, Y., Moro, K., Nochi, T., Kiyono, H., Suzuki, T., Sasakawa, C. and Koyasu, S. Role of Peyer's patches in the induction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis. **Proc Natl Acad Sci U S A** *104* (21): 8971-6, 2007.
 21. Mimuro, H., Suzuki, T., Nagai, S., Rieder, G., Suzuki, M., Nagai, T., Fujita, Y., Nagamatsu, K., Ishijima, N., Koyasu, S., Haas, R. and Sasakawa, C.

Helicobacter pylori dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. **Cell Host Microbe** 2 (4): 250-63, 2007.

22. Shifrin, Y., Peleg, A., Ilan, O., Nadler, C., Kobi, S., Baruch, K., Yerushalmi, G., Berdichevsky, T., Altuvia, S., Elgrably-Weiss, M., Abe, C., Knutton, S., Sasakawa, C., Ritchie, J. M., Waldor, M. K. and Rosenshine, I. Transient shielding of intimin and the type III secretion system of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* by a group 4 capsule. **J Bacteriol** 190 (14): 5063-74, 2008.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 2 件、国際会議 14 件)

1. Sasakawa C. "Molecular Mechanism of *Shigella* Infection", 2004 KOSEF-JSPS Asian Science Seminar, Seoul, Korea, October 26, 2004
2. Sasakawa C. "Bacterial exploitation and subversion of host cell function: the case of *Shigella*" University of Tokyo Forum 2005 in Beijing Molecular Medicine. Organized by University of Tokyo. Beijing, China. April 29, 2005.
3. 笹川千尋「赤痢菌の病原性と粘膜感染機構」、学際シンポジウム:環境から病原細菌を見る、木暮一啓主催、日本微生物生態学学会、東京大学農学部弥生講堂、2005年5月16日
4. Sasakawa C. "*Shigella* exploitation and subversion of host cell functions" Molecular Bases Underlying Microbial Infections and the Host Responses. (Organized by Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas, MEXT) Hitotsubashi Memorial Hall, Tokyo, Japan, July 19-20, 2005
5. Ogawa M. "Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy." The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan, September 7, 2005
6. Sasakawa C. "Escape of *Shigella* from autophagy" Symposium on Autophagy unveiled: defense and survival by self-eating. The 78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Kobe, Japan, October 19-22, 2005.
7. Sasakawa C. "Intracellular survival strategy of *Shigella*" The 18th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology, Shonan Village Center, Japan, October 25-28, 2005
8. Sasakawa C. "*Shigella* infection of intestinal epithelium: a paradigm of invasive bacteria" The 6th International Forum of Infection and Immunity. Awaji, Japan, September 4-7, 2006.
9. Sasakawa C. "*Shigella* intracellular survival strategy" Interface of Cell Biology and Cellular Microbiology of European Science Foundation Meeting 2006, San Felie de Guixols, Spain, September 23-28, 2006.

10. Sasakawa C. "Bacterial exploitation and subversion of host cell function" 2006, International Meeting of the Federation of Korean Microbiology Societies, Seoul, Korea, October 19-20, 2006
11. 笹川千尋、「消化管粘膜における赤痢菌の感染戦略」、第 27 回日本医学会総会、大阪、2007 年 4 月 4 日
12. Sasakawa C. "A combat between *Shigella* and host in GI tract", 13th International Congress of Mucosal Immunology, Shinagawa, Japan, July 11, 2007
13. Sasakawa C. "*Shigella* Infection Maneuver", EMBO-FEMS-LEOLOLDINA Symposium, Kloster Banz, Germany, October 12, 2007
14. Sasakawa C. "*Shigella* intracellular survival strategy", The 65th KSBMB Annual Meeting in 2008 & KSMBMB-KSBMB Joint Symposium, Seoul, Korea, May 5, 2008
15. Sasakawa C. "*Shigella* modularar immunsvaret" Swedish Microbiologist Meeting, Umea, Sweden, June 4, 2008
16. Sasakawa C. "*Shigella* infection of intestinal mucosa and host response", The 9th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2008, October 17, 2008

