

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08934

研究課題名（和文）クラミジア感染による宿主DNA損傷の修復制御が炎症誘導に果たす役割

研究課題名（英文）Host DNA damage responses and the regulations in chlamydial infections

研究代表者

松尾 淳司（MATSUO, Junji）

北海道医療大学・医療技術学部・教授

研究者番号：50359486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：クラミジア感染における宿主細胞修飾を明らかにするために、クラミジア感染細胞のDNA損傷誘導ならびにその制御について検討した。クラミジア感染細胞のDNA損傷はクラミジア感染後期に検出された。そこでDNA損傷誘導メカニズムを明らかにするために、ROS産生に関わる遺伝子ノックダウン細胞で検討したものの明らかな違いは見いだせなかった。一方、損傷DNAの応答に関わる遺伝子群の発現解析をqPCRアレイで行ったところ、発現変動する遺伝子群が見いだされた。このように、クラミジア感染細胞において損傷DNAの誘導とその応答が発現制御されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性器クラミジア感染症は無症状なことも多いため放置された結果、不妊や骨盤内炎症性疾患など重篤な結果を引き起こすことがある。そのため、クラミジア感染細胞における細胞応答を理解することは、性器クラミジア感染症の病態解明や治療・予防の上で重要となる。DNA損傷は変異に繋がる可能性があるため、本研究では、性器クラミジア感染細胞のDNA損傷に焦点を当てて検討した。その結果、クラミジア感染細胞において損傷DNAの誘導とその制御が行われていることが示唆されており、これらの結果はクラミジア感染症の病態を理解に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：To understand host cell responses induced by an obligate intracellular bacterium, Chlamydia, we tried to investigate Chlamydia-induced host DNA damages and the regulations. As a result, host DNA damages were detected at late stage of Chlamydia infections. Although we also assessed host DNA damage inductions induced by Chlamydia using knockdown cells, obvious differences were not seen in these cells. On the other hands, when expressions of genes on DNA damage responses were analyzed in Chlamydia-infected cells using qPCR array, upregulated or downregulated genes were identified. Thus, host DNA damage responses may be regulated in Chlamydia infections.

研究分野：感染生物学

キーワード：クラミジア DNA損傷

## 1. 研究開始当初の背景

性器クラミジア感染症は、偏性細胞内寄生細菌 *Chlamydia trachomatis* によって引き起こされる世界でも主要な性行為感染症 (STI) である。日本においても、性器クラミジア感染症は定点当たりの発生数が他の STI と比較して最も多い。このように性器クラミジア感染症は感染者が多い一方、その大部分は無症状であるために治療されないまま放置された結果、上行性に感染が拡大し、不妊や骨盤内炎症性疾患などの重篤な結果を引き起こすことも知られている (Clin Microbiol Rev, 28:969-84, 2015)。

性器クラミジアは偏性細胞内寄生細菌という性質をもつために、宿主細胞内での感染・増殖する必要があるが、それを容易にするために宿主細胞の様々な機能を巧みに利用している (Nat Rev Microbiol, 14:385-400, 2016)。性器クラミジア感染で産生される活性酸素種 (ROS) もその1つと考えられており、例えば、性器クラミジア感染で産生された ROS はミトコンドリア NLRX1 依存的に増幅され、過剰な ROS 産生がクラミジアの増殖を促進している (J Biol Chem, 285:41637-45, 2010)。その一方、ROS は炎症応答や細胞死など様々な役割を持つ生体内分子でもある。また、過剰に産生された ROS は宿主細胞内に存在する DNA やタンパク質などの分子を酸化するため、様々な細胞傷害を引き起こすことも知られている。このように傷つけられた DNA は変異の原因となるため、損傷 DNA を修復する遺伝子群の発現促進などの細胞応答することが考えられる。しかしながら、これら損傷 DNA を修復する遺伝子群は損傷 DNA を修復するのみならず、様々な免疫応答にも関与することも示唆されている。クラミジア感染においても宿主細胞に様々な細胞応答を引き起こすが、近年クラミジア感染細胞において、8-オキシグアニン (oxoG) や二本鎖 DNA 切断 (DSB) などの DNA 損傷が誘導されることが明らかになってきた (Immunity, 36:401-14, 2012; Cell Host Microb, 13:746-58, 2013)。その一方、これらの損傷 DNA 誘導については不明な点も多い。そのため、クラミジア感染時の病態形成にこのような細胞応答が関与している可能性も考える。このようにクラミジア感染細胞における損傷 DNA 誘導ならびにその細胞応答の解析は、性器クラミジア感染症の病態形成の理解となるのみならず、治療や予防の開発に繋がる可能性があるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

