

平成21年5月13日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590447
 研究課題名（和文） 肺炎クラミジア感染による宿主細胞の機能調節と miRNA 発現変動の生化学的解析
 研究課題名（英文） Biochemical analysis of the effect of *Chlamydia pneumoniae* infection on miRNA expression and host cellular functions.
 研究代表者
 平井 到 (HIRAI ITARU)
 大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号:00359994

研究成果の概要：本研究では、リンパ球への肺炎クラミジア感染に伴う宿主細胞のシグナル分子やアポトーシスに関与する分子の変動など及びマイクロ RNA(miRNA)発現の変動の点に着目しながら、クラミジア感染の宿主細胞への影響について解明することを目的とした。その結果クラミジア感染により宿主細胞の増殖が抑制され、宿主細胞の miRNA-214 の発現量の増加が観察された。肺炎クラミジア感染による cyclinD3 の発現抑制を介する細胞増殖の調節においては、mTOR 経路の関与が最も疑われた結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生化学，分子微生物学
 科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）
 キーワード：微生物，シグナル伝達，遺伝子

1. 研究開始当初の背景

偏性細胞内寄生性細菌である *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae* (肺炎クラミジア) は肺炎や気管支炎などの呼吸器感染症の原因菌であることが知られているが、最近では動脈硬化性疾患やアルツハイマー病などの脳神経疾患に関与することが示唆されてきていた。これら肺炎クラミジア感染との関与が指摘されている疾患はいずれも慢性疾患であるため、その病態形成には肺炎クラミジアがリンパ球やマクロファージなどの

宿主細胞内で持続感染を樹立することが必須であると考えられた。持続感染の樹立と持続感染が引き起こす宿主細胞の反応については、例えば、クラミジア感染により宿主細胞のアポトーシスが抑制されているとの報告がいくつか見られるが、いずれも、染色体 DNA のラダーの抑制を示すだけのものや、蛍光抗体法による BAX のミトコンドリアへの移行を示すだけのものにとどまっており、国内、国外の研究機関を問わず、生化学的、分子生物学的手法を用い、どのような分子がどのよ

うに調節され、アポトーシスに至る経路が阻害されているのかに迫る研究はいまだ十分になされているとはいいがたかった。クラミジア感染による細胞周期の調節についても、Balsara らによって *Chlamydia trachomatis* が宿主細胞のサイクリン B1 を分解するという報告がなされたが、研究に用いた細胞種などによっては逆にクラミジア感染により細胞増殖が促進されたとの報告などもあり、クラミジア感染がどのような分子、経路を刺激し細胞周期を調節し、持続感染の樹立につながっていくのかについては、やはり十分に研究されているとはいいがたかった。研究代表者はそれまで細胞周期やアポトーシスについて生化学的あるいは分子生物学的手法を用いて研究してきており、リンパ球への肺炎クラミジア感染を明らかにした研究分担者の主たる研究分野である肺炎クラミジア感染と宿主細胞応答と有機的に結びつくことで、より詳細な解析の展開が期待できると考えられ、さらには生体機能を微調整すると考えられている miRNA(マイクロ RNA)の動態を追うことで、新たな研究分野に繋がる可能性も含んでいると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、研究分担者が明らかにしたリンパ球への肺炎クラミジアの感染モデルや培養細胞株を用いたマクロファージへの感染モデルを用い、肺炎クラミジア感染に伴う宿主細胞のシグナル分子やアポトーシスに関与する分子の分子会合の有無やリン酸化、切断、ユビキチン化およびその他の修飾の有無、量的な変化などの点に着目しながら、生化学的、分子生物学的手法を用い以下の点について解明することを目指した。

- (1) 肺炎クラミジア感染により、アポトーシスを抑制するか。
- (2) どのようなタンパク質がどのような経路でアポトーシスの調節に関与しているか。
- (3) アポトーシスの抑制が細胞内の肺炎クラミジアの生活環とどのように関連しているか。
- (4) 肺炎クラミジア感染による、アポトーシス調節は FAS 刺激や TNF- α などの免疫細胞による細胞外刺激や、DNA 傷害性薬剤などの内在性刺激によりどのように変化するか。
- (5) 肺炎クラミジア感染により、宿主細胞の細胞周期に変化が生じるか。
- (6) 変化が生じるとすれば細胞周期のどのステージでどのような変化が生じるか。
- (7) 細胞周期の変化が細胞内の肺炎クラミジアの生活環にどのような影響を与えるか。
- (8) 肺炎クラミジア感染により miRNA の発現状況に変動が生じるか。

- (9) 生じるとすればどのような分子種であり、どのような経路に関与している分子であるか。

3. 研究の方法

(1)肺炎クラミジア感染とアポトーシスについて

リンパ球系細胞あるいはマクロファージ系細胞を用い、一定量の肺炎クラミジアを感染させ、感染後一定時間において細胞を回収し、カスパーゼ 3, 8, 9 などのプロセッシング、DNA ラダー、PARP などカスパーゼの基質などの切断などいくつかの項目について観察した。陰性コントロールとして、感染なしのものや熱処理した肺炎クラミジアをもちいた。また、細胞外刺激として DNA 傷害剤や各種キナーゼ阻害剤などを用い、アポトーシスが誘導されるか、あるいは抑制されるかについて検討した。

(2)肺炎クラミジア感染と細胞周期について

リンパ球系細胞あるいはマクロファージ系細胞を用い、一定量の肺炎クラミジアを感染させ感染後一定時間において細胞を回収し、細胞数の変化、細胞分裂周期の解析、細胞内情伝達経路を構成する分子のリン酸化程度などの項目について観察した。また、リンパ球系細胞あるいはマクロファージ系細胞をチミジンプロック法などにより特定の周期に細胞を同調させ、一定量の肺炎クラミジアを感染させ、一定時間後の肺炎クラミジアの感染率、細胞周期の解析、細胞数などについて観察した。

(3)肺炎クラミジア感染と CyclinD3 の安定性について

細胞周期の研究に関してサイクリンの安定性に影響を与えているかについて検討した。標的細胞に肺炎クラミジアを感染させ、G1 期を制御している cyclinD3 の安定性をイムノブロット法により検索した。また、転写・翻訳のどちらの過程に影響を与えているかについて調べるために RT-PCR を行い、転写量について検討する。肺炎クラミジアの特異的な作用であることを確認するために熱処理した肺炎クラミジアおよび UV 処理した肺炎クラミジアを用い同様な検討を行った。

(4)肺炎クラミジア感染と宿主細胞の miRNA 変動について

リンパ球系細胞あるいはマクロファージ系細胞を用い、一定量の肺炎クラミジアを感染させ、感染後一定時間において細胞を回収し、低分子量の RNA を回収した。

回収後逆転写酵素による逆転写反応を行い、特異的なプライマーを用い、成熟 miRNA の量をリアルタイム PCR 法により測定した。また、miRNA が肺炎クラミジア感染にどのような影響を与えるかを示す目的で miRNA の成熟に関する Drosha 及び Dicer を標的とした組換え miRNA を作製した。また作製された組換え miRNA を用い、それが実際に効果を示し標的の遺伝子をノックダウンするか否かについて、定量 PCR を用い確認した。

4. 研究成果

(1)肺炎クラミジア感染とアポトーシスについて

肺炎クラミジア感染とアポトーシスの関連については幾つかの報告があるが、感染のタイミングや肺炎クラミジアの標的細胞の種類によってはアポトーシスが促進される、もしくは抑制されると相反する報告がされてきている。このことから本研究では一般的に研究に用いられる HeLa 細胞と、本研究の分担研究者が明らかにしてきた宿主細胞としてのリンパ球細胞株 Jurkat 細胞をもちい、肺炎クラミジア感染が宿主細胞のアポトーシスにどのように影響を与えるかについて検討した。その結果、HeLa 細胞においてはトポイソメラーゼ阻害剤 VP-16 により、カスパーゼ-3、及び 9 の切断が確認されたが、クラミジア感染のみによってはカスパーゼの切断は観察されず、宿主細胞にアポトーシスを誘導しないことが示された。また、クラミジア感染成立後の宿主細胞はアポトーシス抵抗性をもち、ATP などの組織障害により細胞外に不出されアポトーシス誘導能を持つ分子によってもカスパーゼの切断は観察されず、宿主細胞にアポトーシスが誘導されないことなどが明らかになった。

(2)肺炎クラミジア感染と細胞周期について

肺炎クラミジアは肺での肺胞マクロファージへの感染の後、単球やリンパ球に再感染し体内に広がっていくと考えることができる。肺炎クラミジアは動脈硬化などの炎症性疾患の発症に関与しているという報告も多く、この過程ではリンパ球に感染した肺炎クラミジアによるリンパ球の機能調節が、疾患の発症に幾つかの役割を果たしている可能性が示唆されている。これらのことから本研究では、リンパ球を宿主細胞として、肺炎クラミジアがどのように宿主の機能を調節するかについて、細胞増殖、細胞周期の調節に焦点をあて、研究を行った。図. 1 に示したように、肺炎クラミジアの感染により Jurkat 細胞の増殖は肺炎クラミジアの濃度(moi)に依存して

抑制された。

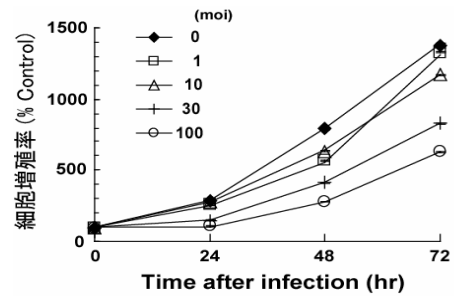


図1 肺炎クラミジア感染による細胞増殖抑制

さらに、宿主細胞の増殖抑制が細胞周期の特定の期の進行を抑制しているかについて検討を行ったが、S 期の増加は観察されたものの、特定の期の有意な増加は観察されなかった。

(3)肺炎クラミジア感染と CyclinD3 の安定性について

cyclin は細胞周期の細胞周期の進行の調節に重要な役割を果たしているタンパク質である。本研究で用いた Jurkat 細胞においては CyclinD3 が G1 期の進行に深く関与していることから、肺炎クラミジア感染が Jurkat 細胞における CyclinD3 の発現量にどのように影響するかについてイムノブロット法を用いて検討した。その結果、肺炎クラミジア感染により図. 2 に示すように肺炎クラミジアの生菌数に依存した CyclinD3 の発現低下を観察した (A)。また、この発現低下は熱処理や UV 処理により死菌にした肺炎クラミジアでは観察されなかったことから生きた肺炎クラミジア感染による直接の結果であることが推察された (B)。

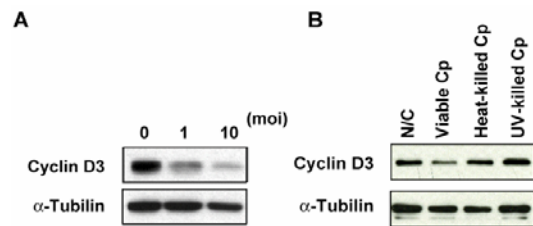


図2. 肺炎クラミジア感染によるCyclinD3の発現抑制

さらに、CyclinD3 の発現抑制がどのようなシグナル伝達経路を介しているかを明らかにする目的で、MAPK 経路、PKA 経路及び mTOR 経路の関与を検討した。肺炎クラミジア感染と共に各種経路に対する阻害剤、もしくは刺激剤を作用させ、CyclinD3 の発現変動をイムノブロット法により観察した。その結果、MAPK 経路及び PKA 経路では CyclinD3 の発現には影響を及ぼさなかったものの、mTOR 経路に作用する薬剤により、肺炎クラミジア感染と同様な CyclinD3 の発現変動が観察され、mTOR 経

路の関与が示唆された。

(4)肺炎クラミジア感染と宿主細胞の miRNA 変動について

miRNA は 20 塩基ほどの長さの一本鎖 DNA であり、標的遺伝子の発現を翻訳段階で調節することで様々な生体反応を調節している。これまでの研究から感染による miRNA の発現の変動は主にウイルスによってなされることが報告されてきている。本研究ではウイルスのような生命環を持つ肺炎クラミジアを用い、肺炎クラミジア感染により、特定の miRNA の発現が変動するか否かについて検討した。成熟 miRNA の測定系としてはいくつかの方法が今までに報告されてきているが、本研究ではヘアピンループ法を改良した、SYBR green を用いたリアルタイム PCR 法を開発し、miRNA の発現量を測定した。予備的な検討から感染の無い状態では miRNA の発現量の変動は 2 倍の範囲に収まることが明らかとなったため、肺炎クラミジアの感染に起因する miRNA の変動としては 2 倍を超えるものを変動有とした。miRNA の種類としては現在までに論文報告によりアポトーシスや癌化、LPS に対する反応性などに関わる miRNA 種を選択し、本研究で検討した。その結果マウスマイクログリア細胞株である EOC2 への肺炎クラミジア感染により miRNA214 が特異的に発現が上昇することが観察された(図 3)。miRNA214 はアポトーシスの制御に関わる miRNA であることから、肺炎クラミジア感染によるアポトーシスの制御に miRNA の変動が関係している可能性が考えられた。

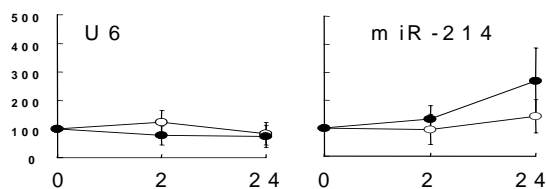


図 3 感染後の時間 (hr)

(5)得られた結果の国内外における位置づけ、インパクト、今後の展望などについて

本研究では動脈硬化などの疾患の発症に原因していると考えられている肺炎クラミジア感染の影響について細胞生物学的に解析したものである。肺炎クラミジアの宿主細胞としてリンパ球を用いた実験は本研究の研究分担者のグループが見出したものであり、その点において本研究は独創的であるといえる。本研究では肺炎クラミジアによる宿主細胞機能の調節の一端が明らかになったといえるが、研究期間内には肺炎クラミジアによる宿主細胞機能の調節機構の詳細をすべて明らかにす

ることはできなかった。今後この点をさらに詳細に検討することで肺炎クラミジア感染による発症機構を明らかにしたい。その過程で得られた知見が動脈硬化などの炎症性疾患の発症予測、発症予防に繋がるとすれば意義深い研究になると考えられる。

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)

- ①Sasaki T, Hirai I, Izurieta R, Kwa BH, Estevez E, Saldana A, Calzada JE, Fujimoto S, Yamamoto Y: Analysis of *Helicobacter pylori* genotype in stool specimens of asymptomatic people. Lab medicine. 2009, accepted. 査読有
- ②Hirai I, Sasaki T, Fujimoto S, Moriyama T, Azuma T, Yamamoto Y: A method for assessment of *Helicobacter pylori* genotype using stool specimens., FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2009, 56(1):63-66. 査読有
- ③佐々木正大, 平井 到, 山本容正: 便中抗原検出及び PCR 法を用いたパナマ健康人における *Helicobacter pylori* 感染の解析, 感染症学雑誌 2009, 83(2):127-132. 査読有
- ④奥野真奈, 平井 到, 佐々木正大, 山本容正: 食品由来ポリフェノールによる *Legionella pneumophila* 増殖抑制活性, 医学と生物学 2009, 153(1): 1-6. 査読なし
- ⑤Matsumoto Y, Fujita T, Hirai I, Sahara H, Torigoe T, Ezoe K, Saito T, Cruikshank WW, Yotsuyanagi T, Sato N: Immunosuppressive effect on T cell activation by interleukin-16- and interleukin-10-cDNA-double-transfected human squamous cell line., Burns. 2009, 35(3):383-389. 査読有
- ⑥佐々木正大, 平井 到, Richard Izurieta, Boo Kwa, 山本容正: 健康人保菌 *Helicobacter pylori* の検出と病原因子遺伝子解析, 臨床と微生物 2008, 35(5):475-480. 査読有
- ⑦Kamiguchi K, Torigoe T, Fujiwara O, Ohshima S, Hirohashi Y, Sahara H, Hirai I, Kohgo Y, Sato N: Disruption of the association of 73 kDa heat shock cognate protein with transporters associated with antigen processing (TAP) decreases TAP-dependent translocation of antigenic peptides into the endoplasmic reticulum., Microbiol Immunol. 2008, 52(2):94-106. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ①榎原 愛 : *Chlamydia pneumoniae* 感染によるヒト白血病由来細胞株 Jurkat 細胞の増殖抑制機序の解明, 第 82 回日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 13 日, 名古屋市
- ②榎原 愛 : *Chlamydia pneumoniae* 感染による宿主リンパ球細胞周期関連蛋白 CyclinD3 の発現調節, 第 61 回日本細菌学会関西支部総会, 2008 年 11 月 8 日, 京都市
- ③田中香苗 : *Chlamydia pneumoniae* 感染による miRNA 発現の解析, 第 61 回日本細菌学会関西支部総会, 2008 年 11 月 8 日, 京都市
- ④榎原 愛 : *Chlamydia pneumoniae* 感染宿主リンパ球細胞増殖抑制機構の解明, 第 26 回日本クラミジア研究会, 2008 年 11 月 1 日, 岐阜市
- ⑤ Itaru Hirai : Genotyping of virulence gene *cagA* of *Helicobacter pylori* in stool specimens from asymptomatic volunteers in Japan and Thailand., 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)/ the Infectious Diseases Society of America (IDSA) 46th Annual Meeting, 2008 年 10 月 26 日, Washington DC, USA
- ⑥田中香苗 : 偏性細胞内寄生性細菌感染に起因する宿主細胞 miRNA 発現の測定, 第 48 回近畿医学検査学会, 2008 年 10 月 18 日, 神戸市
- ⑦榎原 愛 : *Chlamydia pneumoniae* 感染による宿主リンパ球細胞周期関連蛋白 CyclinD3 の発現抑制, 第 48 回近畿医学検査学会, 2008 年 10 月 18 日, 神戸市
- ⑧Tadahiro Sasaki : Epidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in Thai and Japanese healthy people by coprodiagnosis., The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, 2008 年 10 月 6 日, Hanoi, Vietnam
- ⑨ Tadahiro Sasaki : Analysis of *Helicobacter pylori* virulence factor genotypes and intestinal parasites in fecal specimens of healthy subjects., 108th The American Society for Microbiology General Meeting, 2008 年 6 月 1-5 日, Boston, USA
- ⑩和田沙織 : *Chlamydia pneumoniae* 感染による宿主細胞の変化の解析 アポトーシスと miRNA の発現変化, 第 50 回 日本臨床検査医学会近畿支部総会, 2007 年 11 月 24 日, 大阪市

- ⑩和田沙織 : *Chlamydia pneumoniae* 感染による宿主細胞アポトーシスと miRNA 発現変化, 第 60 回日本細菌学会関西支部総会, 2007 年 11 月 10 日, 吹田市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 到 (HIRAI ITARU)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号:00359994

(2) 研究分担者

山本 容正 (YAMAMOTO YOSHIMASA)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20010100

(3) 連携研究者

なし