

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07559

研究課題名(和文)ヘリコバクター・シネディのマクロファージ感染指向性に着目した病態発症機構の解明

研究課題名(英文) Study of pathogenic mechanisms of *Helicobacter cinaedi* focused on its tropism for macrophages.

研究代表者

三宅 正紀 (Miyake, Masaki)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00295560

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)：ヘリコバクター・シネディ株をU937細胞に感染させ、菌の細胞内動態を透過型電子顕微鏡にて観察した。感染3時間後において、菌体がファゴソーム内に取り込まれている一方、細胞質にも局在することを確認した。また、ファゴソーム内に取り込まれた菌体がファゴソーム膜へ接着している所見、さらに細胞質側へ菌体が大きく陥入する所見を得た。これらより、ファゴソーム内に取り込まれたHcの一部は、何らかの機構により細胞質に回避する可能性が示唆された。また、これらと同様の所見が、型分泌装置(T6SS)Hcp及びDotU変異株の感染時においても観察されたことから、この一連の感染現象にT6SSは関与しないことが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘリコバクター・シネディは、培養が困難であったことから、臨床における検出件数が少なく、その病原性も過小評価されてきたが、近年では、敗血症、蜂窩織炎等の原因となる病原菌であることがようやく知られてきた。しかし、病原性解析の報告は非常に少なく、病原性状や病原因子及びその機能はほとんど知られていない。今回得た、マクロファージに感染した本菌の一部が、ファゴソームから脱出し、細胞質へエスケープする可能性を示唆する所見は、本菌が細胞内生残性を保有し、本菌による感染症が高率に再燃する原因に繋がる可能性を含め、病原性解析を進める上で極めて興味深い。今後、本感染現象の分子機構・病原性との関連を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：We carried out an infection experiment of *Helicobacter cinaedi* using human macrophage-like cell U937. Observation of U937 cells infected with wild strains for 3 hours by transmission electron microscopy (TEM) revealed that the bacteria were localized in both the phagosome and cytoplasm, and interestingly, bacteria in phagosomes were likely invaginating into the cytoplasm. These results may suggest that *H. cinaedi* in the phagosome may be partially killed, but small number of those bacteria might escape into the cytoplasm for avoiding bactericidal activity of host cells. The same phenomenon was observed on infection with the mutants of Hcp and Dot, which were the component of the type VI secretion systems (T6SS). It was suspected that T6SS was not involved in a series of these infection phenomenon.

研究分野：細菌学

キーワード：ヘリコバクター・シネディ 再燃 マクロファージ 細胞内生残性 型分泌装置 ファゴソーム 細胞質へエスケープ CAIP

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・シネディ (*Helicobacter cinaedi*) による感染症の多くは、免疫能低下症例における菌血症、敗血症であり、日和見感染症としての報告であるが、免疫異常のない術後患者及び健康人における敗血症・蜂窩織炎の事例も報告されている。本菌は、微好気環境下、血液寒天培地上で薄く膜を張ったシート状に発育するという特殊な培養性状を示すが、通常、培養条件が厳しく、培養効率が極端に悪いことから、これまで臨現の現場で感染症起炎菌として見逃されてきた可能性が極めて高い。基本的に、セフェム系及びカルバペネム系抗菌薬に良好な感受性を示し、これらの計画的な点滴静注にて速やかな症状の改善が見られる。しかしながら、当該抗菌薬治療において、頻繁に再燃することが多数報告され、その原因が現在全く不明であることから、臨床上看過できない問題となっている。

近年、微生物同定技術の進歩に伴って、本菌による臨床事例が多く報告されるようになってきたが、これまでその重要性の認識が乏しかったことで、本菌の病原因子とその作用機序を含む病態形成機構の報告は皆無である。また、*H. cinaedi* 感染症の抗生物質治療後の再燃の多発について、その原因の科学的説明が一切なされていないのは、*H. cinaedi* の宿主感染後の動態が不明であるためである。一方、最近、*H. cinaedi* はマクロファージ (M₁) 指向性を示し、感染 M₁ のコレステロール受容体の発現に変化をもたらすことで、細胞内の脂肪蓄積を誘導し、その泡沫化を引き起こすことが明らかにされ、動脈硬化発症における *H. cinaedi* の病原的役割も示された。しかしながら、原因となる菌体因子と泡沫化に至る分子経路はわかっていない。

このように *H. cinaedi* による病態形成の分子機構はほとんど明らかではない。本研究では、これまで細菌学者が取り上げてこなかった *H. cinaedi* の感染機構を、本菌の臨床での重要性が増してきた今、未だ不十分な本菌の分子遺伝学的解析手法を確立しながら、分子レベルで明らかにする点は独創的であり、これにより得られる知見は、本感染症の合理的な感染予防・治療法の提案・開発に資すると考える。

2. 研究の目的

本研究では、*H. cinaedi* 感染症の病態形成機構を解明するため、特に本菌の M₁ への優位な感染性に着目し、菌がどのような機構によって M₁ と相互作用し、細胞内生存を可能するか、さらに、その感染が一方で如何に M₁ の泡沫化を誘導するのかについて、本菌の病原因子候補である型分泌装置 (T6SS) 及びエフェクター、さらに動脈硬化症促進因子として報告されている CAIP (*Sci. Rep.* 7: 40515, 2017) の遺伝子変異株を構築して、野生株との比較実験を行い、その病態形成への関与について精査した。

3. 研究の方法

H. cinaedi 病原因子候補遺伝子変異株の構築

H. cinaedi 病原因子の候補として、T6SS の主要構成因子 DotU コード遺伝子及びエフェクター Hcp コード遺伝子、さらに動脈硬化症促進因子 CAIP (fibronectin/fibrinogen binding protein, neutrophil-activation protein (NapA) コード遺伝子に着目し、これらの遺伝子欠損株を構築した。*H. cinaedi* の遺伝学は確立されていないが、本菌変異株作製を報告している 2 論文 (*Infect Immun.*, 77, 2508-16, 2009; *Infect Immun.*, 80, 921-8, 2012) で示されている方法に準じて行った。

上記標的菌体因子コード遺伝子の一部を PCR にて増幅し、*H. cinaedi* 菌体内で安定に維持されない pGEM-T ベクターにクローニングした。さらに当該遺伝子内にカナマイシン (Km) 耐性遺伝子カセット (*aphA-3*) を挿入したプラスミドクローンを作製した。これらをエレクトロポレーションによる形質転換法にて、*H. cinaedi* 野生株 PAGU611 菌体内に導入し、クローンプラスミド及びゲノムの間で相同組換え (ダブルクロスオーバー) を起こすことで創出される当該遺伝子変異株を分離した。

H. cinaedi CVF 変異株の M₁ 感染における細胞内生残性・増殖性解析

我々は、*H. cinaedi* は低濃度の菌液を塗布すれば、適当な湿潤条件下、寒天培地上でコロニーを形成する条件を把握しているため、感染細胞内の生菌数の評価は、コロニーカウント法 (感染細胞ライセートを寒天培地に塗布して発育してくるコロニーをカウント) を適用した。ヒト M₁ 様細胞 U937 へ、PAGU611 株及び作製した T6SS 変異株を 1 時間感染させる。細胞外菌をゲンタマイシン処理にて除去した後、感染 2, 6, 12, 24, 48 時間後の感染細胞ライセートを使用し、コロニーカウント法にて継続的な細胞内生菌数を評価した。

免疫蛍光染色法及び透過電子顕微鏡 (TEM) による *H. cinaedi* 株の M₁ 内動態解析

1) 菌含有ファゴソームのリソソームとの融合性の検証

PAGU611 株を U937 細胞へ感染させ、菌周囲への後期エンドソーム/リソソームマーカー LAMP-2 の経時的な集積性を、特異的抗体、蛍光標識試薬を利用した共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察し、感染 M₁ 内におけるエンドソーム・リソソーム系等による殺菌システムと菌の経時的な細胞内トラフィッキングを解析した。

2) *H. cinaedi* CVF 変異株感染 M₁ の TEM 観察

H. cinaedi 野生株及び T6SS 変異株を U937 細胞へ感染させ、固定・包埋後、超薄切片を作製し、TEM にて観察した。

H. cinaedi 感染による M₁ の泡沫化誘導の精査

C57BL/6 または BALB/c マウスをチオグリコール酸培地にて 4 日間刺激後採取したマウス腹腔 M₁ に、PAGU611 株及び CAIP 変異株を 24 時間感染させ、各感染細胞を Oil Red O 染色し、細胞内における脂肪滴形成性を検出・評価した。

4. 研究成果

Hc T6SS 主要構成因子 DotU、エフェクター Hcp、動脈硬化症促進因子 CAIP の Km 耐性遺伝子カセット (*aphA-3*) 挿入変異株の構築に成功した。

Hc 野生株の U937 細胞感染において、経時的な細胞内菌数の緩やかな減少は見られるものの、72 時間後まで細胞内に Hc が残存していた。よって、M₁ に感染した Hc の一部は、比較的長期にわたって細胞内に残存することが明らかとなった。また、T6SS の構成因子 Hcp 及び DotU 変異株についても、野生株とほぼ同様な細胞内菌数の経時的な変化を示し、それら変異による顕著な違いは見られなかった。

-1) Hc 野生株を U937 細胞に感染させた際、感染早期の 3 時間後には、後期エンドソーム/リソソームマーカー LAMP-2 と菌の共局性が 70% 以上を示し、ファゴソーム内の菌の大部分がリソソームによる殺菌攻撃を受けることが示唆された。

-2) Hc 野生株感染 3 時間後における U937 細胞の TEM 観察では、菌体がファゴソーム内に取り込まれている一方、細胞質に局在する所見や、ファゴソーム内において菌体がファゴソーム膜へ接着し、さらに細胞質側へ陥入する所見を得た。これらより、ファゴソーム内に取り込まれた Hc の一部は、何らかの機構により細胞質に回避する可能性が示唆された。これは M₁ に感染した一部の Hc が、長期にわたって細胞内に生残する原因となるのかもしれない。また、これらと同様の所見が、Hcp 及び DotU 変異株の感染時においても観察されたことから、この一連の感染現象に T6SS は関与しないことが推測された。

マウス腹腔 M₁ に Hc 野生株及び CAIP 変異株を感染させ、感染細胞における脂肪滴形成性を比較観察した。未感染細胞と比較して、感染 24 時間後では、両感染細胞内に明らかな脂肪滴の形成を確認したが、その形成性に有意な差はみられなかった。今後、感染条件の検討、構築した CAIP 変異株のその他性状精査を行った上で、再検討の余地がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三宅正紀
2. 発表標題 新興感染症病原体ヘリコバクター・シネディのマクロファージ内における部分的細胞内生残性に導く特異的細胞内動態の解析
3. 学会等名 USフォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅天地人、三宅正紀、山口美幸、前田久美子、小野内拓也、河村好章、今井康之
2. 発表標題 Helicobacter cinaediの感染マクロファージにおける部分的細胞内生残性に導く特異的細胞内動態の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅正紀、河村好章、今井康之
2. 発表標題 新興感染症菌ヘリコバクター・シネディのヒトマクロファージ感染における細胞内動態の解析
3. 学会等名 USフォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Amon Miyake, Masaki Miyake, Miyuki Yamaguchi, Tetsuya Furukawa, Takuya Onouchi, Kumiko Maeda, Yasuyuki Imai
2. 発表標題 Specific behavior of Helicobacter cinaedi during macrophage infection for partial intracellular survival
3. 学会等名 第24回静岡健康・長寿学術フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 大橋典男/編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 215
3. 書名 栄養科学イラストレイテッド 微生物学	

1. 著者名 今井康之・増澤俊幸/編	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 432
3. 書名 微生物学 病原微生物と治療薬 改訂第8版	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------