

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21562

研究課題名(和文)肺炎クラミジアに利用されるマクロファージの分化と脂質代謝のメカニズムを解明する

研究課題名(英文) Analysis of macrophage differentiation and lipid metabolism upon Chlamydia pneumoniae infection

研究代表者

伊藤 竜太 (ITO, Ryota)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：70403920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎クラミジアは市中肺炎など呼吸器疾患のみならず、動脈硬化等のリスク要因としても注目されている。特に感染によるマクロファージの泡沫細胞化は動脈硬化の鍵となる。本研究では肺炎クラミジア感染によるマクロファージの分化と脂質取り込み・代謝の関係性について検討を行った。感染により、マクロファージは一旦炎症性マクロファージと分化し、その後抗炎症性マクロファージへと再分化する2段階の分化が示唆された。この2段階の分化により、脂質取り込みを担うスカベンジャー受容体の発現、脂質取り込み能の亢進、更には肺炎クラミジアの増殖に有利な細胞内環境へと変化している一連の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The obligate intracellular pathogens Chlamydia pneumoniae is well known to the common cause of respiratory tract diseases and has been associated with development of atherosclerosis. For optimal chlamydial growth, prompt modifications of host intracellular environment by C. pneumoniae, for example controlling of inflammation, enzyme activation or metabolism are important. We showed that C. pneumoniae infection to murine bone marrow macrophages (BMMs) induced the differentiation to inflammatory macrophages, and sequentially redifferentiated to anti-inflammatory macrophages. Some scavenger receptors were induced during first differentiation and promoted lipid uptake of infected BMMs. Lysosomal acid lipase (LAL) is also induced by C. pneumoniae infection and may steers the differentiation of anti-inflammatory macrophage. These multi-step differentiation and induction of a series of metabolic enzyme may increase the intracellular nutrients and provide the optimal growth of C. pneumoniae.

研究分野：細菌学

キーワード：クラミジア マクロファージ 脂質

## 1. 研究開始当初の背景

クラミジアは細胞内寄生性細菌の一種であり、性感染症、トラコーマ、クラミジア肺炎などの疾患の原因として知られており、最近では動脈硬化などにも関与することが示唆されている。クラミジアは宿主細胞へ感染後、封入体と呼ばれる膜構造物を形成し、その内部で増殖活動を行う。その際、様々なエフェクター分子の放出などにより、宿主細胞内部をクラミジア自身の増殖に適した環境に改変していると考えられる。通常、クラミジア感染症の治療には抗菌薬の投与などが行われるが、クラミジアはしばしば代謝不活性型の状態に変化して(遷延性感染)治療を長期かつ困難なものにする。

肺炎クラミジアは市中肺炎の1割ほどを占めるポピュラーな呼吸器疾患の原因菌として知られているが、近年はアテローム性動脈硬化の病巣部より本菌の存在が明らかになるなど、循環器疾患との関連性が注目されている。これまでの先行研究では、肺炎クラミジア感染によりマクロファージの酸化LDL取り込みを亢進させて泡沫細胞へと変化させ、動脈内壁に沈着させることが重要なポイントとして指摘されている。

本研究に先立ち、我々は肺炎クラミジアが「宿主細胞における炎症反応を担う複合体 inflammasome を栄養素の獲得に利用しながら増殖する」という、新規の仮説モデルを提唱した。その一連の研究のなかで、クラミジア感染マクロファージは最終的に抗炎症性マクロファージ (M2M) へと分化する結果を得た。M2M はATP産生に脂肪酸分解および酸化系代謝が優位となっていることが示唆されており、これは主に解糖系を用いる炎症性マクロファージ (M1M) よりも効率が良い。クラミジア種は増殖の為にATPを全て宿主に依存するとされており、この点からもM2M 内はクラミジア増殖に好都合な環境と考えられる。

これらの知見から我々は、(1)肺炎クラミジア感染によってM2M への分化およびインフラマソーム活性化が促される。(2)脂肪酸代謝系の活性化が促進され、細胞内に多くの脂肪滴およびATPが貯留する。(3)クラミジアにとって脂質やエネルギーを獲得しやすい環境となり、効率の良い増殖につながる。という、新しい発想に基づいたクラミジア増殖メカニズムの仮説モデルを設定し、このメカニズムの解明を当研究課題の主なテーマとした。

## 2. 研究の目的

先の研究に関連して得られた知見に着目し、本研究ではマウス骨髄由来マクロファージ (BMMs) に対する *in vitro* 感染系を用いて肺炎クラミジア感染時における分化および脂質取り込みのメカニズムを、分子生物学的手法を用いて解明することを目指した。

