

赤痢菌による抗原提示細胞の細胞死誘導機構と新規ワクチンへの応用

研究課題名：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

東京大学医科学研究所 講師
鈴木 敏彦

● 研究のねらい

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成されてきた。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。

● 研究結果と考察

I. 赤痢菌のアクチン重合機構における宿主分子の特異性の解明

赤痢菌は細胞内に侵入後菌の一端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機構は菌の外膜蛋白VirGとneural-Wiskott Aldrich syndrome protein (N-WASP)の結合を介したArp2/3 complexの活性化によることが明らかになっている。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い出した。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に侵入した赤痢菌はアクチンコメットを形成しなかった。さらにN-WASPを強制発現したマクロファージではアクチンコメットの形成を認めた。したがって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。

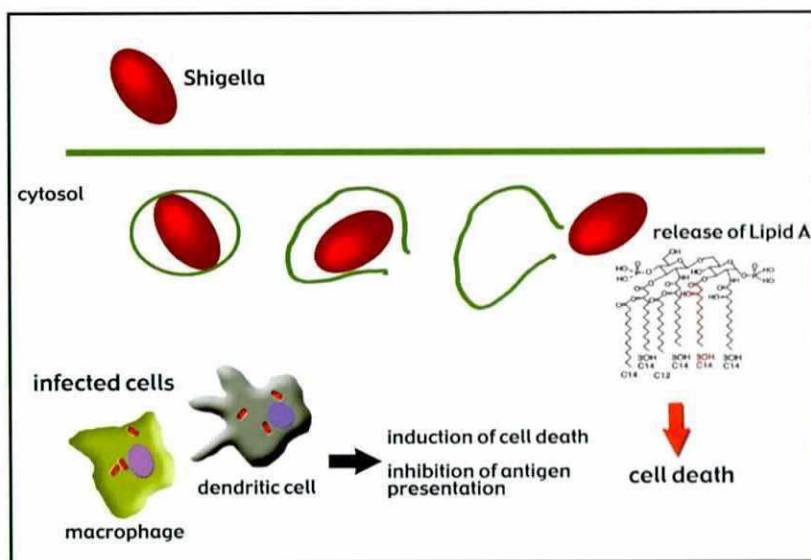
II. VirAエフェクターの機能の解明

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い出した。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。

III. 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するがその後細胞死を誘導することが知られている。これまでに赤痢菌はカスパーゼ-1依存的に細胞死を誘導すると報告されている。しかしながら、我々はカスパーゼ-1欠損DCやマクロファージに赤痢菌が感染すると遅延性の細胞死が誘導されることを見い出した。したがってカスパーゼ-1は赤痢菌による細胞死誘導に必須ではなく、さらにカスパーゼ-1を介さない別の細胞死シグナルの存在が示唆された。また、細胞死の形態はカスパーゼ-1の有無に関わらず典型的なアポトーシスではなくむしろネクローシス様であった。まずこの細胞死シグナルに必要な菌側因子を同定するために、細胞内寄生細菌リ

ステリアと赤痢菌各種非侵入変異株との混合感染を行い、ファゴゾーム膜をリステリオリジンの活性を利用して溶解させ、赤痢菌変異株を細胞質に移行させた後に細胞死誘導能を調べた。その結果、各種エフェクター欠損株、III型分泌装置欠損株、あるいは大腸菌K-12はいずれも細胞質への移行により細胞死を誘導した。したがって、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に入ることによって細胞死の誘導が起きることが示唆された。この因子による細胞死は赤痢菌野生株と同様にカスパーゼ-1存在下では速やかに起き非存在下では遅延することが示された。さらに細胞死誘導因子の同定を行い最終的にLipid Aが細胞死誘導分子であることが示された。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 (図参照)。



IV. 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前述のlipid Aの作用によって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。したがって細胞死誘導能は従来の細胞侵入性弱毒ワクチン株で見られる炎症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成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思われた。これまでの研究で、赤痢菌が分泌するエフェクターIpaBおよびIpaCがファゴゾームの溶解に必要であることが報告されており、これらの機能に変異を導入することによりワクチン株とすることが理論的には可能であった。しかし、IpaBはIII型分泌装置の一部であり細胞侵入およびファゴゾーム溶解の機能に必須であることが知られている。実際に種々の変異IpaBを作成し、ファゴゾームの膜溶解活性のみを欠損しエフェクターの分泌性を保持するような変異体の分離を試みたが、その機能領域を遺伝学的に分離することはできなかった。IpaCについても解析されているが機能領域の分離はできていない。そこで、上述のような概念で作成するワクチン株が実際に有効に機能するか否か検討するために、エルシニアの細胞侵入因子invasinの遺伝子を細胞侵入能が欠損した赤痢菌変異株 (IpaB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。この株をマウスへ経鼻的に2回投与した後、致死量の赤痢菌野生株を感染させたところ死亡率の有意な低下が認められたことからワクチンとしての感染防御効果が示された。

● 今後の展望

以上のことから、赤痢菌はグラム陰性細菌に共通に存在するlipid A（あるいはLPSとして）を細胞質内に放出し、これらを検知したDCやマクロファージはネクローシス様の細胞死を誘導して局所の炎症を惹起することが明らかとなった。また、カスパーゼ-1はこの細胞死を促進する作用をもつ。このような細胞応答は、ファゴゾームを突破して細胞質内に侵入したグラム陰性細菌に対する宿主の炎症反応の1つと考えられるが、赤痢菌はこれを逆手にとり、感染細胞を破壊して感染局所に炎症を誘導すると同時に抗原提示細胞の機能抑制をはかっているものと思われる。細胞質内でLipid Aをリガンドとする分子の同定が今後の課題である。また、ここで明らかになった細胞死誘導機構を基に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る。

主要業績リスト

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.* 101: 6110-6115