

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09561

研究課題名(和文) クラミジア感染によって誘導される炎症応答の制御システムの探索

研究課題名(英文) Regulations of inflammatory responses induced by Chlamydia

研究代表者

松尾 淳司 (Matsuo, Junji)

北海道大学・保健科学研究所・講師

研究者番号：50359486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：クラミジア感染における宿主炎症応答制御機構を明らかにするために、クラミジア感染を感知する新規レセプターの探索や、環境クラミジアを用いた保存性の高いクラミジア因子の探索を行ったところ、非TLRレセプターおよび易熱性のクラミジア分子が炎症誘導に関与することが示唆された。さらにこれらクラミジアによる炎症誘導が低酸素条件下で促進されることも明らかとなった。一方、炎症誘導に関連する宿主細胞のアポトーシス下流分子カスパーゼ3活性測定を行ったところ、感染後期で促進していた。またクラミジア感染においてmiRNAの発現変動が宿主炎症応答に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand host inflammatory responses induced by Chlamydia, we tried to identify a novel receptor of host cells and chlamydial factors, which are conserved in the Chlamydiales. As a result, a non-TLR receptor and a heat-labile chlamydial factor may be involved in host inflammatory responses. In addition, the responses were enhanced in low oxygen environments. On the other hands, host caspase-3 dynamics was revealed using a cyclic fire luciferase probe. We also showed that miRNA regulation may be involved in the host inflammatory responses induced by Chlamydia.

研究分野：感染症学

キーワード：クラミジア 炎症 サイトカイン アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

偏性細胞内寄生細菌肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) は、単に呼吸器感染症の原因となるだけでなく、動脈硬化や気管支喘息への関与が示唆されている。また性器クラミジア (*C. trachomatis*) は、トラコーマや性行為感染症を引き起こす一方、骨盤内感染症や関節炎などの慢性炎症性疾患にも関与する。これら炎症性疾患は、クラミジアが宿主細胞に炎症応答を誘導することで引き起こされると考えられている。

クラミジアは宿主細胞に炎症応答の引き金となる IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインを分泌誘導する (*Infect Immun*, 64:4872-5, 1996)。これら炎症性サイトカインは TLR/MyD88 依存的に発現誘導される (*J Immunol*, 180:1158-68, 2008)。IL-1 β は成熟型サイトカインへと変換が必要であるが (*Cell*, 140:821-32, 2010)、クラミジアは IL-1 β の成熟変換を担う NLRP3 インフラマソームを活性化する (*J Immunol*, 184:5743-54, 2010)。このように、クラミジア感染における主要自然免疫レセプターである TLR/NLR ファミリーの役割は明らかになりつつある。

一方、緑膿菌やピロリ菌などの細菌感染症では TLR ファミリーに加えて、PAR (Protease-activated receptor) や EGFR (Epidermal growth factor receptor) などのレセプターを介し炎症性サイトカイン IL-8 が分泌される (*Cell Microbiol*, 10:1491-504, 2008; *Infect Immun*, 76:3233-40, 2008)。このように、細菌感染時の炎症応答においては、TLR 非依存的シグナルも重要な役割を担うことが明らかとなってきたが、クラミジア感染時の炎症応答におけるこれらレセプターの役割は十分に理解されていない。

また近年では、細菌感染に伴い誘導/抑制される miRNA がサイトカイン分泌を制御することが注目されている (*Cell Microbiol*, 15:1496-507, 2013)。例えば、ピロリ菌感染では、TLR 依存的に miR-155 を発現誘導し (*PNAS*, 109:E1153-62, 2012)、炎症性サイトカイン IL-8 の発現を抑制する (*J Infect Dis*, 200:916-25, 2009)。またサルモネラ感染では、let-7 を阻害することで、IL-6 や IL-10 の発現を制御する (*EMBO J*, 30:1977-89, 2011)。このように、細菌感染における宿主免疫応答の包括的理解を目指す上で、炎症制御を担う miRNA の同定も必要不可欠といえる。

このようにクラミジア感染によって誘導される宿主炎症制御機構は、未だ十分に理解されておらず、未知の制御機構の関与が強く疑われる。そのため、これらを解明することで、クラミジアが引き起こす呼吸器感染症や性行為感染症の病態形成の理解やその制御法の開発のみならず、クラミジアが関与することが示唆される動脈硬化や関節炎などの慢性炎症疾患の病態形成および治療法の開発にも繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

クラミジアは、宿主細胞に感染することで炎症を惹起し、その結果ヒトに様々な疾患を引き起こすと考えられている。そこで本研究ではクラミジアによる宿主炎症制御機構を解明するために、まずクラミジア感染を感知する未知のレセプターの探索を行うとともに、炎症誘導に関与するクラミジア因子の探索を行った。

次に、クラミジア感染時における炎症応答制御という観点から、実際の感染を反映すると考えられる低酸素条件下における宿主炎症動態、さらにはクラミジア感染時に変動する miRNA の探索を行うことで、クラミジア感染によって誘導される宿主炎症応答の理解を試みた。

3. 研究の方法

クラミジアと細胞株: 肺炎クラミジア TW-183 株および性器クラミジア血清型 L2 434/Bu 株は、各々ヒト上皮細胞株 HEp-2 細胞および HeLa 細胞を用いて増殖させ、凍結融解後に遠心法にて精製したものをを用いた。

環境クラミジア: 院内環境より株化したアメーバ共生細菌プロトクラミジア *Protochlamydia* は、アメーバを培養後、凍結融解後に遠心法にて精製したものをを用いた (*Environ. Microbiol. Rep.*, 2:524-533, 2010)。

IL-8 の検出: 炎症性サイトカイン IL-8 の分泌は HEp-2 細胞培養上清より市販の IL-8 ELISA キット (BioLegend, Tokyo, Japan) を用いて検出した。また、IL-8 mRNA は RNA を抽出後、cDNA 合成を行い、IL-8 特異的プライマーを用いて定量した (*Infect. Immun.*, 83:2917-2925, 2015)。

低酸素培養: 低酸素培養チャンバー (MIC-101, Billups-Rothenburg 社) を用いて、低酸素 (酸素 2%) ならびに通常酸素 (酸素 21%) 条件下で培養を行った。酸素濃度は、酸素濃度モニタ (XO-2200, New Cosmos Electric, Osaka, Japan) を用いて確認した。

カスパーゼ3基質 DEVD 配列環状ルシフェラーゼ (cFluc-DEVD) 安定発現細胞株の樹立: HEp-2 細胞に SuperFect (Qiagen, Valencia, CA) を用いてトランスフェクションし G418 で選択することで、cFluc-DEVD 安定発現細胞を樹立した。cFluc-DEVD 遺伝子の挿入は、ルシフェラーゼ遺伝子を増幅する PCR 法にて確認した。

ルシフェラーゼアッセイ: ルシフェラーゼ活性は、Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) を用いて、Luminescencer Octa (ATTO, Tokyo, Japan) で測定した。

miRNA array: クラミジア感染後の miRNA の変動は、miScript miRNA PCR Array (Qiagen) を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) 新規レセプターの探索

まず HEp-2 細胞を肺炎クラミジアで刺激し、ELISA 法にて炎症性サイトカイン IL-8 の分泌を確認した。その結果、肺炎クラミジアが濃度依存的に HEp-2 細胞から IL-8 の分泌を誘導することが確認された。次に、チロシンキナーゼ阻害剤を用いた実験を行ったところ、IL-8 の分泌が抑制された。この結果、IL-8 の分泌にチロシンキナーゼレセプターの関与が示唆された。そこで、肺炎クラミジアとレセプターとの相互作用を確認するために、大腸菌を用いてタグ付けした組換え体の発現・精製を試みた。その結果、組み換え体の発現が確認されたものの、精製のための可溶性実験では、異なる大腸菌株や温度条件などの検討を行ったものの、十分な可溶性条件は見いだすことはできなかった。さらに無細胞タンパク質発現系も用いて検討したところ、一部の組み換え体で発現が認められなかった。

(2) クラミジア因子の探索

土壌や河川などの自然環境中に存在し、7~14 億年前に肺炎クラミジアなどから分岐したと考えられる環境クラミジアは、保存性の高いクラミジア分子を探索するうえで有用なモデルである。そこで、以前に院内環境より株化することができたアメーバ共生細菌プロトクラミジアを用いて、炎症性サイトカイン IL-8 の分泌誘導能をリアルタイム PCR 法および ELISA 法にて解析した。その結果、どちらの方法においてもプロトクラミジア菌量依存的に IL-8 の誘導能が確認できた。その一方、加熱処理したプロトクラミジアでは、これらの応答が消失していた。このようにクラミジアによる炎症誘導には、保存された易熱性の分子が関与することが示唆された。

(3) 低酸素下における炎症動態

次に実際の感染局所と同じ酸素濃度環境であると想定される低酸素条件下において、肺炎クラミジアの感染動態ならびに炎症誘導能について検討を行った。その結果、肺炎クラミジアの増殖は低酸素条件下で増強された。また低酸素条件下での炎症性サイトカイン IL-8 の分泌誘導を検討したところ、IL-8 の分泌は有意に促進されることが明らかとなった。