② 口頭発表 (国内会議 14 件、国際会議 2 件)

1. Suzuki M. "CagA interaction with Crk is required for *Helicobacter pylori*-induced loss of cell adhesion and scattering" The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan, September 6, 2005
2. 鈴木仁人 "Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion" 第 88 回 日本細菌学会関東支部総会、アクトシティ浜松コンgresセンター、2005 年 10 月 20 日
3. 小川道永 「*Listeira monocytogenes* 感染によるオートファジーの解析」、第 79 回日本細菌学会総会、エルフ金沢、2006 年 3 月 29 日
4. 森田朋子 「赤痢菌の III 型分泌装置における Spa33 の局在と役割」、第 79 回日本細菌学会総会、金沢市観光会館、2006 年 3 月 29 日
5. 鈴木仁人 「ピロリ菌 CagA による胃上皮細胞間接着の脱制御機構」、第 79 回日本細菌学会総会、金沢市観光会館、2006 年 3 月 29 日
6. 永松環奈 「*Helocobacter pylori* は IL-1 α を介して MIP-2 産生を誘導する」、第 79 回日本細菌学会総会、金沢市観光会館、2006 年 3 月 29 日
7. 半田浩 「赤痢菌の上皮細胞侵入における IpgB1 の機能解析」、第 79 回日本細菌学会

総会、金沢市観光会館、2006年3月29日

8. 鈴木仁人 「ピロリ菌 CagA による β -カテニンの活性化機構」、第 89 回日本細菌学会関東支部総会、森秋旅館（群馬県北群馬郡伊香保町 60）、2006 年 11 月 16-17 日
9. Iwai H. "A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling" The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan, September 4, 2007
10. 三室仁美 「赤痢菌感染によるマクロファージ細胞死およびオートファジー誘導における NLR ファミリー Ipaf および ASC の役割」、第 37 回 日本免疫学会総会・学術集会、グランドプリンスホテル新高輪、2007 年 11 月 21 日
11. 鈴木仁人 「ピロリ菌 CagA のリン酸化非依存的な発癌シグナル活性化機構」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、パシフィコ横浜、2007 年 12 月 13 日
12. 永井武 「*Citrobacter Rodentium* の感染によって癌の転移が阻害される」、第 81 回日本細菌学会総会、国立京都国際会館、2008 年 3 月 24 日
13. 吉川悠子 「*Listeria monocytogenes* のオートファジー認識システムからの回避機構の解明」、第 81 回日本細菌学会総会、国立京都国際会館、2008 年 3 月 24 日
14. 鈴木仁人 「ピロリ菌 CagA のチロシンリン酸化非依存的活性」、第 81 回日本細菌学会総会、国立京都国際会館、2008 年 3 月 26 日
15. 三室仁美 「ヘリコバクターピロリ CagA タンパク質による胃上皮細胞アポトーシス抑制作用」、第 81 回日本細菌学会総会、国立京都国際会館、2008 年 3 月 26 日
16. 鈴木仁人、笹川千尋 「ピロリ菌による胃発癌機構 - 非リン酸化 CagA の意義」、第 91 回日本細菌学会関東支部総会、生命の森リゾート日本エアロビクスセンター、2008 年 10 月 23 日

③ ポスター発表 (国内会議 16 件、国際会議 14 件)

1. Ogawa M. "IcsB, secreted via the type III secretion system, is necessary for escape of intracellular *Shigella* from autophagy", The 4th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, August 31, 2004
2. 永井武 「腸管病原性大腸菌 III 型分泌タンパク質 EspF の機能解析」、第 77 回日本細菌学会総会（大阪）、2004 年 4 月 1 日
3. 鈴木仁人 「Crk アダプター蛋白を介した *Helicobacter pylori* CagA のシグナル伝達機構」、第 77 回日本細菌学会総会（大阪）、2004 年 4 月 2 日
4. 鈴木仁人 "*Helicobacter pylori* CagA cracks host cell signaling via its interaction with Crk", The 4th Awaji International Forum on Infection and Immunity,

