

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15092

研究課題名(和文) つつが虫病リケッチア感染における一酸化窒素の役割に関する研究：敵か味方か？

研究課題名(英文) Is nitric oxide beneficial or harmful for infection of *Orientia tsutsugamushi*?

研究代表者

小川 基彦 (Ogawa, Motohiko)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：10322710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：リポポリサッカライド(LPS)処理および一酸化窒素(NO)産生剤NOR5の添加により、マウスマクロファージ系Raw264.7細胞で、つつが虫病リケッチア(以下、リケッチア)の増殖が促進された。マクロファージ内で、主に殺菌に働くはずのNOが、逆にリケッチアの増殖に関与していることが示された。マイクロアレイにより、LPSおよびNOR5処理後に、同じ発現パターンをもつ遺伝子の中から、リケッチアの増殖促進に関連する遺伝子候補として絞り込むことに成功した。今後、リケッチアの増殖促進関連遺伝子を特定するための基盤を構築できた。

研究成果の概要(英文)：Growth of *Orientia tsutsugamushi* (OTS) was promoted in mouse macrophage cell line, Raw 264.7 by treatment with lipopolysaccharide (LPS) and addition of nitric oxide (NO) producing agent, NOR 5. In macrophages, it was shown that NO, which should mainly play a role of bacteria-killing, is conversely involved in the promotion of OTS-growth. By the microarray, after LPS and NOR 5 treatment, we succeeded in selecting candidate genes related to the promotion of OTS-growth out of the genes having the same expression pattern. In this study, we had a great achievement to identify the candidate genes which possibly promote the growth of OTS for further analysis.

研究分野：リケッチア学

キーワード：つつが虫病リケッチア マクロファージ 活性化 一酸化窒素 増殖促進効果

1. 研究開始当初の背景

つつが虫病は、わが国で最も患者数が多いリケッチア症で、ヒトは、リケッチアをもつダニの一種ツツガムシに刺咬され感染する。起因菌であるつつが虫病リケッチア(以下、リケッチア)は、細胞内でしか増殖できない偏性細胞内寄生細菌である。リケッチアは、刺し口で一度増殖した後、マクロファージ系の細胞に感染して全身に運ばれ、血管内皮や肝臓などで増殖する(引用文献1)。適切な抗菌薬による治療が遅れば、重症化し、播種性血管内凝固により多臓器不全となり死亡することがある。実際、毎年のように死亡例が報告されている。一方で、治療が遅れても自然治癒する症例もあり、重症化因子や機序に関しては、依然としてはっきり解明されていない。

一般的に、マクロファージは、外来からの侵入物を貪食し殺菌する重要な役割を担っている(引用文献2)。感染の結果、サイトカインや LPS などによりマクロファージが刺激されると、殺菌に働く一酸化窒素(以下、NO)が産生される。NOは、殺菌作用をもつフリーラジカルであり、さらにスーパーオキシドを補足すると、より強力な殺菌力をもつペルオキシナイトライトというラジカルを形成する(引用文献3)。

リケッチアのマクロファージへの感染は、感染後体内へのリケッチアの拡散に重要であり、大きく病態を左右する。我々は、マクロファージ系細胞を、LPS 刺激すると、NO 産生が顕著に誘導されているのにも関わらず、つつが虫病リケッチアの増殖が促進されるという「逆転現象」を発見した。

2. 研究の目的

(1) マクロファージにおける殺菌とリケッチア感染の逆転現象について、NO に注目して解析すること、

(2) NO の細胞内伝達物質としての役割

にあえて注目し、マクロファージ系培養細胞を用いて、NO によるリケッチアの増殖促進の分子メカニズムを解明することを、目的とした。

3. 研究の方法

(1) マクロファージにおける NO によるリケッチア増殖促進効果の解析

マウスマクロファージ系 Raw264.7 細胞における NO のリケッチア(Ikeda 株)に対する効果を解析した。Raw264.7 細胞を LPS 処理(100 μ g/ml、24 時間)した後、リケッチアの増殖と NO の産生を解析した。リケッチアの定量は、感染細胞から DNA を抽出後、定量 PCR 法(引用文献4)により行った。リケッチアの観察は、抗リケッチアウサギ免疫血清および Alex488 標識抗ウサギ 2 次抗体を用いて、蛍光染色(IF)法により行った。NO の検出は、DAF-2 蛍光染色試薬を用いて、IF 法により行った。同様に、NO 産生剤 NOR5 処理(60 μ M、2 日おきに液替え)した際の、リケッチアの増殖も解析した。

(2) マイクロアレイを用いたリケッチア増殖促進因子の探索

Raw264.7 細胞を、LPS 処理(100 μ g/ml) 24 時間後洗浄、LPS を取り除いた後、LPS を含まない培地で培養し 4 時間後、RNA を回収した。また、NO 産生剤 NOR5(60 μ M) 処理 24 時間後に RNA を回収した。回収した RNA について、マイクロアレイ(SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K、アジレント)により遺伝子発現を解析した。2 群比較により発現に優位な差のある遺伝子を抜き出し、パスウェイおよび機能解析により、リケッチアの増殖促進因子の候補を絞り込んだ。

(3) CRISPR/CAS9 の系を用いた増殖促進関連遺伝子のノックアウト(KO)細胞の作出
増殖促進関連遺伝子の候補の中から、結核菌の増殖促進への関与が報告されている PPARG 遺伝子について、CRISPR/CAS9 の系

により KO 細胞の作出を行った。CRISPR-direct により、PPARG 遺伝子に対するターゲット配列 (sgRNA) を検索および合成後、sgRNA 発現カセットおよび Cas9 発現カセットの両方が搭載された px330 プラスミドに挿入した。sgRNA が挿入された px330 を、マウス繊維芽細胞 L-929 および Raw264.7 細胞に、トランスフェクションし、PPARG 遺伝子 KO 細胞の作出を試みた。

4. 研究成果

(1) LPS 刺激マクロファージにおける NO 産生の促進とリケッチアの増殖促進

Raw264.7 細胞を LPS 処理 (100µg/ml, 24 時間) した後、リケッチアを感染させた。その結果、LPS 処理した Raw264.7 細胞で、一酸化窒素 (NO) の産生が顕著に誘導されているにもかかわらず、リケッチア増殖が促進された (図 1 および 2)。

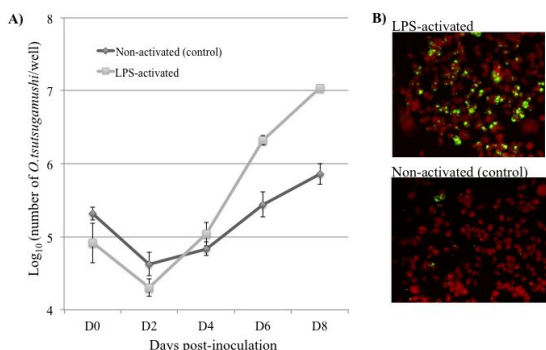


図1 マクロファージのLPS刺激によるリケッチアの増殖促進

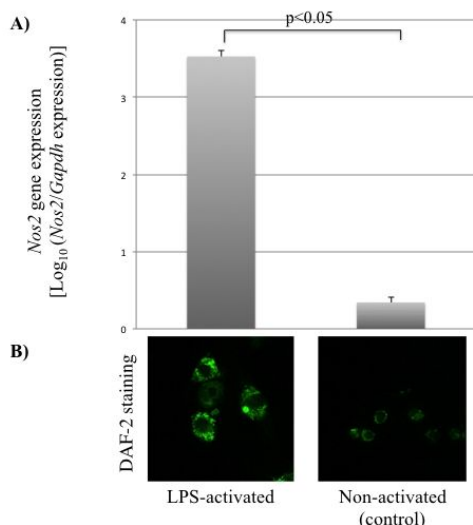


図2 マクロファージのLPS刺激による一酸化窒素の産生促進

(2) NO 産生剤 NOR5 によるリケッチアの増殖促進効果

NO 産生剤 NOR5 (60µM, 2 日おきに液替え) を Raw264.7 細胞に加えたところ、リケッチアの増殖が促進された (図 3)。

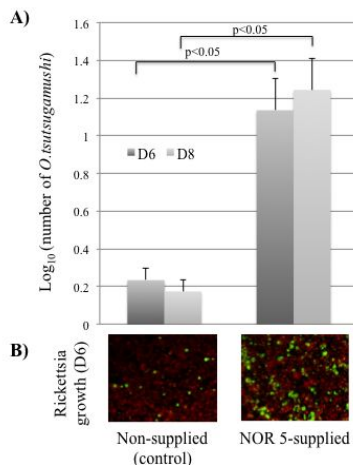


図3 一酸化窒素産生試薬NOR5によるリケッチアの増殖促進

以上から、マクロファージ内で、本来なら殺菌に働くはずの NO が、逆にリケッチアの増殖に関与しているという興味深い現象を発見した。感染の抑制に働く免疫システムが、感染増強に働いていることになる。マクロファージ内で、NO は、おそらく別の因子やメカニズムの誘導を介して、間接的に増殖促進に働いている可能性が考えられた。

(3) マイクロアレイによるリケッチア増殖促進因子候補の選択

マイクロアレイ解析により、LPS 処理および NOR 5 処理によって同様の挙動を示す 12 個の遺伝子を、増殖促進に関与する可能性のあるものとして絞り込んだ (表)。

表 リケッチアの増殖促進に関与する可能性が示唆された遺伝子						
Gene	Location	Functional group	Ratio of gene expression*			
			LPS	NOR5	Average	
CISH	cytokine inducible SH2-containing protein	Cytoplasm	other	4.96	0.87	2.92
Trim30a/Trim30d	tripartite motif-containing 30A	Cytoplasm	other	1.99	0.37	1.18
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-3.35	-2.77	-3.06
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	-1.66	-1.08	-1.37
PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide	Extracellular Space	growth factor	-0.60	-1.76	-1.18
TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3	Other	other	-0.65	-3.40	-2.03
PPARD	peroxisome proliferator-activated receptor delta	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	1.55	0.82	1.19
RELB	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	Nucleus	transcription regulator	-0.71	-1.57	-1.14
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	Nucleus	transcription regulator	-1.81	-0.55	-1.18
CLECT7A	C-type lectin domain family 7, member A	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-1.69	-0.63	-1.16
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	-2.33	-1.45	-1.89
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor	-2.06	-1.34	-1.70

* Ratio of gene expression = Gene expression of the treated cells / non-treated cells

免疫システムや細胞の増殖に関連した機能を持っているものが多く、今後遺伝子欠損や過剰発現により、リケッチアの増殖との関連を確認することが必要である。

(4) リケッチア増殖促進関連遺伝子 KO 細胞の作出

PPARG 遺伝子を KO した L-929 細胞の作出に成功した。一方、同じ sgRNA を用いても、Raw264.7 細胞では、作出できなかった。実験条件の検討が必要であることが示唆された。今後、作出した PPARG 遺伝子が KO された L-929 細胞におけるリケッチアの増殖を検討することを計画している。

<引用文献>

1. Seong SY, Choi MS, Kim IS. *Orientia tsutsugamushi* infection: overview and immune responses. *Microbes Infect.* 2001 Jan;3(1):11-21

2. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev.* 2015 Mar;264(1):182-203.

3. Summersgill JT, Powell LA, Buster BL, Miller RD, Ramirez JA. Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in gamma-interferon-activated macrophages. *J Leukoc Biol.* 1992 Dec;52(6):625-9.

4. Ogawa M, Fukasawa M, Satoh M, Hanada K, Saijo M, Uchiyama T, et al. The intracellular pathogen *Orientia tsutsugamushi* responsible for scrub typhus induces lipid droplet formation in mouse fibroblasts. *Microbes Infect.* 2014 Nov;16(11):962-6.

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)

Ogawa M, Satoh M, Kataoka M, Ando S, Saijo M. Nitric oxide enhanced the growth of an obligated intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* in murine macrophages. *Microb Pathog.* 2017 Jun;107:335-340.

[学会発表](計0件)

[図書](計1件)

小川基彦、佐藤正明：つつが虫病～現在も命を脅かす感染症～、生体の科学 6 6 巻 4 号、金原一郎記念医学医療振興財団、2015

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

1 . 国立感染症研究所 感染研年報
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/annual.html>

2 . **小川基彦** : つつが虫病と日本紅斑熱、感染症 Today 9/27 放送、ラジオ NIKKEI、2017
<http://medical.radionikkei.jp/kansenshotoday/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小川 基彦 (OGAWA, Motohiko)

国立感染症研究所 ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号 : 1 0 3 2 2 7 1 0

(2)研究分担者

佐藤 正明 (SATO, Masaaki)

国立感染症研究所 ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号 : 3 0 4 4 2 9 6 6

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()