

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590514

研究課題名(和文)新興感染症起因細菌の感染宿主細胞内環境維持に関する分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of intracellular parasitism of Anaplasma phagocytophilum

研究代表者

大橋 典男 (ohashi, norio)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10169039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：新興感染症「ヒト顆粒球アナプラズマ症」を引き起こす *Anaplasma phagocytophilum* (Ap) は、偏性寄生性細菌で、その感染過程は宿主細胞へ侵入する感染初期、寄生性小胞を形成して増殖する感染中期、およびアポトーシスを誘導して細胞外へ脱出する感染後期に分けることができる。本研究では、感染中期から後期における Ap の感染維持分子機構について解析した。その結果、Ap 感染では小胞体の構造自体が変化しており、IRE- α 、PERK および ATF-6 の 3 種の小胞体ストレスセンサーすべてが活性化し、宿主細胞内での Ap の増殖や感染維持に有効的に機能していることが判明した。

研究成果の概要(英文)： *Anaplasma phagocytophilum* is an obligatory intracellular bacterium and causes human granulocytic anaplasmosis, an emerging tick-borne infectious disease. *A. phagocytophilum* forms characteristic inclusions in the host cells, so called morulae, and alters the host environment for the benefit of the bacterial multiplication. In the intracellular parasitism, we found that *A. phagocytophilum* activates three of all ER stress sensors, inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor-6 (ATF6), that regulate the eukaryotic unfolded protein response. The study suggests that *A. phagocytophilum* manipulates host ER stress system for intracellular survival and its growth.

研究分野：微生物学

キーワード：アナプラズマ症 新興感染症 *A. phagocytophilum* 宿主感染応答 細胞内寄生性細菌

1. 研究開始当初の背景

新興感染症「ヒト顆粒球アナプラズマ症」は、1990年代に米国で発見されたマダニ媒介性の発熱性疾患で、その病原体はリケッチア目、アナプラズマ科に属する偏性寄生性細菌の *Anaplasma phagocytophilum* である。本症の症状は、発熱、白血球減少、血小板減少などであるが、これと類似の症状を示す感染症として、近年、中国で発見され、最近、日本でも確認された「重症熱性血小板減少症候群 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome [SFTS]) が知られている。実は、中国の SFTS は当初、*A. phagocytophilum* 感染による「ヒト顆粒球アナプラズマ症」が疑われていた。

A. phagocytophilum は、自然界では野生哺乳動物が保菌しており、マダニを介して野生哺乳動物の個体間を移動する。よって、*A. phagocytophilum* を保有するマダニがヒトを刺咬すると、*A. phagocytophilum* はヒト体内へと移行し、顆粒球、特に好中球に感染する。*A. phagocytophilum* の感染過程は、初期、中期、後期の3段階に分けることができる。感染初期は宿主細胞への侵入とそれに続く増殖開始までの期間で、細胞内へ侵入した *A. phagocytophilum* は独自の寄生性小胞を形成し、リソソームとの融合を阻止し、宿主細胞のアポトーシスを遅延させて、*A. phagocytophilum* の増殖時間を確保する。感染中期には宿主細胞質内に桑の実状のモルラ (morula) と呼ばれる *A. phagocytophilum* に特徴的な増殖形態を形成し、感染後期では、モルラは宿主細胞質のほとんどを占めるまでに成熟し、今度は宿主細胞のアポトーシスを誘導して、細胞外へ脱出し新たな細胞へと感染を繰り返す。これまでの研究では感染初期に関するものが多く、本研究ではモルラ形成から細胞外脱出までの感染後期における *A. phagocytophilum* の感染維持の分子機構について着目した。

2. 研究の目的

ヒト顆粒球アナプラズマ症の起因細菌である *A. phagocytophilum* は、ヒト好中球に侵入後、殺菌されることなく細胞質内に寄生性小胞をつくり、「モルラ」と呼ばれる桑の実状の構造をつくりながら増殖する。これまでの研究では細胞侵入から感染の成立までの感染初期に関するものが多かったため、モルラ形成から最終的に宿主細胞にアポトーシスを誘起するまでの感染後期における *A. phagocytophilum* の感染維持機構については不明な点が多い。そこで本研究では、*A. phagocytophilum* の増殖が活発に行われている感染後期の時点に焦点を置き、感染維持における病原体と宿主の相互作用の分子機構について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、*A. phagocytophilum* の感染中期から後期にかけて、細胞内増殖、寄生性小胞維持、細胞外放出に関する宿主細胞内因子について、マイクロアレイ法による網羅的解析から候補タンパク質分子を選出し、リアルタイム RT-PCR 法やタンパク質レベルで、その発現変動を確認した。さらに、得られた宿主細胞側の候補分子について、プラスミドベクターを用いた遺伝子導入や RNAi 法により、それらの候補分子の発現を増減させた宿主細胞を作製した。そして、それらの細胞に *A. phagocytophilum* を感染させ、*A. phagocytophilum* 感染中期から後期にかけてのこれらの因子の挙動を追跡して、*A. phagocytophilum* の感染宿主細胞内環境維持との関連性を解析した。

4. 研究成果

本研究では、モルラ形成から細胞外脱出までの感染後期における *A. phagocytophilum* の感染維持分子機構を解明するため、まず、マイクロアレイ法により、*A.*

phagocytophilum 感染において宿主細胞側の遺伝子発現量が変動する候補タンパク質分子を網羅的に解析した。その結果、CTSG、DEPDC6、ERp29、XBP-1、NLRP12、および c-Src の 6 つの遺伝子が感染に伴って発現変動することを見出した。そして、これら宿主細胞側の遺伝子発現について、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、感染時および非感染時における遺伝子発現の相対比較解析を行った。その結果、*A. phagocytophilum* 感染が中期から後期へ移行するにつれて、これらの遺伝子の発現量が変動することが確認された。一方で、我々はテトラサイクリン系抗生物質が感染後期の寄生性小胞内の *A. phagocytophilum* に対して静菌的ではなく、殺菌的に作用することも見出し、上述した宿主細胞側のタンパク質分子について、リアルタイム RT-PCR 法により、この薬剤処理前後の感染細胞における遺伝子発現を解析したところ、薬剤処理前後においてもこれらの遺伝子発現が変動することが判った。その中で、特に *A. phagocytophilum* 感染によりその遺伝子発現が減少する XBP-1 (小胞体ストレス応答調節因子) に着目し、*A. phagocytophilum* 感染と小胞体ストレスとの関連性について分子レベルで探求した。その結果、XBP-1 が関連する小胞体ストレスセンサーの IRE1-alpha は、*A. phagocytophilum* 感染により活性化され、Casepase-2 を介して、*A. phagocytophilum* 感染後期におけるアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。また、別の小胞体ストレスセンサーである PERK も *A. phagocytophilum* 感染により活性化され、その下流にある CHOP を介した Bcl-2 発現抑制により、宿主細胞のアポトーシスを誘導する可能性があることが判った。さらに、もう一つの小胞体ストレスセンサーである ATF-6 も *A. phagocytophilum* 感染に伴って活性化していることが判り、よって *A.*

phagocytophilum 感染では小胞体の構造自体が変化し、IRE-alpha、PERK および ATF-6 の 3 種の小胞体ストレスセンサーすべてが活性化して、宿主細胞内での *A. phagocytophilum* の増殖および感染維持に対して有効的に機能していることが判った。また、テトラサイクリン系抗生物質は寄生性小胞内の *A. phagocytophilum* に対して殺菌的に作用するが、薬剤処理後も宿主細胞の小胞体ストレス状態は持続したことから、小胞体ストレスの誘導は *A. phagocytophilum* の感染そのものによるのではなく、*A. phagocytophilum* の分泌する何らかの病原性因子が宿主細胞に作用している可能性が考えられた。

以上、本研究で得られた成果は、*A. phagocytophilum* の感染宿主細胞内環境維持に関与する分子機構について、極めて重要な知見を提供するものと考えられる。

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 8 件)

1. Wu D, Wuritu, Yoshikawa Y, Gaowa, Kawamori F, Ikegaya A, Ohtake M, Ohashi M, Shimada M, Takada A, Iwai K, Ohashi N. Molecular and serological survey of Rickettsiales bacteria in wild sika deer (*Cervus nippon nippon*) in Shizuoka prefecture, Japan: High prevalence of *Anaplasma* species. Jpn J Infect Dis. Advance publication. Published online: May 12, 2015. Doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.003
2. Gaowa, Yoshikawa Y, Ohashi N, Wu D, Kawamori F, Ikegaya A, Watanabe T, Saitoh K, Takechi D, Murakami Y, Shichi D, Aso K,

Ando S. *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in humans, Japan, 2010-2011. *Emerg Infect Dis.* 2014 Mar;20(3):508-9. doi: 10.3201/eid2003.131337

3. Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T. Rickettsiae in ticks, Japan, 2007-2011. *Emerg Infect Dis.* 2013 Feb;19(2):338-40. doi: 10.3201/eid1902.120856

4. Ohashi N, Gaowa, Wuritu, Kawamori F, Wu D, Yoshikawa Y, Chiya S, Fukunaga K, Funato T, Shiojiri M, Nakajima H, Hamazu Y, Takano A, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T. Human granulocytic anaplasmosis, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2013 Feb;19(2):289-92. Doi: 10.3201/eid1902.120855

5. Ybañez AP, Sato F, Nambo Y, Fukui T, Masuzawa T, Ohashi N, Matsumoto K, Kishimoto T, Inokuma H. Survey on tick-borne pathogens in thoroughbred horses in the Hidaka district, Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci.* 2013 Jan 31;75(1):11-5. Epub 2012 Aug 10. Doi: 10.1292/jvms.12-0282

6. Gaowa, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Ohashi N, Kawamori F, Sugiyama K, Ohtake M, Ohashi M, Yamamoto S, Kitano T, Takada N, Kawabata H. Detection and characterization of *p44/msp2* transcript variants of *Anaplasma phagocytophilum* from naturally infected ticks and wild deer in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(1):79-83.

7. Sen E, Uchishima Y, Okamoto Y, Fukui T,

Kadosaka T, Ohashi N, Masuzawa T. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011 Jun;2(2):94-8. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.03.004. Epub 2011 May 25.

8. Matsumoto K1, Takeuchi T, Yokoyama N, Katagiri Y, Ooshiro M, Zakimi S, Gaowa, Kawamori F, Ohashi N, Inokuma H. Detection of the new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia ewingii* from *Haemaphysalis longicornis* in Yonaguni Island, Okinawa, Japan. *J Vet Med Sci.* 2011 Nov;73(11):1485-8. Epub 2011 Jun 28.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 呉東興, 高娃, 吉川悠子, 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 川上万里, 岸本壽男, 森田裕司, 中堂園文子, 御供田睦代, 能勢裕久, 池田賢一, 増澤俊幸, 安藤秀二, 大橋典男: アナプラズマ症の特異抗体検出による患者探索の現状報告, 第 21 回リケッチア研究会 研究発表会(東京), 2014 年 12 月 20 日.

2. 呉東興, 高娃, 吉川悠子, 川森文彦, 川上万里, 岸本壽男, 森田裕司, 増澤俊幸, 安藤秀二, 大橋典男: *Anaplasma phagocytophilum* 感染患者血清中に存在する抗体の検出法に関する検討, 第 97 回日本細菌学会関東支部総会(東京), 2014 年 10 月 31 日.

3. 大橋典男: 日本国内に潜在する新興感染症「アナプラズマ症」, 平成 26 年度中部地区獣医師大会・獣医学術中部地区学会特別公演(静岡), 2014 年 8 月 31 日.

4. Ohashi N, Yoshikawa Y, Gaowa, Wuritu, Wu D, Kawamori F: Tick-associated Anaplasmataceae pathogens in Japan., XIV International Congress of Acarology (京都), 2014年7月14-18日.

5. 川森文彦, 大橋典男: わが国の新興アナプラズマ症, 衛生微生物技術協議会第35回研究会(東京), 2014年6月26-27日.

6. Yoshikawa Y, Sugimoto K, Gaowa, Ohashi N: Accommodation responses of *Anaplasma phagocytophilum* during the multiplication in the host cells, 第87回日本細菌学会総会(東京), 2014年3月27日.

7. 大橋典男, 高娃, 吉川悠子, 呉東興, 川森文彦, 池ヶ谷朝香、渡邊卓哉, 齊藤一仁, 武地大維, 村上陽一, 志智大介, 麻生克己, 安藤秀二: アナプラズマ症の血清診断について, 第6回日本リケッチア症臨床研究会・第20回リケッチア研究会合同研究発表会(大津), 2014年1月12日.

8. 大橋典男、高娃、呉東興、烏日図、吉川悠子、川森文彦:「近年のアナプラズマを中心としたリケッチア関連細菌群の調査概要」第5回日本リケッチア症臨床研究会・第19回リケッチア研究会合同研究発表会(大津), 2012年12月8-9日.

9. 渡邊卓哉、武地大維、齊藤一仁、西尾信一郎、川森文彦、大橋典男:「ヒト顆粒球アナプラズマ症が疑われた2例」第55回日本感染症学会中日本地方学術集会(福岡), 2012年11月5日.

10. Masuzawa T, Ohashi N, Khasnatinov MA, Danchinova GA, Ivanov LI, Fukui T, Okamoto Y, Pan MJ, Koizumi N: Comparative study of

Anaplasma in Japan and other countries., Russian Scientific Conference with International Participation "BASIC AND APPLIED ASPECTS OF INFECTIOUS PATHOLOGY", Devoted to 100-year Anniversary of the Institute of Epidemiology and Microbiology SC FHHRP SB RAMS, Irkutsk, Russia, Sep. 27-28 (2012)

11. Ohashi N, Yoshikawa Y, Masuzawa T: Overview of tick-associated Rickettsiales bacteria in Japan., Russian Scientific Conference with International Participation "BASIC AND APPLIED ASPECTS OF INFECTIOUS PATHOLOGY", Devoted to 100-year Anniversary of the Institute of Epidemiology and Microbiology SC FHHRP SB RAMS, Irkutsk, Russia, Sep. 27-28 (2012)

12. 川森文彦、池ヶ谷朝香、小柳純子、山田俊博、長岡宏美、大橋典男:「One-tube nested PCR法による紅斑熱群リケッチアの検出」第20回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー(SADI)第20回記念大会(阿南), 2012年7月6-8日.

13. 村上陽一、志智大介、川森文彦、大橋典男:「ヒト顆粒球アナプラズマ症の疑いが持たれた1例」第217回日本内科学会東海地方会(浜松), 2012年6月16日.

14. 大橋典男:「発掘されつつあるアナプラズマ症やエーリキア症とその媒介動物」第64回日本衛生動物学会大会(上田), 2012年3月31日.

15. 高娃、烏日図、呉東興、古川英嗣、吉川悠子、川森文彦、大橋典男:「Human infection with *Anaplasma phagocytophilum* in Japan」第94回日本細菌学会関東支部総会(東京),

2011年10月6日。

16. Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Furukawa E, Murakami T, Minato C, Kawamori F, Ohtake M, Ohashi M, Ohashi N: Molecular epidemiological study of Rickettsiales bacteria in wild deer and mice in Shizuoka prefecture, Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 9 (2011)

17. Gaowa, Wuritu, Aochi M, Kawamori F, Yoshikawa Y, Ohashi N: Molecular detection of Rickettsiales bacteria from ticks in western Japan., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 9 (2011)

18. Ohashi N: Rickettsiales bacteria in Japan, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 10 (2011)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大橋 典男 (OHASHI, NORIO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10169039

(2)研究分担者

吉川 悠子 (YOSHIKAWA, YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：00580523

(3)連携研究者

なし