(1) 肺炎クラミジアの感染により、BMMsの分化がどう変化するかをマーカー分子の発現等を経時的に追跡して詳細に検証する。

(2) 肺炎クラミジア感染BMMsにおける、様々なスカベンジャー受容体の発現パターンを、人為的に分化させたM1M およびM2M と比較検討する。

(3) M2M への分化誘導に関わるとされる因子として、脂肪滴の分解酵素Lysosomal Acid Lipase (LAL) が挙げられる。肺炎クラミジア感染BMMsにおけるLALの挙動を、mRNAレベルおよびタンパク質レベルで追跡し、肺炎クラミジア感染とM2M 分化の関連性を検証する。

(4) 肺炎クラミジア感染BMMsにおける、脂肪滴分解に関わる脂質代謝関連因子の挙動についてmRNAレベルおよびタンパク質レベルで追跡する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肺炎クラミジア感染に対するマクロファージ分化の経時変化について

BMMsに対して肺炎クラミジアを感染させ、一定時間ごとにおけるM1M およびM2M のマーカー分子の発現を、リアルタイム定量PCRにより観察した。M1M の典型的マーカーとしてiNOS遺伝子を、M2M のマーカーとしてArg-1およびFizz-1遺伝子を選定した。

#### (2) 感染マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現解析について

BMMsに対して肺炎クラミジアを感染させ、一定時間後に細胞を回収して様々なスカベンジャー受容体の発現レベルをリアルタイム定量PCRにて解析した。また、インターフェロンおよび細菌由来リポポリサッカライド刺激により分化誘導したM1M およびインターロイキン4刺激により分化誘導したM2M をそれぞれ準備し、これらのマクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現パターンと比較した。

#### (3) 感染マクロファージへ内におけるLALの動態について

BMMsに対して肺炎クラミジアを感染させ、一定時間後に細胞を回収してLAL mRNAの発現レベルをリアルタイム定量PCRにて解析した。同時にウェスタンブロットによりタンパク質レベルでの解析もおこなった。また、リガンド誘導のM1M およびM2M をそれぞれ準備し、これらのマクロファージにおけるLALの発現パターンとも比較した。

#### (4) 感染マクロファージにおける脂質代謝関連因子の挙動について

BMMsに対して肺炎クラミジアを感染させ、一定時間後に細胞を回収して様々な脂質代謝関連因子の発現レベルをリアルタイム定量

PCRにて解析した。同時にウェスタンブロットによりタンパク質レベルでの解析もおこなった。また、分化誘導したM1M およびM2M における脂質代謝関連因子の発現パターンとも比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 肺炎クラミジア感染に対するマクロファージ分化の経時変化について

肺炎クラミジアは当研究室においてよく用いられているAR39株を選択した。対照実験として性感症クラミジア*C. trachomatis* L2株を用いた。マウス骨髄細胞よりM-CSFによりマクロファージを誘導し、それぞれのクラミジア株を感染させた。感染直後を0時間として、4, 8, 12, 18および24時間後までの感染細胞を回収し、細胞内のmRNAを抽出してリアルタイム定量PCRを行った。その結果、まず著しい上昇を見せたのはM1M の分化マーカーであるiNOSであった。iNOSは感染4時間後をピークに、以降は速やかに減少した。対照的に、感染8時間よりM2M マーカーであるArg-1の発現上昇が観察された。Arg-1の発現は感染18時間後まで高値であったが、以降は減少に転じた。もう一つのM2M マーカーであるFizz-1は、感染18時間以降から次第にその発現が上昇しており、M2M の分化が維持されていることが示唆された。一方、性感症クラミジアの感染ではM2M マーカーの発現上昇は見られなかった。

このことから、肺炎クラミジアが感染すると一旦はM1M の分化が誘導されるものの、その後はM2M へ再分化する「2段階の分化」が引き起こされることが示唆された。

#### (2) 肺炎クラミジア感染マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現解析について

マクロファージでは、酸化LDLをはじめとした脂質の取り込みにスカベンジャー受容体が重要な役割を果たす。したがって、肺炎クラミジア感染の際は、特定のスカベンジャー受容体の発現が亢進しているものと考えられた。BMMsに肺炎クラミジアを感染させ、24時間後および48時間後におけるスカベンジャー受容体の発現パターンをリアルタイム定量PCRによって解析した。なお、スカベンジャー受容体はその局在や構造により7つのクラスに分類されており、その中からSR-A1 (class A), MARCO (class A), SR-B1 (class B), CD36 (class B), CD68 (class D), LOX-1 (class E), CXCL16 (class G)およびマンノース受容体として知られるCD206を選定した。その結果、SR-A1, MARCO, CD36, CD68およびCXCL16において感染に伴うmRNA発現の上昇が認められた。特にMARCO遺伝子においては200倍～300倍程度の著しい発現上昇を認めた。MARCOはウェスタンブロットにおいても、肺炎クラミジア感染に伴うタンパク質量の増加が認められた。対照的にSR-B1およびCD206の2遺伝子に関しては感染に伴う発現の変化は認められなかった。