(4) カスパーゼ 3 の動態解析

宿主アポトーシスもまた宿主炎症応答を理解するうえで、重要な生物現象である。そこで、宿主細胞アポトーシスシグナルに関する検討も行った。これまでの研究では、クラミジア感染細胞におけるアポトーシス下流分子カスパーゼ 3 の活性化は認められていない。そこで本研究では、よりカスパーゼ 3 基質 DEVD 配列環状ルシフェラーゼ (cFluc-DEVD) プローブを用いて、その活性測定を試みた。まず、cFluc-DEVD プローブを発現する細胞株を樹立した。cFluc-DEVD

遺伝子の挿入は、PCR 法で確認した。次にカスパーゼ 3 活性が cFluc-DEVD 発現細胞でモニタリングできることを、スタウロスポリン刺激で確認した。そこで、cFluc-DEVD 発現細胞にクラミジア感染させて検討したところ、クラミジア感染後期にカスパーゼ 3 が活性化されることが明らかとなった。

(5) miRNA の探索

クラミジア感染時に炎症を制御する miRNA は明らかになっていない。そこで、炎症性サイトカイン mRNA と miRNA の発現解析を行った。その結果、感染初期に、8 遺伝子の mRNA 発現上昇が確認された一方、miRNA では 5 遺伝子で発現減少が認められた。

このように、本研究ではクラミジア感染によって誘導される炎症制御には、非 TLR レセプターや保存されたクラミジア因子が関与することが明らかとなった。さらに、これら炎症は低酸素条件で促進することやいくつかの miRNA によって制御されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Fukumoto T., Matsuo J., Okubo T., Nakamura S., Miyamoto K., Oka K., Takahashi M., Akizawa K., Shibuya H., Shimizu C., Yamaguchi H.: *Acanthamoeba* containing endosymbiotic chlamydia isolated from hospital environments and its potential role in inflammatory exacerbation. *BMC Microbiol.*, 16:292, 2016. 査読有
DOI: 10.1186/s12866-016-0906-1.

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) 松尾淳司, 大久保寅彦, 中村真二, 山口博之: *Chlamydia trachomatis* は感染後期に宿主細胞のカスパーゼ 3 を活性化する. 第 91 回日本細菌学会総会, 福岡.(2017 年 3 月 27-29 日)
- (2) 松尾淳司, 芳賀早苗, 大久保寅彦, 中村真二, 小沢岳昌, 尾崎倫孝, 山口博之: カスパーゼ 3 プローブ発現細胞を用いたクラミジア感染宿主細胞内のアポトーシス制御機構の探索. *ConBio2017*, 神戸.(2017 年 12 月 6-9 日)
- (3) 松尾淳司, 中村真二, 大久保寅彦, 山口博之: *Chlamydia* 感染による DEVD 配列挿入環状ルシフェラーゼ発現細胞のカスパーゼ 3 活性化測定. 第 84 回日本細菌学会北海道支部学術総会, 札幌(2017 年 8 月 26 日)
- (4) 松尾淳司, 中村真二, 大久保寅彦, 山口博之: ヒトの移動に伴い院内に持ち込まれるアメーバ共生細菌とヒトへのリスク. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台.(2017 年 3 月 19-21 日)

- (5) 松尾淳司, 中村眞二, 大久保寅彦, 山口博之: *Chlamydia trachomatis* 低酸素培養モデルの構築. 第 83 回日本細菌学会北海道支部学術総会, 札幌.(2016年9月17日)
- (6) Matsuo J., Fukumoto T., Okubo T., Nakamura S., Akizawa K., Shibuya H., Shimizu C., Yamaguchi H.: Amoebal endosymbiont *Protochlamydia* isolated from a hospital can induce IL-8 in human immortal HEp-2 cells. ASM Microbe 2016, Boston, USA. (Jun 16 – Jun 20, 2016)
- (7) 松尾淳司, 大久保寅彦, 中村眞二, 山口博之: 院内から株化されたアメーバ共生クラミジア *Protochlamydia* のヒト株化 HEp-2 細胞への炎症誘導能について. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪.(2016年3月23-25日)
- (8) 松尾淳司, 中村眞二, 大久保寅彦, 山口博之: 院内環境から株化したアメーバ共生原始クラミジアのヒト株化細胞への二次感染能と炎症誘導能について. 第 82 回日本細菌学会北海道支部学術総会, 札幌.(2015年9月5日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾 淳司 (MATSUO, junji)

北海道大学・大学院保健科学研究院・講師

研究者番号: 5 0 3 5 9 4 8 6

(2)研究分担者

山口 博之 (YAMAGUCHI, Hiroyuki)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究者番号: 4 0 2 2 1 6 5 0

中村 眞二 (NAKAMURA, Shinji)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 4 0 2 0 7 8 8 2

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし