

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10201

研究課題名(和文) 早産起因細菌に対する宿主細胞感染防御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Blockade of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by *Ureaplasma parvum* vacuolating factor.

研究代表者

西海 史子(Nishiumi, Fumiko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・免疫部門・流動研究員

研究者番号：60599596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：わが国では年間6万人余りが早産で出生し、早産率は約6%である。早産児の原因の約半数に細菌感染や病理的なCAMが認められ、CAMの起因微生物としてウレアプラズマの解析を行ってきた。ウレアプラズマは宿主細胞にクラスリン依存的に細胞内に侵入し、その後、細胞内の膜系を障害しオートファジー経路を逸脱することを見出した。日本人由来の*Ureaplasma parvum*の全ゲノム解析を行い、機能未知であった31遺伝子について酵母を用いた真核細胞内液胞輸送系に対する障害を示す遺伝子をスクリーニングしUpVFと名付けた新規のウレアプラズマ病原因子を単離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周産期医療最大の課題である早産抑止に向け、主要なヒト流早産原因細菌であるウレアプラズマの解析を行ってきた。ウレアプラズマには、アジスロマイシン等のマクロライド系抗菌薬が使用され一定の効果を得ているが、近年は国内でも耐性菌が多く分離される。ウレアプラズマのさらなる制御には、その病原発揮機構を詳細に明らかにする必要がある。今回の我々の解析で、ウレアプラズマは宿主細胞内に侵入し、そして宿主のオートファジーなどの膜系による分解を巧妙に回避しながら、宿主と折り合いをつけ生存していることが示された。ウレアプラズマの宿主膜系の障害には名付けた新規の病原因子UpVFが関与していた。

研究成果の概要(英文)：Annually, 15 million neonates are born preterm, and preterm birth complications are responsible for the deaths of 1 million children. Approximately half of the preterm cases are associated with bacterial infections. *Ureaplasma* spp. belongs to family *Mycoplasmataceae*, and is known as one of the significant causatives of preterm birth. I reported that *U. parvum* internalized into host cells by clathrin-mediated endocytosis and survived at least 14 days within HeLa cells. Interestingly, intracellular *U. parvum* disrupted host intracellular membrane, which took part in the host cellular degradation system, including the clearance of pathogens. By using yeast vesicular trafficking inhibitory screening method, a novel *Ureaplasma* membrane disrupting factor (UpVF) was isolated. These findings provided a novel implication for host-pathogen interaction by one of the smallest free-living microorganisms, *Ureaplasma*.

研究分野：細菌感染、細胞生物学

キーワード：U. parvum ER stress anticancer effect

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

早産の主要な原因の一つとして胎内感染が報告されており、これまで起因微生物として、大腸菌、連鎖球菌、ガードネレラ、ウレアプラズマなどが明らかにされている。そのなかでも私たちは、ウレアプラズマによる子宮内感染に着目し研究を行っている。これまでに私たちの研究室では、流早産胎盤の42%から本菌が同定され、絨毛膜羊膜炎と優位に正の相関を示した(Namba et al, 2010)。ウレアプラズマは通常健康な人からも分離され、常在菌であるのか、病原細菌であるのか長らく議論があった。Menon, R.ら (Menon et al, 2009) の論文では、加熱後の死菌は培養細胞において炎症反応が惹起されないと報告し、一方、Shimizu T.ら (Shimizu et al, 2011)や Li, Y.H.ら (Li et al, 2001) は、ウレアプラズマの外膜タンパク質である精製 MBA で炎症性サイトカインの発現が誘発されている事を示した。しかし、いずれも培養細胞系での検討で流早産との関連を示すことは出来なかった。最近、私たちはウレアプラズマの外膜タンパク質 MBA が TLR を介して炎症反応を起こし、妊娠マウスにおいて流産や早産を起こす事を報告した (Uchida et al, 2013)。菌の発見から60年を経て、これらの検討から漸く流早産を引き起こす病原因子の単離に至った。また、ナノ粒子を用いた研究からウレアプラズマの菌体の大きさが妊娠マウス胎盤機能を障害することも見出した (Yamashita et al, 2011)。以前から当研究室では母体が本菌に対するIgGを有している事を明らかにしたが、なぜ感染を防御できないのかは不明であった。最近の研究でヒトウレアプラズマがクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって宿主細胞内に侵入し、細胞内で増殖する事、侵入後初期エンドソームから後期エンドソームへと細胞内を移動し、その一部がオートファジーによって宿主細胞内で分解されている事を明らかにした (Nishiumi et al, 2017)。これまで種々の細菌が細胞内に侵入しオートファジーが活性化されるとガレクチンが細菌を被覆し、リソソームと結合している (Chauhan et al, 2016)ことが明らかになっていることから、*U. parvum* 感染によってガレクチンが集積するか調べたところ、感染前には細胞質全体に広がっていたガレクチンが *U. parvum* 感染によってドット状に局在し *U. parvum* と共局在している事を明らかにした。近年ウイルスや細菌感染によって ER ストレスが引き起こされ、PERKの活性化が誘導されて細胞の恒常性が崩壊することが示され、ウイルスや細菌の持続感染によりアポトーシスが引き起こされることが報告されている。また、マイコプラズマと癌の関連性についても知られており (Paton et al, 1965)、*M. hyorhinae* と胃癌、*M. hominis* と前立腺癌 (Rogers, 2011)、*U. urealyticum* と子宮頸癌 (Xiaolei et al, 2014) などの関連性について報告がある。さらに *U. urealyticum* は HPV が原因の子宮頸癌の促進因子である可能性があることも報告されている (Drago et al, 2016)。このようなことから、*U. parvum* と ER stress 関連因子の関係について明らかにし、*U. parvum* の持続感染による癌との関係について明らかにする。

2. 研究の目的

これまでの研究で、*U. parvum* が宿主細胞に取り込まれ、宿主細胞内で生存していることを明らかにしてきた。宿主細胞に病原性細菌が取り込まれると ER ストレスが引き起こされアポトーシスが誘導されるという報告がある。最近の研究で *U. parvum* Serovar 3 Strain SV3F4 のゲノム DNA 解析 (Wu et al, 2014) を行ったところ Serovar 3 Strain SV3F4 に特徴的な配列 (UpVF) が存在することが明らかになった。この UpVF 遺伝子を細胞に導入した際、一過性導入で細胞死が引き起こされている事が示された事から、この遺伝子が *U. parvum* が宿主細胞内で生存するのに関与しているのではないかと考えられる。*U. parvum* が宿主細胞内に侵入した際に ER ストレスを引き起こしているのか、また UpVF 遺伝子が宿主細胞内での生存に関してどのように作用しているのか調べる。さらに *U. parvum* 感染によってアポトーシスの誘導が抑えられると感染細胞の

不死化が起きて癌が誘導されるのではないかと考えられることから、ウレアプラズマ感染細胞と UpVF を安定発現する細胞を用いて抗癌剤に対する抵抗性を示すのか調べる。

3. 研究の方法

早産胎盤(在胎週数 26 週、重症絨毛膜羊膜炎)由来臨床分離株 (*U. p.* OMC-P162 株) を使用した。*U. parvum* を細胞培養液中に加え、*U. parvum* が宿主細胞の ER ストレスを引き起こしている可能性を明らかにする為に、ウエスタンブロッティングで ER stress 関連タンパク質の検出、ER stress 関連因子の miRNA の発現レベルについて 3D digital PCR で調べる。さらに Serovar 3 Strain SV3F4 に特徴的な配列 (UpVF) を用いて *U. parvum* を感染させた時と同様の現象が起きるのか比較検討する為に UpVF を安定発現する細胞株を作製し機能解析を行う。さらに UpVF を安定発現する細胞用いて抗癌剤に対する抵抗性について調べ、コントロールと比較して UpVF 発現細胞で抗癌剤抵抗性を明らかにする。また、Nude mice に UpVF を発現する細胞を xenograft し、腫瘍を形成させて *U. parvum* 由来 UpVF の抗癌剤に対する抵抗性について *in vivo* の系で調べる。抗癌剤の抵抗性については、腫瘍の大きさを調べて検討する。

4. 研究成果

U. parvum を HeLa 細胞に感染させて 3 時間後と 24 時間後に ER stress 関連タンパク質の発現量についてウエスタンブロッティングを行ったところ、PERK, P-eIF2 α の発現量がコントロールと比較して感染 24 時間後に増加しているのが示されたが、ATF4, XBP1, chop の発現については確認できなかった。*U. parvum* のゲノム DNA の解析を行い機能未知のタンパク質の中から酵母の成長を抑制した遺伝子 (UpVF) を選択した。UpVF は酵母の成長を抑制し HeLa 細胞に導入すると細胞死が引き起こされているのが観察された。HeLa 細胞に EGFP-UpVF を安定発現する細胞株を作製し、ER に局在するか調べたところ ER と共局在しているのが確認された。そこで、EGFP-UpVF を安定発現する細胞で *U. parvum* を感染させた時と同様に ER stress が誘導されるか調べたところ ER stress 関連タンパク質の Bip, IRE1 α , P-eIF2 α の発現量が EGFP 発現細胞よりも増加しているのが明らかになった。次に、ER stress に関連する miRNA の発現レベルについて調べたところ、2 つの miRNA が *U. parvum* 感染細胞と、EGFP-UpVF 発現細胞で発現上昇しているのが示された。選択された miRNA の inhibitor を用いて発現を抑制すると、アポトーシスのマーカーである PARP と caspase 3 の cleavage が確認され、アポトーシスの誘導が起きていることが示唆された。ウエスタンブロッティングの結果で *U. parvum* 感染細胞や UpVF 発現細胞で chop の発現が抑えられていたことから、これらの細胞でアポトーシスの誘導が抑えられ、細胞の不死化が誘導されて癌化するのではないかと考えられる。UpVF が発現している細胞でアポトーシスの抑制が明らかになったことから *U. parvum* 感染細胞や、EGFP-UpVF 発現細胞での抗がん剤 (アクチノマイシン D, シスプラチン、パクリタキセル) の抵抗性について調べた。*U. parvum* 感染細胞にアクチノマイシン D 処理すると、非感染細胞と比較して細胞生存率が 1.3 倍高いことが示された。さらに EGFP-UpVF 発現細胞でもアクチノマイシン D 処理すると感染細胞と同様に抗がん剤への抵抗性を示した。次に EGFP-UpVF 細胞にシスプラチン処理して生存率について調べたところ、EGFP-UpVF を発現している細胞でコントロールと比較して約 3.4 倍生存率が上昇していた。パクリタキセル処理ではコントロールと比較して UpVF を発現している細胞で 2 倍生存率が上昇していた。さらに放射線抵抗性について colony formation assay で調べたところ、UpVF を発現している細胞でコントロールよりも生存率が上昇していた。これらの結果は、UpVF が放射線抵抗性や化学抵抗性を示唆していた。*in vivo* で UpVF の抗がん剤に対する抵抗性について

調べる為に、nude mice に UpVF を発現する細胞の xenograft assay を行った。腫瘍の大きさが 100 mm³ に成長してから抗がん剤であるシスプラチン又はパクリタキセルを腹腔内注射してマウスの生存期間について観察したところ、EGFP-UpVF を発現する細胞を xenograft したマウスとコントロール細胞を xenograft したマウスとでエンドポイントを比較した。コントロールを xenograft したマウスの方で UpVF を発現する細胞を xenograft したマウスよりもエンドポイントが長いことが示された。これらの結果は、EGFP-UpVF 発現細胞の xenograft は in vivo で抗がん剤に対して薬剤耐性を獲得したと考えられる。これらの結果から in vitro での感染継続のメカニズムについて新しい知見を示し、最小の微生物である *Ureaplasma* が子宮頸がんの悪性腫瘍のエンハンサーとして働いている可能性があることを示した。

引用文献

Chauhan S, Kumar S, Jain A, Ponpuak M, Mudd MH, Kimura T, Choi SW, Peters R, Mandell M, Bruun JA, Johansen T, Deretic V (2016) TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. *Developmental cell* **39**: 13-27

Drago F, Herzum A, Ciccicarese G, Dezzana M, Casazza S, Pastorino A, Bandelloni R, Parodi A (2016) *Ureaplasma parvum* as a possible enhancer agent of HPV-induced cervical intraepithelial neoplasia: Preliminary results. *Journal of medical virology* **88**: 2023-2024

Li YH, Brauner A, Jonsson B, Van der Ploeg I, Soder O, Holst M, Jensen JS, Lagercrantz H, Tullus K (2001) Inhibition of macrophage proinflammatory cytokine expression by steroids and recombinant IL-10. *Biology of the neonate* **80**: 124-132

Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ (2009) Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *American journal of obstetrics and gynecology* **201**: 306 e301-306

Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I (2010) Placental features of chorioamnionitis colonized with *Ureaplasma* species in preterm delivery. *Pediatric research* **67**: 166-172

Nishiumi F, Ogawa M, Nakura Y, Hamada Y, Nakayama M, Mitobe J, Hiraide A, Sakai N, Takeuchi M, Yoshimori T, Yanagihara I (2017) Intracellular fate of *Ureaplasma parvum* entrapped by host cellular autophagy. *MicrobiologyOpen* **6**

Paton GR, Jacobs JP, Perkins FT (1965) Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with *Mycoplasma*. *Nature* **207**: 43-45

Rogers MB (2011) *Mycoplasma* and cancer: in search of the link. *Oncotarget* **2**: 271-273

Shimizu T, Kida Y, Kuwano K (2011) Cytoadherence-dependent induction of inflammatory responses by *Mycoplasma pneumoniae*. *Immunology* **133**: 51-61

Uchida K, Nakahira K, Mimura K, Shimizu T, De Seta F, Wakimoto T, Kawai Y, Nomiya M, Kuwano K, Guaschino S, Yanagihara I (2013) Effects of *Ureaplasma parvum* lipoprotein multiple-banded antigen on pregnancy outcome in mice. *Journal of reproductive immunology* **100**: 118-127

Wu HN, Nakura Y, Motooka D, Nakamura S, Nishiumi F, Ishino S, Kawai Y, Tanaka T, Takeuchi M, Nakayama M, Fujita T, Yanagihara I (2014) Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* Serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan. *Genome announcements* **2**

Xiaolei C, Taot H, Zongli S, Hongying Y (2014) The role of *ureaplasma urealyticum* infection in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *European journal of gynaecological oncology* **35**: 571-575

Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Yanagihara I, Saito S, Tsutsumi Y (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nature nanotechnology* **6**: 321-328

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Michinobu Yoshimura, Fumiko Nishiumi, Heng Ning Wu, Yukiko Nskura, Itaru Yanagihara	4. 巻 45
2. 論文標題 Pathogenesis of Ureaplasma infection in perinatal and neonatal medicine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本マイコプラズマ学会雑誌	6. 最初と最後の頁 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumiko Nishiumi, Itaru Yanagihara	4. 巻 44
2. 論文標題 Analysis of exosomes derived from U. parvum-infected HeLa cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本マイコプラズマ学会雑誌	6. 最初と最後の頁 21-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitobe Jiro, Nishiumi Fumiko, Yanagihara Itaru, Yamamoto Shouji, Ohnishi Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Superstructure formation by RodZ hexamers of Shigella sonnei maintains the rod shape of bacilli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0228052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0228052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Michinobu Yoshimura, Fumiko Nishiumi, Heng Ning Wu, Yukiko Nskura, Itaru Yanagihara
2. 発表標題 Pathogenesis of Ureaplasma infection in perinatal and neonatal medicine
3. 学会等名 The Joint Congress of the 7th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology [AOM] And the 45th Meeting of the Japanese Society of Mycoloaology [JSM]（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西海史子, 柳原格
2. 発表標題 Ureaplasma parvum 感染細胞からの U. parvum 放出と二次感染メカニズムの解明
3. 学会等名 第 44 回日本マイコプラズマ学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳内 知哉 ¹ , 小田垣 瑞穂 ¹ , 高田 果歩 ¹ , 松川 哲也 ¹ , 西海 史子 ² , 名倉 由起子 ² , 柳原 格 ² , 梶山 慎一郎 ¹
2. 発表標題 Jatropha curcas の産生するホルボールエステル類の生理活性評価
3. 学会等名 第 69 回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三戸部 治郎 ¹ , 西海 史子 ² , 柳原 格 ² , 大西 真 ¹
2. 発表標題 赤痢菌の 3 型分泌装置の発現に関わる細胞骨格蛋白 RodZ の RNA 結合活性と多量体形成機構の解析
3. 学会等名 第 91 回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東 和俊, 西海 史子, 名倉 由起子, 呉 恒寧, 吉村 芳修, 柳原 格
2. 発表標題 Ureaplasma parvum のマウス精子への影響
3. 学会等名 第 46 回日本マイコプラズマ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三戸部 治郎, 西海 史子, 柳原 格, 大西 真
2. 発表標題 赤痢菌の細胞骨格蛋白RodZの多量体形成機構と局在の解析
3. 学会等名 第 92 回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----