次にこれらのスカベンジャー受容体の発現パターン変化を、リガンドにより誘導したM1M

およびM2M におけるスカベンジャー受容体の発現パターンとそれぞれ比較した。その結果、肺炎クラミジア感染に伴うスカベンジャー受容体の発現はM1M のそれと非常によく一致した。

この結果から、一連のスカベンジャー受容体の発現は感染4時間後のような初期のM1M 分化期において発現の誘導がなされ、その誘導は24時間後においてもなお持続することが示唆された。

(3) 肺炎クラミジア感染におけるマクロファージ内Lysosomal Acid Lipase (LAL) の挙動について

M2M への分化において、CD36による脂質取り込みと、それに続くLALの脂質分解という一連の代謝経路が重要な役割を果たすとされている (Nat Immunol. 2014 Sep;15(9):846-55)。このことから、肺炎クラミジア感染におけるM2M の分化においてもLALの発現上昇が重要ではないかと考えられた。BMMsに肺炎クラミジアを感染させ、24時間後および48時間後におけるLALの発現をリアルタイム定量PCRにて検討した結果、感染によるmRNAの誘導は確認されなかった。一方、ウェスタンブロットによるタンパク質レベルでの検討では、感染に伴いLALタンパク質量の上昇が認められたことから、何らかの転写後調節が介在する可能性が示唆された。なお、CD36の発現に関しては上記(2)を参照されたい。

(4) 感染マクロファージにおける脂質代謝関連因子の挙動について

クラミジアがマクロファージ内に貯留した脂肪滴を栄養素として利用するためには、種々の脂質代謝酵素により脂肪滴を分解し、脂質を取り込み可能な形にする必要があると考えられる。このことから、主に脂肪的分解に関わる脂質代謝酵素群の動態を検討した。脂肪組織トリグリセリドリパーゼ (ATGL)、脂肪組織ホスホリパーゼA2 (AdPLA)およびホルモン感受性リパーゼ (HSL) は主に脂肪組織に存在する脂質代謝酵素群だが、先の実験においてマクロファージ内においても存在することが確かめられていることから、これらの酵素群の動態を確かめることにした。

BMMsに肺炎クラミジアを感染させ、4時間後および24時間後におけるATGL, AdPLAおよびHSLのmRNA発現レベルを検討した結果、いずれも感染24時間後には発現の上昇が確認された。ウェスタンブロットによる解析では肺炎クラミジア感染に伴うタンパク質量の変化は認められなかったが、HSLの活性化を示すS660のリン酸化が感染24時間後において有

意に増加しており，肺炎クラミジア感染に伴う脂質代謝の活性化が示唆された．

#### (5) 結論

当初，我々は肺炎クラミジアがマクロファージへ感染すると，直接的にM2M へと分化を誘導すると推測してきたが，本研究の結果より新たなスキームが考えられた．肺炎クラミジアがマクロファージへ感染すると，まず一旦はM1M へ誘導されることが明らかとなった．そこで種々のスカベンジャー受容体の発現が増加することで細胞外からの脂質取り込み能が増強され，脂肪滴への形成が促進される．その後，LALの発現上昇および活性化によりM2M への「分化の振り戻し」が引き起こされると推測された．研究成果(1)におけるiNOSおよびArg-1発現の経時的変化はこのモデルを強く支持する．

なお，肺炎クラミジア感染に伴うLALの活性化やHSLリン酸化の亢進は，脂質代謝の促進を示唆しており，さらに最終的なM2M への分化により酸化系による脂質分解系を介したATP産生はクラミジアの増殖に好適な環境となっていることが推測され，肺炎クラミジアは豊富に存在するATPや脂質を利用して効率の良い増殖を行うのではないかと考えられた．今後速やかに論文等を通してこれらの結果をまとめ，世間に公表する予定である．

#### 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0件)

〔総説〕(計1件)

伊藤竜太，廣松賢治：肺炎クラミジアによる宿主NLRP3インフラマソームの利用と増殖．医学のあゆみ(2016)第258巻13号，p1212-1213.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

伊藤 竜太 ( ITOH RYOTA )

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：70403920

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし