

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20857

研究課題名(和文)動脈硬化リスク因子としてのヘリコバクター・シネディ感染病態のコホート研究

研究課題名(英文)A cohort study of pathogenesis of *Helicobacter cinaedi* infections disease as an atherosclerosis risk factor

研究代表者

松永 哲郎 (Matsunaga, Tetsuro)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00723206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題研究では、ヘリコバクター・シネディによる新興感染症における病態発現機構の解明に向けた研究を展開した。これまでに、本菌が感染マウスにおいて骨髄中に長期間潜伏し、動脈硬化症の病態を増悪させること、さらに、感染マクロファージにおいてはオートファジーを回避し、ミトコンドリアのイオウ依存型エネルギー代謝をハイジャックして細胞内寄生することが示唆された。従って、本菌は細胞内寄生などの宿主との共生関係を構築することで本菌感染症の病態を増悪させる可能性が考えられ、今後の本菌の病原性発現と動脈硬化病因論の解明および予防・治療法開発への応用に向けて極めて重要である。

研究成果の概要(英文)： *Helicobacter cinaedi* is the most common enterohepatic *Helicobacter* species that causes bacteremia in humans, but its pathogenicity is unclear. Here, we investigated to clarify the mechanism of pathogenesis in emerging infections by *H. cinaedi*. We found that *H. cinaedi* persistently latent in the bone marrow in infected mice and enhance the pathogenesis of atherosclerosis. We also found that this bacterium parasitize intracellularly by avoiding from autophagic killing and hijacking of reactive persulfide-driven energy metabolism of mitochondria. These data provide the important findings for the elucidation of the theory of *H. cinaedi* infectious disease such as arteriosclerotic pathogenesis and the development of preventive / therapeutic methods.

研究分野：応用微生物学

キーワード： *Helicobacter cinaedi* オートファジー回避 細胞内寄生 骨髄内感染 動脈硬化促進作用

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・シネディ (*Helicobacter cinaedi*) は、胃在位性のピロリ (*Helicobacter pylori*) とは異なりヒトや動物の腸管・肝臓から検出される腸肝ヘリコバクター属に属する微好気性グラム陰性らせん状桿菌であり、1984年に初めてヒトへの感染が確認された新興感染症菌として知られている。本菌感染症の主症状として敗血症や蜂窩織炎を呈することが知られているが、最近では心内膜炎や心筋炎などの心血管疾患の関係性が注目されている。

当研究室では、*H. cinaedi* による新興感染症の分子疫学・病態の解明に向けた研究を行ってきた。研究の中で、市中病院にて免疫異常のない術後患者に敗血症を伴う蜂窩織炎が複数例発生し、原因菌を *H. cinaedi* と同定し (*J Clin Microbiol*, 2007)、さらに本菌感染の血清診断法および迅速かつ高感度な遺伝子診断法を開発した (*Clin Vaccine Immunol*, 2008; *J Clin Microbiol*, 2012)。これらの方法を用いて応募者らは最近、本菌感染が動脈硬化症の進展に関与する可能性を見出し (*Microbiol Immunol*, 2012)、動脈硬化モデルマウスを用いた解析により、動脈硬化病変に本菌とマクロファージの共局在が認められ、マクロファージの泡沫細胞化を介して動脈硬化病態を増悪させることを明らかにした (*Sci Rep*, 2014)。現在までに本症は、免疫異常患者からの検出例が多く報告され、心内膜炎や心筋炎などの重症例も幾つか報告されている。しかしながら、本菌感染による致死報告例はなく、動脈硬化症の関与を示唆する報告が散見している。例えば、最近、国内に限らずイタリアにおいて動脈硬化症患者の約3割に本菌の感染を認められ、国内外において本菌感染と動脈硬化症の関与が強く示唆されている。また予備的に、本 PCR 法を用いて健常保菌者の存在も見出した (*J Clin Microbiol*, 2012)。これらの知見から、*H. cinaedi* は環境中に広範囲に分布しており、健常者への保菌・感染によって動脈硬化病態を増悪させる可能性が考えられた。

一方で、当研究室では、A 群連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) およびネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) 感染系において、セカンドメッセンジャーである 8-ニトロ-cGMP を介した新規オートファジー誘導経路および細菌由来の活性イオウ分子種による制御機構を明らかにした (*Mol Cell*, 2013)。興味深いことに、予備的に、*H. cinaedi* 感染においては、マクロファージ内でオートファジーを回避して細胞内寄生する可能性を見出した。以上のことから、*H. cinaedi* はオートファジー回避を介した細胞内寄生により生体内に定着・共存し、動脈硬化病態を増悪させる可能性が示され、「*H. cinaedi* 細胞内寄生説」が考えられた。

2. 研究の目的

本課題研究では、まず、本菌特異的 PCR 法を用いた一般健常者を対象とした保菌スクリーニングを行い、*H. cinaedi* の感染疫学の解明を目指した。さらに、動脈硬化症増悪の原因細菌としての *H. cinaedi* による骨髄内における潜伏感染と細胞内寄生性の分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *H. cinaedi* 保菌スクリーニング

H. cinaedi の感染疫学を解明するために、当研究室にて *H. cinaedi* 遺伝子診断法として開発した nested PCR を用いて解析した。本 PCR 法は、細胞致死性膨張性毒素

(cytotoxic distending toxin: CDT) の活性サブユニット B の *H. cinaedi* 特異的な遺伝子配列 (*cdtB*) を指標に迅速かつ高感度な検出が可能である。PCR 法に加えて、本菌を含めたヘリコバクター属の培養法として既に確立されている、微好気ガス環境下でヘリコバクター寒天培地を用いた培養法により本菌の検出を行った。

(2) マウスを用いた *H. cinaedi* 感染

H. cinaedi による生体内における定着・共存を明らかにするために、コントロールマウス (BDF1 マウス) への感染系を用いて、各種試料・臓器 (血液、骨髄、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、脾臓、糞) を採取し、本菌特異的 PCR 法を用いて *H. cinaedi* の検出を行った。また、*H. cinaedi* の生菌の検出は、各試料から逆転写後、本 PCR 法により解析した。

(3) 培養マクロファージを用いた *H. cinaedi* 感染

H. cinaedi の細胞内寄生性を明らかにするために、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 への感染系 (gentamicin protection assay) を用いて、本菌感染マクロファージにおけるオートファジー回避を解析した。抗 *H. cinaedi* 抗体を用いた本菌の検出に加えて、オートファジー誘導については、オートファゴソーム関連タンパク質 p62 の免疫細胞染色と共焦点レーザー顕微鏡によるオートファゴソーム形成の形態的観察を指標に解析した。さらに、ミトコンドリアへの *H. cinaedi* の集積は、MitoTracker Red 染色、および、抗 *H. cinaedi* 抗体染色を指標に免疫細胞染色により共局在性を解析した。

4. 研究成果

(1) PCR 法による *H. cinaedi* 保菌スクリーニング解析

まず、30名の健常ボランティアを対象として、便検体から腸内細菌ゲノム DNA を抽出し、本菌特異的 nested PCR 法による解析を行った。その結果、便検体から複数の陽性例 (4 検体) が認められ、これらの

PCR産物の遺伝子配列は全て本菌の遺伝子配列と一致した。

そこで、対象範囲を274検体へと広げて、健常ボランティアからの保菌スクリーニング解析を行った。その結果、健常ボランティアの274検体から複数の陽性例(9検体)を認めた。さらに、この9例について便培養を行った結果、5例でコロニーの増殖が見られ、本菌特異的PCR法により同遺伝子の増幅が認められた。従って、一部の健常者の腸管内に*H. cinaedi*が定着している可能性が示唆され、本PCR法は、迅速かつ特異的な*H. cinaedi*検出法として、本菌感染症の早期診断や治療効果判定および疫学調査において有用なツールとなるものと期待された。

(2) マウス骨髄内における*H. cinaedi*による潜伏感染の解析

BDF1マウスに本菌を腹腔内投与し各種試料・臓器(血液、骨髄、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、脾臓、糞)における感染の有無を本PCR法により解析した結果、投与直後には全ての主要臓器から検出されたが、投与後12日目から4ヶ月もの長期間にわたり骨髄のみからの検出が認められた。さらに、感染マウスの骨髄試料から逆転写後、本PCR解析を行った結果、本菌特異的遺伝子のmRNAが検出され、骨髄中に存在する*H. cinaedi*は生菌であることが考えられた。従って、*H. cinaedi*は感染マウスの骨髄中において長期間、潜伏感染することが示された。

(3) *H. cinaedi*の細胞内寄生性の解析

本菌を感染させたマウスマクロファージ様細胞RAW264.7では、抗*H. cinaedi*抗体を用いた免疫細胞染色により、細胞内にらせん状の菌体像が観察され、また、オートファジー関連タンパク質p62と菌体との共局在は観察されなかった。従って、本菌は感染マクロファージ内において細胞内殺菌機構であるオートファジーを回避して細胞内寄生することが示唆された。さらに、本菌は感染マクロファージにおいて、ごく最近イオウ呼吸の存在が見出されたミトコンドリアに集積することが示された。従って、本菌は細胞内に侵入後、オートファジーによる細胞内殺菌を回避しミトコンドリアのエネルギー代謝をハイジャックすることで細胞内寄生する可能性が示唆された。

本課題研究において、以上の解析により、*H. cinaedi*はオートファジーの回避およびミトコンドリアへの集積を介する細胞内寄生によって血管内に定着し、宿主との共生関係を構築することで動脈硬化症を含む本感染症の病態を増悪させる可能性が考えられた。本菌は1984年に初めてヒトへの感染が確認されて以降、日和見感染菌として考えられてきたが、このような本菌の血管内定着機構としての細胞内寄生の分子機構の解明は本菌の病原性発現と動脈硬化病因論

の解明および予防・治療法開発への応用に向けて極めて重要である。

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7件)

赤池孝章, 井田智章, 魏 范研, 西田基宏, 熊谷嘉人, Md. Morshedul Alam, 居原 秀, 澤 智裕, 松永哲郎, 笠松真吾, 西村明幸, 守田匡伸, 富澤一仁, 西村 明, 渡部 聡, 稲葉謙次, 島 礼, 田沼延公, Minkyung Jung, 藤井重元, 渡邊泰男, 大村谷昌樹, Péter Nagy, Martin Feelisch, Jon M. Fukuto, 本橋ほづみ. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics, *Nature Communications* 誌, 8巻, 2017, 1177, 査読有.

DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y.

居原 秀, 笠松真吾, 北村篤志, 西村 明, 津々木博康, 井田智章, 石崎健勝, 外山喬士, 吉田映子, Hisyam Abdul Hamid, Minkyung Jung, 松永哲郎, 藤井重元, 澤 智裕, 西田基宏, 熊谷嘉人, 赤池孝章. Exposure to electrophiles impairs reactive persulfide-dependent redox signaling in neuronal cells, *Chemical Research in Toxicology* 誌, 30巻, 2017, pp. 1673-1684, 査読有.

DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00120.

西田基宏, 西村明幸, 松永哲郎, 本橋ほづみ, 笠松真吾, 赤池孝章. Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells, *Free Radical Biology and Medicine* 誌, 109巻, 2017, pp. 132-140, 査読有.

DOI:

10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.024.

笠松真吾, 西村 明, 守田匡伸, 松永哲郎, Hisyam Abdul Hamid, 赤池孝章. Redox signaling regulated by cysteine persulfide and protein polysulfidation, *Molecules* 誌, 21巻, 2016, 1721, 査読有.

DOI:10.3390/molecules21121721

Minkyung Jung, 笠松真吾, 松永哲郎, 赤司壮一郎, 小野勝彦, 西村 明, 守田匡伸, Hisyam Abdul Hamid, 藤井重元, 北村大志, 澤 智裕, 井田智章, 本橋ほづみ, 赤池孝章. Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 誌, 480巻, 2016, pp. 180-186, 査読有.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.022.

井田智章, 松永哲郎, 藤井重元, 澤 智裕, 赤池孝章. 活性イオウ含有分子の再発見とその生物活性, 日本薬理学雑誌, 147 巻, 2016, pp. 278-284, 査読無. DOI: 10.1254/fpj.147.278.
Wei Chen, Ethan W. Rosser, 松永哲郎, Armando Pacheco, 赤池孝章, Ming Xian. The Development of Fluorescent Probes for Visualizing Intracellular Hydrogen Polysulfides, *Angewandte Chemie International Edition* 誌, 54 巻, 2015, pp. 13961-13965, 査読有. DOI: 10.1002/anie.201506887.

[学会発表](計 18 件)

松永哲郎, 西村 明, 守田匡伸, 藤井重元, 井田智章, 澤 智裕, 河村好章, 赤池孝章. 新興感染症菌 *Helicobacter cinaedi* の骨髄内における潜伏感染と細胞内寄生性の解析, 第 91 回日本細菌学会総会, 平成 30 年 3 月 27-29 日, 福岡国際会議場(福岡市)

松永哲郎, 西村 明, 笠松真吾, Md. Morshedul Alam, 井田智章, 守田匡伸, 居原 秀, 藤井重元, 本橋ほづみ, 赤池孝章. アルコールデヒドロゲナーゼ 5 (ADH5) のタンパク質ポリスルフィド化を介するニトロソグルタチオン還元酵素 (GSNOR) 反応の選択的抑制マウスの開発, 第 90 回日本生化学会大会, 平成 29 年 12 月 6-9 日, 神戸ポートアイランド(神戸市)

松永哲郎, 西村 明, 守田匡伸, 藤井重元, 井田智章, 澤 智裕, 河村好章, 赤池孝章. 新興感染症菌 *Helicobacter cinaedi* の骨髄内持続感染と動脈硬化促進作用, 第 71 回日本細菌学会東北支部総会, 平成 29 年 8 月 3-4 日, 東北大学加齢医学研究所(仙台市)

松永哲郎, 井田智章, 魏 范研, 澤 智裕, 守田匡伸, 西村 明, 笠松真吾, 田沼延公, 藤井重元, 島 礼, 居原 秀, 西田基宏, 富澤一仁, 本橋ほづみ, 赤池孝章. システイニル tRNA 合成酵素によるミトコンドリア機能制御の解明, 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会, 平成 29 年 6 月 28-29 日, つくば国際会議場(つくば市)

松永哲郎, 井田智章, 魏 范研, 西村明幸, 守田匡伸, 藤井重元, 西田基宏, 富澤一仁, 本橋ほづみ, 赤池孝章. システイニル tRNA 合成酵素によるミトコンドリア形態および機能の制御, 第 17 回日本 NO 学会学術集会, 平成 29 年 5 月 19-20 日, 阿波観光ホテル(徳島市)

松永哲郎, 藤井重元, 澤 智裕, 河村好章, 赤池孝章. *Helicobacter cinaedi* の持続感染と動脈硬化症の進展・促進機構, 第 90 回日本細菌学会総会, 平成 29 年 3 月 19-21 日, 仙台国際センター(仙台市)

松永哲郎, 梅澤啓太郎, 神谷真子, 井田智章, 藤井重元, 渡邊泰男, Ming Xian, 浦野泰照, 赤池孝章. 新規蛍光プローブを用いた活性パースルフィド分子種のイメージング解析, 第 90 回日本細菌学会総会, 平成 29 年 3 月 19-21 日, 仙台国際センター(仙台市)

松永哲郎, 井田智章, 小野勝彦, 津々木博康, 藤井重元, 澤 智裕, 赤池孝章. 細菌における新規シグナル伝達物質 8-ニトロ-cGMP の生成と制御, 第 89 回日本生化学会大会, 平成 28 年 9 月 25-27 日, 仙台国際センター(仙台市)

松永哲郎, 井田智章, 小野勝彦, 津々木博康, 藤井重元, 居原 秀, 澤 智裕, 赤池孝章. 細菌における新規シグナル伝達物質 8-ニトロ-cGMP の生成とその制御機構の解明, 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 平成 28 年 8 月 30-31 日, 仙台国際センター(仙台市)

松永哲郎, 藤井重元, 井田智章, 小野勝彦, 津々木博康, 澤 智裕, 河村好章, 赤池孝章. *Helicobacter cinaedi* の動脈硬化促進および持続感染メカニズムの解明, 第 70 回日本細菌学会東北支部総会, 平成 28 年 8 月 18-19 日, 北里大学獣医学部(十和田市)

松永哲郎, 井田智章, 魏 范研, 笠松真吾, 西村明幸, 守田匡伸, 西村 明, 藤井重元, 西田基宏, 富澤一仁, 赤池孝章. システイニル tRNA 合成酵素によるミトコンドリア機能制御, オルガネラ研究会 2016「オルガネラネットワークの制御機構とその生理的意義」, 平成 28 年 7 月 28 日-29 日, 生理学研究所(岡崎市)

松永哲郎, 藤井重元, 井田智章, 小野勝彦, 津々木博康, 澤 智裕, 河村好章, 赤池孝章. *Helicobacter cinaedi* の持続感染と動脈硬化促進メカニズム, 第 27 回日本生体防御学会学術総会, 平成 28 年 7 月 7 日-9 日, 九州大学病院コラボステーション I (福岡市)

Tetsuro Matsunaga, Tomoaki Ida, Soichiro Akashi, Minkyung Jung, Hiroyasu Tsutsuki, Hideshi Ihara, Tomohiro Sawa, and Shigemoto Fujii, Takaaki Akaike. Formation and signaling functions of a new signaling molecule 8-nitro-cGMP in bacteria, 第 9 回国際 NO 学会, 平成 28 年 5 月 20-23 日, 仙台国際センター(仙台市)

Tetsuro Matsunaga, Tomoaki Ida, Shigemoto Fujii, Katsuhiko Ono, Hiroyasu Tsutsuki, Tomohiro Sawa, Yoshiaki Kawamura, Takaaki Akaike. Persistent infection of *Helicobacter cinaedi* and its promoting effect on the development of atherosclerosis, 第 13 回 韓日国際微生物学シンポジウム, 平成 28 年 5 月 12-13 日, The-K Hotel

Gyeongju (韓国)

松永哲郎, 藤井重元, 井田智章, 津々木博康, 澤 智裕, 河村好章, 赤池孝章. 健常者における新興感染症菌 *Helicobacter cinaedi* 感染スクリーニングと感染疫学研究, 第 89 回日本細菌学会総会, 平成 28 年 3 月 23-25 日, 大阪国際交流センター (大阪市)

松永哲郎, 井田智章, 藤井重元, 渡邊泰男, 澤 智裕, 本橋ほづみ, Ming Xian, 赤池孝章. 新規活性イオウ分子過酸化水素 (HSSH) の生体内生成の検出と生成機序の解明, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会, 平成 27 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)

松永哲郎, 藤井重元, 井田智章, 小野勝彦, 津々木博康, 澤 智裕, 河村好章, 赤池孝章. 新興感染症菌 *Helicobacter cinaedi* の持続感染と動脈硬化促進メカニズムの解明, 第 21 回 MPO 研究会, 平成 27 年 10 月 31 日, 慶應義塾大学病院 (新宿区)

松永哲郎, 藤井重元, 井田智章, 小野勝彦, 津々木博康, 澤 智裕, 河村好章, 赤池孝章. 新興感染症菌 *Helicobacter cinaedi* の感染拡大と動脈硬化症の進展・促進作用, 第 69 回日本細菌学会東北支部総会, 平成 27 年 8 月 21-22 日, 郡山ビッグアイ (郡山市)

〔図書〕(計 1 件)

松永哲郎, 藤井重元, 赤池孝章. 動脈硬化予防, 感染性微生物 *H. cinaedi*, 2015, 14 巻, pp. 66-71

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 哲郎 (MATSUNAGA, Tetsuro)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 00723206

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

藤井重元 (FUJII, Shigemoto)
河村好章 (KAWAMURA, Yoshiaki)
高橋一平 (TAKAHASHI, Ippei)
赤司壮一郎 (AKASHI, Soichiro)
ジョン ミンキョン (JUNG, Minyung)