Awaji Yumebutai International Conference Center , September 1, 2004

5. 小川道永、鈴木敏彦、笹川千尋「赤痢菌の上皮細胞感染におけるオートファジー阻害機構の解析」第78回日本細菌学会総会、タワーホール船堀、平成17年4月4日～6日
6. 鈴木仁人「ピロリ菌 CagA の活性に必須な宿主因子の解析」第78回日本細菌学会総会、タワーホール船堀、平成17年4月4日～6日
7. Suzuki T. and Sasakawa C. “A novel caspase-1/Toll-like receptor-independent pathway of cell death induced by cytosolic Shigella in infected macrophages.” The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 5-7, 2005
8. 芦田浩 ”IpaH protein family encoded on Shigella chromosome are secreted via the type III secretion system” The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, September 5-7, 2005
9. 芦田浩「赤痢菌の染色体上 IpaH の III 型分泌装置からの分泌と宿主細胞への移行」第88回日本細菌学会関東支部総会、アクティシティ浜松コンgresセンター、平成17年10月20日、21日
10. 永井武 ”Functional analysis of EspF secreted by enteropathogenic E. coli.” 第18回内藤カンファレンス 湘南国際村センター、平成17年10月25日～28日
11. 鈴木仁人、笹川千尋 ”Helicobacter pylori CagA cracks gastric epithelial cell adhesion” 第18回 内藤カンファレンス、湘南国際村センター、平成17年10月25日～28日
12. 小川道永、笹川千尋「赤痢菌の上皮細胞感染におけるオートファジー阻害機構の解析」第8回 日韓微生物シンポジウム、金沢市観光会館、平成18年3月29日
13. 鈴木仁人、笹川千尋 “Helicobacter pylori CagA cracks gastric cell adhesion” 第8回日韓微生物シンポジウム、金沢21世紀美術館、平成18年3月29日、30日
14. Mimuro H. and Sasakawa C. “*Helicobacter pylori* CagA inhibits self-renewal of gut epithelium by accelerating MCL1 expression”, The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center , September 4-7, 2006
15. Handa Y. and Sasakawa C. “Bacterial effector hijacks the RhoG-ELMO-Dock180 machinery to invade epithelial cells”, The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, September 4-7, 2006
16. Suzuki M. “*Helicobacter pylori* CagA induces proliferative and proinflammatory responses in gastric epithelial cells”, FEBS/EMBO/FEMS Lecture Course: Molecular Basis of Bacterial Virulence and Survival Within Infected Hosts and in the Environment, Spetses, Greece, September 5-15, 2006

17. Nagai T. “Targeting of Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to Host Mitochondria is Essential for the Bacterial Pathogenesis”, FEBS/EMBO/FEMS Lecture Course: Molecular Basis of Bacterial Virulence and Survival Within Infected Hosts and in the Environment, Spetses, Greece, September 5-15, 2006
18. Mimuro H. “The role of coccoid form of *Helicobacter pylori* on the induction of gastritis”, 第 36 回 日本免疫学会総会・学術集会, 大阪国際会議場(グランキューブ大阪), 2006 年 12 月 11-13 日
19. 半田浩 “Bacterial Effector exploits the RhoG-ELMO-Dock180 Machinery to Invade Epithelial Cells”, 第 89 回 日本細菌学会関東支部総会、群馬県北群馬郡伊香保町森秋旅館、2006 年 11 月 16、17 日
20. 半田浩 「赤痢菌は RhoG-ELMO-Dock180 のシグナル伝達を利用し上皮細胞へと侵入する」、東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム、東京大学 安田講堂／工学部 2 号館、2006 年 11 月 25 日
21. 小川道永 「赤痢菌の細胞内運動における VirA タンパク質の機能解析」、第 80 回日本細菌学会総会、アジア太平洋トレードセンター(ATC ホール)、2007 年 3 月 26 日
22. 三室仁美 「ヘリコバクターピロリによる胃上皮細胞アポトーシス抑制作用」、第 80 回日本細菌学会総会、アジア太平洋トレードセンター(ATC ホール)、2007 年 3 月 26 日
23. 祝弘樹 「赤痢菌 IpaB エフェクターによる上皮細胞の細胞周期停止とその役割」、第 80 回日本細菌学会総会、アジア太平洋トレードセンター(ATC ホール)、2007 年 3 月 26 日
24. 半田浩 「赤痢菌の上皮細胞侵入における IpgB1 の機能解析」、第 80 回日本細菌学会総会、アジア太平洋トレードセンター(ATC ホール)、2007 年 3 月 26 日
25. 半田浩 “SHIGELLA IPGB1 PROMOTES BACTERIAL ENTRY THROUGH THE ELMO-DOCK180 MACHINERY”, 第 20 回内藤コンファレンス「自然免疫の医学・生物学[III]」、湘南国際村センター、2007 年 10 月 9 日～12 日
26. 石嶋希 「ヘリコバクター・ピロリ菌感染における付着因子 BabA-Lewisb 血液型連鎖結合の重要性」、第 81 回日本細菌学会総会、国立京都国際会館、2008 年 3 月 24 日
27. Nagamatsu K., H. Mimuro H. and Sasakawa C. “*Helicobacter pylori*-adaptive strategy to inflamed stomach via stimulation of IL-1alpha nuclear translocation in macrophage”, The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, September 8-11, 2008
28. Suzuki M. and Sasakawa C. “The non-phosphorylated status of CagA is pivotal for *Helicobacter pylori* pathogenesis”, The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, September 8-11, 2008
29. Mimuro H., Suzuki T., Nagai, S. Rieder G., Suzuki M., Nagai T., Fujita Y., Nagamatsu K., Ishijima N., Koyasu S., Haas R. and Sasakawa C. “*Helicobacter pylori* Dampens Gut Epithelial Self-Renewal by Inhibiting Apoptosis, a

Bacterial Strategy to Enhance Colonization of the Stomach”, 9th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, Seoul Kyoyuk Munhwa Hoekwan, Korea, October 16-17, 2008

30. Yoshikawa Y. “*Listeria monocytogenes* ActA plays a pivotal role in evading autophagic recognition”, 9th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, Seoul Kyoyuk Munhwa Hoekwan, Korea, October 16-17, 2008

(3)特許出願

①国内出願 (2件)

1. 発明の名称:P13 キナーゼ依存性炎症性サイトカイン合成阻害剤及び阻害方法発明者:小安重夫(慶応義塾大学)、大谷真志(慶應義塾大学)、
笹川千尋(東京大学)吉田整(東京大学)
出願人:学校法人慶應義塾大学
出願日:平成18年7月10日
2. 発明の名称:キャリア
発明者:小安重夫(慶応義塾大学)、大谷真志(慶應義塾大学)、
笹川千尋(東京大学)、三室仁美(東京大学)
出願人:学校法人慶應義塾大学
出願日:平成18年11月20日
出願番号:特願2006-313217号

②海外出願 (0件).

(4)受賞等

①受賞

- ・2006年3月 小川道永 黒屋奨学賞受賞
- ・2006年11月 笹川千尋 武田医学記念賞

②新聞報道

- ・2006年12月18日付 日本経済新聞
「赤痢菌感染仕組み解明」
- ・2007年1月10日付 朝日新聞
赤痢菌感染「腸の細胞だまし体内に入り込む」
- ・2007年8月24日付 日刊工業新聞
腸管での赤痢菌増殖 上皮細胞延命させ感染
- ・2007年8月24日付 フジサンケイビジネスアイ
腸上皮細胞の代謝を抑制 赤痢菌感染の「巧妙な戦法」
- ・2007年10月11日付 毎日新聞
ピロリ菌「感染持続の謎解明」
- ・2007年10月11日付 朝日新聞
ピロリ菌「胃滞留の仕組み発見」
- ・2007年10月11日付 日本経済新聞
ピロリ菌の長期感染解明

(5)その他特記事項
総説

1. Sasakawa, C. *Shigella* invasion. **Bacterial Invasion of Host Cell** : 25-57, 2004.
2. Sasakawa, C. and Hacker, J. Host-parasite interaction: Bacteria. **Curr Opin Microbiol** 9: 1-4, 2006.
3. Ogawa, M. and Sasakawa, C. Intracellular survival of *Shigella*. **Cell Microbiol** 8 (2): 177-84, 2006.
4. Ogawa, M. and Sasakawa, C. Bacterial evasion of the autophagic defense system. **Curr Opin Microbiol** 9(1): 62-8, 2006.
5. Ogawa, M. and Sasakawa, C. *Shigella* invasion of host cells and escape from autophagy. **Autophagy in immunity and infection**: 151-157, 2006
6. Ogawa, M. and Sasakawa, C. *Shigella* and autophagy. **Autophagy** 2(3): 171-4, 2006.
7. Ogawa, M., Handa, Y., Ashida, H., Suzuki, M. and Sasakawa, C. The versatility of *Shigella* effectors. **Nat Rev Microbiol** 6(1): 11-6, 2008.
8. Mimuro, H., Berg, D. E. and Sasakawa, C. Control of epithelial cell structure and developmental fate: lessons from *Helicobacter pylori*. **Bioessays** 30(6): 515-20, 2008.
9. Ogawa, M., Nakagawa, I., Yoshikawa, Y., Hain, T., Chakraborty T. and Sasakawa, C. *Streptococcus*, *Shigella* and *Listeria*-induced autophagy. **Methods in Enzymology** 452: in press.

§8 結び

本研究では赤痢菌をモデルに、病原細菌の腸粘膜バリアー感染システムと免疫抑制という、菌の感染成立の鍵となる二つの重要な局面における病原因子（主に III 型分泌装置より分泌されるエフェクター）と宿主因子の相互作用を解明し、粘膜病原細菌の感染戦略を個別かつ包括的に理解し、細菌病原性の従来の概念にあらたなパラダイムシフトを導入することを目指し計画した。また、同時に感染症への貢献を視野に、本研究で得られた知見を応用して、新規なタイプの赤痢弱毒ワクチン開発の基礎的研究を行なった。前者の研究計画はほぼ当初の目標に到達できたが、応用面での研究では必ずしも十分な成果を得られなかった。一方で、本研究計画の遂行には学際的な共同研究が不可欠であり、実際に国内外の研究者と共同研究を積極的に行ない、多くの成果を得ることができたことは幸いであった。またこの研究の主要テーマの幾つかは、本研究グループの教員と職員が一丸となって、あるいは教員が大学院生の博士論文のテーマとして教育して行なわれたものである。従って、本研究を通じて若手教員には実験技術の継承とともに

に研究教育の機会が与えられ、その結果、本研究グループから独立した研究者あるいは指導者が育ったことは、本研究成果の誇るべき側面であろうと思われる。

本研究が、病原細菌の研究課題として本領域で唯一採択されたことは、本研究グループ研究の発展のみならず、我が国の細菌学領域全体にも多大のインパクトを与え、また国内の多くの優秀な細菌研究グループとの共同研究を通じてそれらの研究にも少なからず貢献したと思われる。さらに、本研究により、欧米の学術集会へも多く招待され、国外の大学、研究機関、研究室を訪問し多くの研究者と個人的に交流する機会が与えられたことは、本研究領域の国際発信に多大な貢献できたものと考えられる。これらの成果を、本研究のさらなる発展に繋げるとともに、残された時間を次世代の育成にも資する所存である。

最後に本研究を採択いただき、また実施期間（平成15年10月から今日まで）本研究をさまざまな面からご支援、ご指導いただいた、領域総括代表の岸本忠三先生、アドバザリーボードの諸先生、および領域事務所の方々に心より感謝する次第である。また研究室の教員、教務補佐員、研究員、大学院生、研究生、および国内外の多くの共同研究者の諸氏にもこの場をかりて心より感謝する。



平成19年4月撮影