性器クラミジアは宿主細胞に感染・増殖する際に宿主細胞に様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。例えば、8-オキシグアニン (oxoG) や二本鎖 DNA 切断 (DSB) などの損傷 DNA がクラミジア感染時に宿主細胞に誘導されていることが明らかになってきた (Immunity, 36:401-14, 2012; Cell Host Microb, 13:746-58, 2013)。しかしながら、これらの損傷 DNA の誘導ならびにその制御応答については不明な点も多い。このようなクラミジア感染細胞の損傷 DNA は変異誘導に関与する可能性があるため、クラミジア感染時の病態形成に何らかの役割がある可能性があるものの、その詳細は不明である。そこで本研究では、まずクラミジア感染細胞における宿主細胞の DNA に損傷が誘導されていることの確認を行った。次に、クラミジア感染細胞における損傷 DNA の制御応答する遺伝子群に着目しその遺伝子発現解析を網羅的に行うとともに、阻害剤を用いた解析も行った。

## 3. 研究の方法

### (1) クラミジアおよび細胞株

本研究では、クラミジア株として性器クラミジア血清型 L2 434/Bu 株を、また細胞株としてヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞を使用した。実験に使用する性器クラミジアの感染力価の測定は、性器クラミジアを HeLa 細胞に遠心吸着法にて感染させた後、感染 48 時間後に FITC 標識抗クラミジア LPS 抗体 (デンカ生研) を用いた免疫染色法を行い、形成された封入体を計数することで行った。

### (2) 宿主細胞 DNA 損傷の観察

クラミジア感染により宿主細胞に DNA 損傷が誘導されていることは、性器クラミジアを HeLa 細胞に感染させ、抗 8-オキシグアニン抗体 (2 種類、Santa Cruz および JafCA) を用いた免疫染色法ならびに抗  $\gamma$ H2AX 抗体 (Cell Signaling) を用いたウェスタンブロット法を行うことで確認した。

### (3) ノックダウン細胞の作製

NLRX1 遺伝子の発現を抑制する siRNA 配列 (J Biol Chem, 285:41637-41645, 2010) を含む DNA を、pBAsi-hU6 pur ベクター (タカラバイオ) に挿入した。さらにノックダウン細胞株を作製するために、遺伝子導入後に puromycin で選択しクローニングした。NLRX1 遺伝子の発現抑制の確認には、抗 NLRX1 抗体 (Proteintech) によるウェスタンブロット法で行った。コントロール配列は、以前に報告されたものを使用した (Infect Immun, 83:2917-25, 2015)。

#### (4) 遺伝子発現解析

性器クラミジアを HeLa 細胞に感染させ、RNA を抽出 (日本ジェネティクス) し、cDNA 合成の後に qRT-PCR で宿主細胞の遺伝子発現解析を行った。また、損傷 DNA の修復制御に関わる遺伝子群の網羅的な発現解析では、性器クラミジア感染 HeLa 細胞より RNA を抽出し (Roche)、cDNA 合成をした後に市販の網羅的遺伝子発現解析キットである qPCR アレイ (QIAgen) を用いて解析を行った。

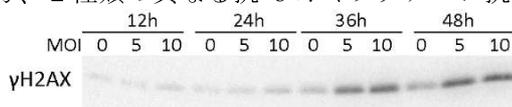
#### (5) 阻害剤を用いた実験

損傷 DNA 応答にかかわる遺伝子の探索として、これら遺伝子機能を阻害する薬剤を用いた実験を行った。まず性器クラミジアを HeLa 細胞に感染させ、感染後 24 時間後に損傷 DNA 応答にかかわる阻害剤を添加し、さらに 24 時間培養した。宿主細胞の DNA 損傷は抗  $\gamma$ H2AX 抗体 (Cell Signaling) を用いたウェスタンブロット法で評価した。

### 4. 研究成果

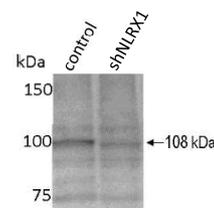
#### (1) クラミジア感染細胞 DNA 損傷の観察

まず性器クラミジア感染により宿主細胞の DNA に損傷が誘導されているか確認を行った。損傷 DNA のマーカーとして  $\gamma$ H2AX のシグナルをウェスタンブロット法で確認したところ、クラミジア感染後期にシグナルが増強することが認められた。また、その  $\gamma$ H2AX シグナルはクラミジア感染力価に依存して増強されていた。その一方、2 種類の異なる抗 8-オキシグアニン抗体による免疫染色も行ったものの、十分なシグナルを得ることができなかった。そのため、以降の実験では、クラミジア感染における宿主細胞の DNA 損傷は、抗  $\gamma$ H2AX 抗体を用いたウェスタンブロット法で評価した。



#### (2) ノックダウン細胞の作製

NLRX1 遺伝子の発現が宿主細胞 DNA 損傷誘導に関与しているか明らかにするために、NLRX1 遺伝子の発現がノックダウンされた HeLa 細胞を作製した。NLRX1 遺伝子の発現抑制は、抗 NLRX1 抗体によるウェスタンブロット法で確認したところ、NLRX1 遺伝子の発現がコントロールの細胞と比較して抑制されていることを確認した。そこで次に、NLRX1 遺伝子発現ノックダウン細胞ならびにコントロール細胞に性器クラミジアを感染させ、宿主細胞 DNA 損傷の評価を行ったものの、明らかな違いは見いだせなかった。



#### (3) DNA の修復制御に関わる遺伝子発現解析

クラミジア感染における損傷 DNA の制御応答に関わる遺伝子群の発現変動を網羅的にスクリーニング解析するために、感染 48 時間後のクラミジア感染細胞より RNA を抽出し、qPCR アレイを用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、性器クラミジア感染により損傷 DNA の制御応答に関わる遺伝子群の中で発現が上昇した遺伝子ならびに発現が抑制された遺伝子があることが明らかとなった。しかしながら、これらの発現変動した遺伝子において、その発現変動の割合は 2~3 倍程度と顕著に変動した遺伝子は認められなかった。

#### (4) DNA 修復酵素阻害剤を用いた実験

性器クラミジア感染による損傷 DNA の制御応答を明らかにするため、損傷 DNA 応答にかかわる遺伝子機能を阻害する様々な阻害剤を用いた検討を行った。その結果、宿主細胞 DNA の損傷誘導に関与が示唆される酵素の阻害剤で  $\gamma$ H2AX のシグナルの減少が認められた。このことは、これらの酵素がクラミジア感染時における宿主細胞 DNA 損傷の誘導に関与している可能性がある。

このように、クラミジア感染細胞における損傷 DNA の制御応答にいくつかの酵素が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	山口 博之  (YAMAGUCHI Hiroyuki)  (40221650)	北海道大学・保健科学研究所・教授    (10101)	
研究分担者	中村 眞二  (NAKAMURA Shinji)  (40207882)	順天堂大学・大学院医学研究科・助教    (32620)	

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