

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	病原性細菌のゲノム情報を応用した細菌感染特異的オートファジー誘導による感染防御法の開発
研究機関・部局・職名	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
氏名	中川 一路

【研究目的】

病原性細菌の進化は、ヒトという環境に適応して自らの生息環境を広げるために絶え間なく起きている。このような環境の変化に対応するため、細菌は、自らの遺伝子を長い年月の間に進化させる同時に、外来性の遺伝子、すなわち自らが持っているだけでなく、外界から遺伝子を取り込むことによりその遺伝子レパートリーを広げてきたと考えられている。このような病原性細菌の進化の過程は、そのゲノム情報を広範囲に比較検討することにより、これまでその細菌が進んできた進化の過程を垣間見ることができる。上記の A 群レンサ球菌を例に挙げても、同じレンサ球菌属で保存されている遺伝子領域は 60%程度に過ぎず、残りの 40%は、その菌に特異的な遺伝子が存在している。すなわち、このような種特異的な遺伝子群の機能に着目することにより、その種特異的な感染の特異性を明らかにすることができる。実際、このような遺伝子群には、ワクチン候補となるような表層抗原群が多数含まれているが、このような表層抗原は、外界からの様々な刺激により菌株特異的な変異が起りやすく、現時点ではワクチン候補としては現実的ではない。そのため、その菌の生育に必要不可欠であり、かつ宿主の認識機構に特異的なターゲットを選択することが効果的な治療法を開発するための必要条件である。

病原性細菌の病原性の発揮には、宿主組織への付着により生体組織に定着することが重要である。そのため、生体を広く覆う上皮や粘膜といった組織は、これらの菌の侵入を感知する最前線の組織であり、かつ最大の防御組織となっている。近年、多くの細菌種がこのような上皮組織の細胞内に侵入することが知られてきたが、その動態はほとんど明らかとされていない。申請者は、非食食系のこのような宿主細胞内に取り込まれた A 群レンサ球菌が、通常のエンドソーム・リソソーム系以外に、細胞内の小器官などを分解する自食作用（オートファジー）により分解されるメカニズムを明らかとした (Nakagawa et al. Science, 2004)。

その後、オートファジーから回避する赤痢菌 (Ogawa et al, 2005) や IFN-g により食食細胞で分解を行う結核菌など (Guitierrez et al, 2005, Singh, et al, 2006) の報告が相次いでいる。レンサ球菌種の分類学上の Type species (代表種/分類基準種) であり、かつ咽頭部粘膜が初発感染部位と考えられる A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は、近年、劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSL) の

起因菌として注目を集めている。TSLs は A 群レンサ球菌による重度の敗血症、DIC 様の病態を特徴とし、病態の進行が急激で死亡率も高いため、有効な治療法や予防法の確立が求められている。

このような病原微生物に対して、上皮組織は、従来考えられているように物理的なバリアーだけで対処しているのではなく、積極的に病原性細菌を感知して様々な炎症性反応を惹起することで、貪食細胞や免疫担当細胞の動員にも機能していると考えられる。病原性細菌を感知して様々な炎症性反応を惹起することで、貪食細胞や免疫担当細胞の動員にも機能していると考えられる。しかし、本来は、細胞内でのオルガネラや巨大タンパク質のクリアランス機構として機能し、あるいは飢餓状態などのアミノ酸欠乏状態に対する生理的な反応メカニズムであるオートファジーが、なぜ病原性細菌の侵入を感知して分解を行うことができるのかについては、その分子メカニズムについてもほとんど明らかとされていない。そこで、本研究では、病原性細菌の進化について、特にある種にのみ保存されている遺伝子群をバイオインフォマティクスの観点から明らかにすると共に、その病原性発現機能を詳細に解明すること、および、そのような細菌種に特異的な感染におけるオートファジーの誘導機構を解明することを目的として、以下の点について解析する。

(1) 種に特異的な遺伝子群の網羅的な解析とその病原性発現機構の解明

細菌ゲノムにコードされている病原性遺伝子をいままでのような個々の遺伝子の機能のみに着目するのではなく、この遺伝子群の発現を時空間的に網羅的に解析することにより、どのようなタイミングで病原性を発揮するのか、その機構までを明らかとすることを目的とする。

(2) 細菌種を認識して特異的にオートファジーの誘導に関わる分子群の解析

上記(1)で得られた病原性遺伝子の発現プロファイルを元に、感染時に誘導される病原性遺伝子の発現と、宿主細胞内で誘導されるオートファジーの誘導メカニズムを時空間的に解析する。細菌感染におけるオートファジーの役割を自然免疫系の一端としてとらえ、個体レベルで解析を行う。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

平成 23 年 2 月 10 日～平成 25 年 3 月 31 日 間で当初の計画を完了したために平成 24 年度で本補助事業を終了した。

当初計画していた研究をほぼ完了し、溶連菌感染症として例年流行を引き起こすが、有効な予防法が確立されていない感染症について、1) 新規に流行するであろう菌株を、外来性遺伝子獲得のプロファイルを用いることで予測可能になること、2) その菌の宿主細胞内での動態を、オートファジーとの関連で解析することにより詳細な動態が明らかになることを見出した。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

菌種に特異的な遺伝子群の網羅的解析とその病原性発現機構の解析、宿主細胞内での菌体の遺伝子発現の網羅的解析系の構築、菌種を認識して特異的にオートファジー誘導を行う分子群の解析は当初の計画通り終了したが、一部病原遺伝子破壊株を用いるオートファジー誘導のメカニズム解明については、細胞側の因子についての KO マウスが胎生致死のため個体レベルでの解析が不可能になり細胞レベルでの解析に止まった。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

A 群連鎖球菌の多株比較ゲノム解析により、病原性の獲得にはファージの関与が大きく、スペーサー領域の遺伝子解析から将来流行可能な株の予測が可能になった。また、細胞侵入に際してオートファジーが関与し、宿主因子として Rab9A, Rab23 を同定した。さらに、それらの機能解析にも成功した。これらの研究から、外来遺伝子を制御する CRISPR に着目した結果、A 群レンサ球菌では CRISPR は単にバクテリオファージの侵入を抑制するだけでなく、それぞれの菌に感染できるファージを分別することにより形質を変化させていることを明らかにした。したがって、CRISPR スペーサー領域の解析により、現在の流行株の性質を明らかにできるだけでなく、新たに流行する株を予測できるようになる。しかし、当初予定した A 群レンサ球菌感染で最も問題となる劇症型疾患の原因となる因子については同定ができなかった。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

CRISPR は細菌の外来遺伝子排除機構として注目されてきたが、それまでその菌体が攻撃された外来遺伝子を記憶していることから、これまで分類が困難であった菌種についても、その菌の由来を同定できる可能性がでてきた。また、飢餓誘導のオートファジーとは異なる細菌感染特的に誘導されるオートファジーについての機能の一端を明らかにした。

以上の成果から、CRISPR スペーサー配列の詳細な解析から、A 群レンサ球菌新規流行株がどのような病原性因子を獲得するのかを予測できるようになった。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

病原細菌の解析グループとオートファジー解析グループの2つを形成し、夫々のグループの実験結果を相互に理解しながらデータ共有して研究遂行するようにマネジメントを行った。その結果、査読付き論文15編(内容の記載なし)、学会発表32件、図書3件を発表した。また、学会時に市民公開講座や大学での公開講座を利用して国民との科学・技術対話を行った。しかし、知的財産権の出願・取得はなされていないので今後の検討に期待する。