

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16659

研究課題名（和文）ミトコンドリア形態を利用した肺炎クラミジア感染戦略の解明

研究課題名（英文）Analysis of chlamydia pneumonial infectious strategy manipulating host mitochondrial morphology

研究代表者

栗原 悠介（Kurihara, Yusuke）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：30747192

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：クラミジアを含む細胞内寄生体は、宿主細胞内で増殖するために、巧みな生存戦略を持つ。宿主の細胞小器官を利用することも戦略の1つであり、特に多くの機能を兼ね備えるミトコンドリアは格好のターゲットとなる。本申請の目的は、ミトコンドリアの形態を利用した肺炎クラミジアの感染戦略を解明する事である。この目的に対し、動脈硬化発症に重要なプロセスと考えられている、マクロファージへの持続的な感染の機序に焦点を当てた。研究期間内の実験結果から、肺炎クラミジアによるマクロファージへの持続的な感染には、宿主ミトコンドリアの分裂、およびミトコンドリアの分解（マイトファジー）のプロセスが必要であることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎クラミジアなどの細胞内寄生体は動脈硬化症との関連が指摘されており、特に、粥状動脈硬化症の硬化部位においては約50～60%の確率で検出される。また、細胞内寄生体による動脈硬化発症には、マクロファージへの持続的な感染、および感染マクロファージの脂肪蓄積が重要なプロセスと考えられているが、これらの現象の分子メカニズムと動脈硬化症との関連性にも不明な点が多く、詳細な解析が求められる。本研究成果によって、肺炎クラミジアによるマクロファージへの持続感染の機序の一部が明らかになった。本成果が、肺炎クラミジア感染が一因と考えられる粥状動脈硬化症の予防および治療法開発の一助になることを期待している。

研究成果の概要（英文）：Intracellular parasites, such as Chlamydia, utilized advanced survival strategies to proliferate within host cells. One of these strategies is the exploitation of host cell organelles, with mitochondria being particularly attractive targets due to their multifunctionality. This study aims to elucidate the infection strategy of Chlamydia pneumoniae by analyzing mitochondrial morphology. Specifically, we focused on the mechanism of persistent infection in macrophages, which is a crucial process in the development of atherosclerosis. Our experimental results strongly suggest that host mitochondrial fission and subsequent degradation through mitophagy are essential for the persistent infection in macrophages by Chlamydia pneumoniae.

研究分野：感染症

キーワード：肺炎クラミジア ミトコンドリア マイトファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生の他、炎症応答、Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達やアポトーシスなど様々な細胞機能において中心的な役割を果たす。ミトコンドリアの機能低下は、その多様な機能から、糖尿病、神経変性疾患を含む種々の疾患の原因となる。そのため、真核生物には、ミトコンドリアの機能維持のために、機能低下したミトコンドリアを選択的に分解・除去するミトコンドリア選択的オートファジー（以下、マイトファジー）という品質管理機構が存在する。

また、細胞内を網目状に張り巡るミトコンドリアは、環境や機能に応じて、その形態をダイナミックに変化させ、融合と分裂のバランスを巧みに変化させる。ミトコンドリアの形態を制御するタンパク質として複数の GTPase タンパク質が同定されており、分裂を制御する Drp1 はその GTPase 活性によりミトコンドリアを分裂させる。近年、さまざまな側面からミトコンドリア形態が生理的な重要性を有していることが明らかになっている。

(2) 一方、クラミジアを含む細胞内寄生体は、宿主細胞内で増殖するために、巧みな生存戦略を持つ。宿主の細胞小器官を利用することも戦略の1つであり、特に多くの機能を兼ね備えるミトコンドリアは格好のターゲットとなる。さらに、肺炎クラミジアやサイトメガロウイルスなどの細胞内寄生体は動脈硬化症との関連が指摘されており、特に肺炎クラミジアに関しては、粥状動脈硬化症の硬化部位において約 50~60%の確率で検出される。しかしながら、抗菌薬を用いたヒトにおける大規模なコホート研究では、動脈硬化の改善は認められず、その関連には未だ不明な点が多い。また、細胞内寄生体による動脈硬化発症には、マクロファージへの持続的な感染、および感染マクロファージの脂肪蓄積が重要なプロセスと考えられているが、これらの現象の分子メカニズムと動脈硬化症との関連性にも未だ不明な点が多く、より詳細な解析が求められる。

### 2. 研究の目的

本申請の目的は、ミトコンドリアの形態を利用した肺炎クラミジアの感染戦略を解明する事である。この目的に対し、動脈硬化発症に重要なプロセスと考えられている、マクロファージへの持続的な感染とマクロファージにおける脂肪蓄積の機序に焦点を当てた。

### 3. 研究の方法

#### クラミジアによるマクロファージへの持続的な感染機序の解析

マクロファージへの持続的な感染には、細胞内寄生体による抗炎症性 M2 マクロファージへの分化誘導が重要であり[*Cell Host Microbe*, 14;14(2):171-182, 2013]、さらに、M2 マクロファージへの分化誘導にはミトコンドリア分裂を伴う Mitophagy が必要である[*Science*, 356(6337):513-519, 2017]。そこで申請者は、クラミジアによる持続感染には、ミトコンドリア分裂を引き金とした、マイトファジーによる M2 マクロファージ分化誘導が必要であると仮説を立て、以下の検証を行った。

(a) 肺炎クラミジアを感染させた肺胞マクロファージにおいて、ミトコンドリア分裂に伴いマイトファジーが誘導されるか、蛍光顕微鏡およびウェスタンブロット法で確認する。

(b) Drp1 に対する siRNA あるいはミトコンドリア分裂阻害剤(Mdivi-1)によって、ミトコンドリア分裂を阻害した肺胞マクロファージにおいて、マイトファジーが阻害されるか検証する。

(c) 肺炎クラミジアが感染した肺胞マクロファージの分化状態 (M1:炎症性 or M2:抗炎症性) を、フローサイトメトリーおよび ELISA で評価する。

(d) ミトコンドリア分裂を阻害した感染マクロファージの分化状態を解析し、ミトコンドリア分裂とマクロファージ分化の関連性を明らかにする。

(a)においては予備実験でマイトファジーが誘導される事を確認している(次頁参照)。(b)においてマイトファジーが誘導される場合は、ミトコンドリア分裂を伴わないマイトファジーの存在が、(c)において M2 マクロファージの誘導が見られない場合は、M2 マクロファージ誘導に依存しない持続感染の可能性、(d)において M2 マクロファージの誘導が見られた場合、マイトファジーを伴わない M2 マクロファージ分化誘導機序の存在が、それぞれ示唆される。その場合は、共焦点顕微鏡やマイクロアレイ等を駆使して、それらの新しい現象の機序を明らかにしていく。

### 4. 研究成果

初代培養マクロファージ(BMDM)、マクロファージ様細胞株(J774.A)いずれにおいても、肺炎クラミジア(AR39)感染に伴い、ミトコンドリアが分裂する現象が確認できた。同時に、オートファジーマーカータンパク質である LC3 の顕著な点状化が免疫染色法によって確認され、感染 24 時間以降、集積した LC3 の増加が確認された(図1)。また、ミトコンドリア構成タンパク質が感染に伴い減少することから、マイトファジーの亢進が示唆された。さらに、ミトコンドリアの分裂阻害剤である Mdivi-1 によって、ミトコンドリアの分解が抑制され、また、ミトコンドリア

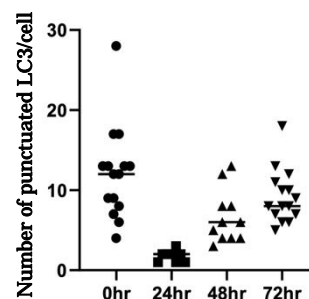


図1: AR39 感染時の点状化 LC3 の定量解析

分裂制御を担う GTPase タンパク質 Drp1 の siRNA による発現抑制でもミトコンドリアの分解が抑制された。これらの結果から、クラミジア感染に引き起こされるミトコンドリアの分裂が、マイトファジーを誘導する一因になることが分かった。

また、感染に伴うミトコンドリアの形態変化の意義を解析するために、Drp1 およびミトコンドリア融合制御を担う GTPase タンパク質 Opa1 をそれぞれ siRNA により発現抑制し、菌体の増殖能を検証した。その結果、Drp1 を抑制し、宿主のミトコンドリアを伸長させると菌体の増殖能が低下し、反対に、Opa1 を発現抑制し、宿主のミトコンドリアの分裂を誘導すると菌体の増殖能が亢進することが分かった(図 2)。

以上の結果から、肺炎クラミジアによるマクロファージへの持続的な感染には、宿主ミトコンドリアの分裂、およびミトコンドリアの分解が必要である可能性が示唆された。肺炎クラミジア感染マクロファージの脂肪蓄積の機序については、研究期間内に解明できなかったが、今後も引き続き解析を続けていく予定である。

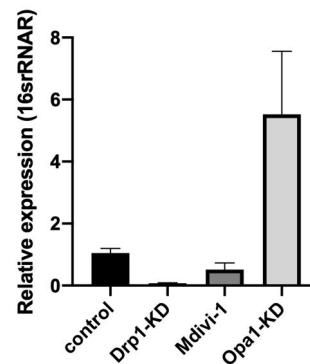


図 2 : 各条件下における AR39 の菌量定量解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Itoh Ryota, Kurihara Yusuke, Yoshimura Michinobu, Hiromatsu Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Bortezomib Eliminates Persistent Chlamydia trachomatis Infection through Rapid and Specific Host Cell Apoptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7434 ~ 7434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23137434	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 -

1. 著者名 Kurihara Yusuke, Walenna Nirwana Fitriani, Ishii Kazunari, Soejima Toshinori, Chou Bin, Yoshimura Michinobu, Ozuru Ryo, Shimizu Akinori, Itoh Ryota, Furuhashi Masato, Hotamisligil G?khan S., Hiromatsu Kenji	4. 巻 210
2. 論文標題 Chlamydia pneumoniae Lung Infection in Mice Induces Fatty Acid-Binding Protein 4-Dependent White Adipose Tissue Pathology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1086 ~ 1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200601	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yusuke Kurihara
2. 発表標題 Chlamydia trachomatis targets mitochondrial dynamics to promote intracellular survival and proliferation
3. 学会等名 日本細菌学会（第92回）
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------