

宿主免疫システムの介入による食中毒菌の 病原因子発現の抑制機構について

坂本 啓

The University of Michigan, Postdoctoral fellow

緒 言

衛生管理についての知識や技術の進歩、医療技術の発達により、安全な食生活を享受することは容易であるかのように思える。しかし、消化管の感染症は途上国のみならず先進国においても依然多発し、時に致命的である^{1,2)}。したがって、食中毒対策は予防・治療問わず喫緊の課題であることがわかる。本研究は食中毒の原因菌が体内に入り、腸管内で増殖し、やがて駆除される一連のメカニズムを研究することで、新規治療戦略開発の糸口を探ることを目的とした。

近年の報告から、病原菌と宿主の攻防は単純にそれら2者の関係に収束せず、その舞台となる腸管内に存在する膨大な細菌叢も深く関わっていることがわかってきた³⁾。腸管内の常在細菌叢は、ヒトでは100兆個にも上る細菌から構成されているが、構成種の多様性と培養の困難さも相まって、今もってその全貌は明らかとはなっていない。しかし研究者たちの長年の努力と技術の進歩により宿主に対する役割が解明されはじめています。

我々のグループでの先行研究では、腸内常在細菌が病原菌の排除に必須であることを*Citrobacter rodentium*のマウスへの感染実験で示した⁴⁾。すなわち無菌マウスでは感染させた病原菌を排除できず、競合細菌(常在菌の一種)の投与により排除が可能となったのである。さらにはこの報告の中で、「腸管付着性病原菌の宿主内における無病原性化」、言い換えれば「病原菌の「牙」を抜き飼いなす」という大変興味深い現象が示された。*Citrobacter rodentium*を感染させた無菌マウスの腸内には*Citrobacter rodentium*があたかも常在菌のように生息し続けたにもかかわらず、その病原因子の発現は著明に低下していたのである。しかし、そのメカニズムを詰めるには至らなかったため、さらなる検証・考察を深めることとした。

結 果

1. *Citrobacter rodentium*の病原因子は宿主の獲得免疫の介入により低下させられる

*Citrobacter rodentium*はLEE遺伝子とよばれる一連の病原因子コードする遺伝子をもつ。LEE遺伝子は*ler*によりその発現を制御されており、*ler*遺伝子が発現することで全てのLEE遺伝子の発現が可能となる。

既報では獲得免疫を欠くことで*Citrobacter rodentium*の感染に対し致死的になることが判明していた^{5,6)}。そこで、*Citrobacter rodentium*の感染により誘導される特異的な免疫応答が病原因子の発現に介入するという仮説を立てた。

*Rag-1*ノックアウトマウス(*Rag-1KO*)には獲得免疫が存在しないため、それらに*Citrobacter rodentium*を感染させ病原因子の発現を解析した。野生型(WT)のマウスでは*Citrobacter rodentium*は感染の初期には腸管内で増殖するが、次第に排除されはじめ、感染後3~4週で駆除される。この*Citrobacter rodentium*排除のタイミングと一致して、*Ler*の発現は感染の初期には高く、後期には低下していた。一方*Rag-1KO*において感染後期における*Ler*の発現の低下は認められなかった。また、病原性を維持した*Citrobacter rodentium*は腸内常在細菌による競合的な排除をうけず、感染の後期においても腸管内に多数存在し続け、最終的にマウスは死亡した。以上の結果より、宿主の獲得免疫は病原因子質の発現を制御し、腸内常在細菌による競合的な排除を補助していることが示唆された。

2. *Citrobacter rodentium*に対する特異的なIgGが病原因子の低下に関与する

*Rag-1KO*ではT-CellおよびB-Cellがいずれも損なわれている。そこでB-Cell特異的に欠損したマウス(μ MT)に*Citrobacter rodentium*を感染させたところ、*Rag-1KO*と同様の挙動を示した。また、hapten 4-hydroxy-3-

nitrophenylacetate特異的な抗体のみを産生する quasi-monoclonal (QM) マウスに *Citrobacter rodentium* を感染させたところ、感染後期になっても病原因子を低下させることができず糞便中の菌数も高レベルを維持したままであった。一方既報から IgA は *Citrobacter rodentium* の駆除に必須ではないことが知られている⁶⁾。さらに、*Citrobacter rodentium* 感染後12日後、22日後の腸管内容物からは *Citrobacter rodentium* 特異的な IgG および IgA が検出されたものの、*Citrobacter rodentium* 特異的な IgM は検出されなかった。このため我々は *Citrobacter rodentium* 特異的な IgG が病原因子の低下に関与すると結論付けた。

3. *Citrobacter rodentium* に対する IgG は主に病原因子を特異的に認識する

感染後期の糞便中から検出される *Citrobacter rodentium* を FACS により解析したところ9割近くの菌体に IgG が付着していることが観察された。また、野生株の *Citrobacter rodentium* (CR-WT) と病原因子制御因子 *ler* をノックアウトした菌株 (CR- Δ ler) とを、*Citrobacter rodentium* 既感染マウスの血清で処理したところ、CR-WT には IgG 付着したものの CR- Δ ler には IgG の付着はほとんど見られなかった。これらのことから、*Citrobacter rodentium* に感染したマウスで産生され

る抗体は病原因子をターゲットとしたものが主であることがわかった。

4. 腸管内の *Citrobacter rodentium* は高病原性と低病原性の亜集団に分かれ、gG に認識された高病原性の集団が選択的に排除される

前項までに述べたように、病原因子特異的な IgG が *Citrobacter rodentium* の病原因子の低下に関与するものの、IgG を培地に添加するなど *in vitro* による検討では直接の増殖抑制効果や病原因子の発現低下は認めなかった。そこで我々は *Citrobacter rodentium* もサルモネラで報告された如く高病原性と低病原性の亜集団が存在すると仮定し、高病原性のものは IgG によりオプソニン化されることで選択的に捕食されるものと考えた。

腸管内の *Citrobacter rodentium* の mRNA を解析したところ、粘膜に付着している菌は、粘膜を離れて管腔内を浮遊している菌に比べて病原因子の転写活性が高いことが判明した。また、好中球の phagocytosis assay により、病原因子を発現した菌は特異的な IgG が作用することで好中球に捕食されやすくなる現象が観察された。

さらには、好中球を欠損させたキメラマウスはコントロールマウス同様に IgG を産生するものの *Citrobacter rodentium* 感染により致死的であり、また感染後期でも腸管内 *Citrobacter rodentium* の病原因子の低下は認め

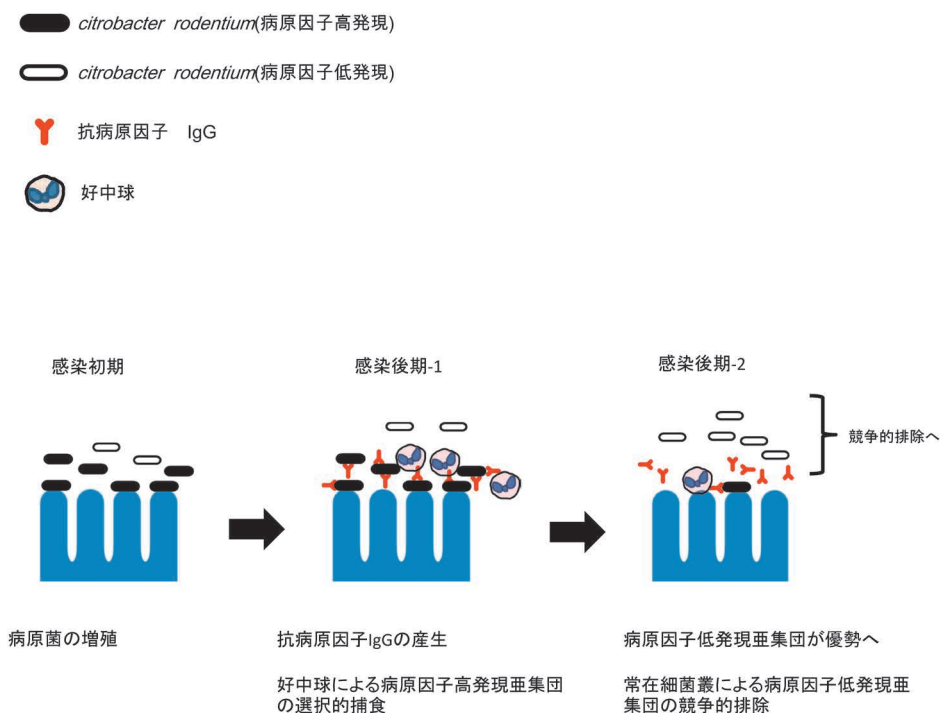


図1 本研究結果により示されたメカニズムの概要

なかった。

考 察

上記の結果により、*Citrobacter rodentium*の排除には2つの段階があることがわかった。それは病原因子特異的IgGの産生とそのオプソニン効果をもたらす高病原性集団の好中球による捕食、そしてそれに引き続く腸内細菌叢による低病原性集団の競争的排除である。しかし、*Citrobacter rodentium*がなぜ高病原性亜集団と低病原性亜集団の2集団に分かれるのか、その根本的な仕組みは解明できていない。この低病原性集団が発生するメカニズムの解明は今後の課題となった。

要 約

宿主の免疫系の介入により、腸管内で増殖した*Citrobacter rodentium*は高病原性の亜集団が選択的に駆除されことで低病原性の亜集団を優位となる。その後低病原性の集団は腸内細菌叢により競争的に排除される。

上記の結果は *Cell Host Microbe*. 2015 May 13; 17 (5):

617-627にて発表致しました。詳細は該当論文を御参照下さいましたら幸いです。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団の学術研究助成金の援助を賜りました。この場をお借りしまして、財団の関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

また、ミシガン大学の鎌田信彦先生、Gaburiel Nunez教授とそのラボメンバーの皆様、他ご協力くださいました方々に深く感謝を致します。

文 献

- 1) D. A. Rasko, et al.: *N. Engl. J. Med.*, **365**, 709-717, 2011.
- 2) 厚生労働省：食中毒統計.
- 3) D. R. Littman, E. G. Pamer: *Cell Host Microbe.*, **10**: 311-323, 2011.
- 4) N. Kamada, et al.: *Science*, **336**: 1325-1329, 2012.
- 5) L. Bry, M. B. Brenner: *J. Immunol.*, **172**: 433-441, 2004.
- 6) C. Maaser, et al.: *Infect Immun.*, **72**: 3315-3324, 2004.
- 7) B. Marteyn, et al.: *Nature*, **465**: 355-358, 2010.
- 8) M. Diard, et al.: *Nature*, **494**: 353-356, 2013.