

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791241

研究課題名(和文) 早産の原因の一つ、ウレアプラズマの子宮胎内感染と胎児への影響のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The internalization mechanism of *Ureaplasma parvum* in HeLa cells.

研究代表者

西海 史子(Nishiumi, Fumiko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・流動研究員

研究者番号：60599596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：わが国での早産率は約6%で、早産児は呼吸器障害、神経障害などの合併症を伴うことがある。その原因の約半数に細菌感染や、病理的な絨毛膜羊膜炎(CAM)が認められる。流産胎盤における *Ureaplasma* spp.の分離頻度は42%であり、CAMの起因微生物として最も重要な細菌の一つである。

今回の研究で *U. parvum* は細胞にクラスリン依存性のエンドサイトーシスで侵入し、初期エンドソームから後期エンドソームへと移動している事が明らかになった。感染細胞では細胞の増殖抑制が引き起こされており、*U. parvum* に感染した細胞ではミトコンドリアの構造異常とROSの産生が上昇している事も示された。

研究成果の概要(英文)： *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) is a causative of preterm delivery and colonizes human urogenital tract. In order to clarify the intracellular viability of *U. parvum* in the host cells, *U. parvum* was challenged to HeLa cells. *U. parvum* accumulated in the perinuclear region of the HeLa cells within 48 h after infection. Internalization of *U. parvum* into the HeLa cells was suppressed both by the clathrin-dependent endocytosis inhibitor chlorpromazine hydrochloride (CPZ) and the siRNA. These experiments indicated that *U. parvum* was internalized into HeLa cells via clathrin-mediated endocytosis. *U. parvum* were colocalized with early to late endosome markers. The increased production of ROS was observed in the *U. parvum* infected cells, which lead to structural changes in the mitochondrial cristae and swelling of mitochondria. Our findings raise the possibility that CPZ may have a potential role in the pathogenesis of *U. parvum* infections.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：ウレアプラズマ 絨毛膜羊膜炎 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

早産の主要な原因の一つとして胎内感染が報告されており、これまで起因微生物として、大腸菌、連鎖球菌、 gardoneラ、マイコプラズマ科ウレアプラズマ (*Ureaplasma* spp.)などが明らかにされている。そのなかでも私たちは、*Ureaplasma* spp.による子宮内感染に着目し研究を行っている。*Ureaplasma* spp.は通常健康な人の体内では泌尿生殖器系に存在する。しかしながら免疫寛容となっている妊娠中の母体において子宮内で絨毛膜羊膜炎を引き起こしている(Namba, F. & Hasegawa, T. *et al.*, 2010)。病原因子について Li, Y.H. *et al.*, (2001) は、ウレアプラズマの外膜タンパク質 MBA で TNF- α と IL-6 の発現が誘発されていることを示したが、一方 Menon, R. *et al.*, (2009) の論文では加熱後の死菌では培養細胞において炎症反応が惹起されなかったと報告している。このように相反する論文が報告されてきたが、我々は MBA が加熱処理によって生理活性を失うことを見出し、MBA あるいは MBA 由来のリポペプチドが妊娠マウスに流早産を引き起こす事を報告し、流早産の病原因子であることを突き止めた(Uchida, K., *et al.*, 2013)。

Ureaplasma spp. などマイコプラズマ科の細菌は最小生物の一つである。電子顕微鏡の検討で *Ureaplasma* spp. はおよそ 100 nm の大きさであることが明らかになった。以前の検討で、ウレアプラズマと同じ大きさのナノシリカが特異的に胎盤に集積することを報告した(Yamashita, K. *et al.*, 2011)。これらナノレベルの物質は大きさによっては体内に取り込まれ血管を通過して様々な臓器に蓄積していきヒトの健康に影響を与えていることが明らかにされてきている(Kagan, V. E. *et al.*, 2005, Nel, A. *et al.*, 2006 and Fadeel, B. & Garcia-Bennett, A., 2010)。特に最近の研究ではマウスにおいてアスベストが原因とされている中皮腫と似た様な障害をカーボンナノチューブが引き起こしていることが示されている(Takagi, A. *et al.*, 2008, Poland, C. A. *et*

al., 2008, Ryman-Rasmussen, J. P. *et al.*, 2009 and Donaldson, K. *et al.*, 2010)。また、ナノシリカパーティクルや二酸化チタンナノパーティクルが肝臓に傷害や炎症を与える事も明らかにされている(Nishimori, H. *et al.*, 2009, Nishimori, H. *et al.*, 2009 and Morishige, T. *et al.*, 2010)。さらに、ナノレベルの物質による妊娠中の母体や胎児への影響についても研究されており、空気中、水、土壌、ハウスダスト等といった微粒子や食べ物に含まれる多くの化学物質の毒性によって流産や子宮内胎児発育遅延が起こっている事がすでに報告されている(Wigle, D. T. *et al.*, 2008, Alexander, B. T., 2003, and Cetin, I. & Alvino, G., 2009)。この様な事からナノ粒子大の *Ureaplasma* spp. が子宮内へどの様な経路で感染し炎症反応を起こし流産や子宮内胎児発育遅延の原因となっているのかについて明らかにしようと考えている。

2. 研究の目的

私たちはこれまでに、改良型ウレアプラズマ培地により、*Ureaplasma* spp. や *Mycoplasma hominis* の分離を行ってきた。この培地を用いて *Ureaplasma* spp. を増やし培養細胞に感染させることでウレアプラズマの感染経路と子宮胎内細胞への侵入メカニズム、子宮胎内がウレアプラズマに感染し絨毛膜羊膜炎の感染炎症反応が起こる事によって引き起こされると推測される胎盤の機能障害と胎児への影響について明らかにすることが出来ると考えられる。

3. 研究の方法

早産胎盤 (在胎週数 26 週、絨毛膜羊膜炎) 由来臨床分離株 (*U. p.* OMC-P162 株、血清型 3 型) を使用した。培養した *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) を Vybrant™ Cell-Labeling Solutions DiI で蛍光ラベルした後、培養細胞 (HeLa) 培養液中に加え、HeLa 細胞への侵入について観察を行った。細胞内への侵入経路についてはエンドサイトーシスのマーカー

であるクラスリンやカベオリン抗体を用いて免疫染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。さらに、クラスリンの機能阻害剤である chlorpromazine hydrochloride (CPZ) やクラスリンの siRNA を用いてクラスリンの機能阻害実験を行い、細胞への侵入に変化があるか調べた。細胞内へ侵入した *U. parvum* の細胞内移動経路について調べる為に初期エンドソーム (EEA1) や後期エンドソーム (LAMP1) のマーカーとなる抗体を用いて免疫染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。さらに、後期エンドソームのマーカーである Rab7 の安定形質転換細胞株 (GFP-Rab7) を Jump-In™ Fast Gateway® Targeted Integration System を用いて HeLa 細胞で作製した。取得出来た安定形質転換細胞株を用いて *U. parvum* との関係について蛍光顕微鏡観察を行った。さらに、Gentamicin invasion assay を行って感染した細胞内での *U. parvum* 生存数が時間の経過と共に変化するか調べた。また、電子顕微鏡を用いて *U. parvum* が侵入した細胞での細胞内小器官への影響について観察を行った。*U. parvum* が宿主細胞に感染することによって引き起こされる細胞傷害性について明らかにする為に、ROS の産生が引き起こされるか Cell Counting Kit-8 を用いて調べた。

4. 研究成果

早産児由来の *U. parvum* 臨床分離株の細胞への侵入メカニズムについて調べたところ、Dil で蛍光ラベルした *U. parvum* は感染後 0.5 時間で宿主細胞内に侵入しているのが確認され、時間の経過とともに核周囲に集積している事が示された。細胞内に取り込まれた *U. parvum* が宿主細胞内で増殖している可能性について感染 6 時間から 7 日間培養した細胞を用いて Gentamicin invasion assay を行って調べたところ、時間の経過とともに徐々に増殖しているという結果が得られた。また、*U. parvum* 感染細胞と非感染細胞を 1 日から 7 日間培養した際の細胞増殖率について比較したところ、感染細胞で増殖抑制が起きてい

るという結果が得られた。これは *U. parvum* が宿主細胞に感染することによって細胞にダメージを与えているのではないかと考えられる。次に *U. parvum* の細胞内への侵入ルートについて免疫染色を行って調べた結果、クラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれている事が siRNA を用いた knock down 実験やクラスリンの機能を阻害する CPZ を用いた実験からも明らかになった。クラスリン依存性エンドサイトーシスの機能阻害剤である CPZ が *U. parvum* 細胞内侵入の予防薬としての可能性を示す結果であったが、応用にはさらなる研究が必要であると考えられる。

次に、宿主細胞内に取り込まれた *U. parvum* の細胞内動態解析を行ったところ、感染 0.5 時間で初期エンドソームのマーカーである EEA1 と共局在している事が示された。さらに後期エンドソームとの局在について明らかにする為に後期エンドソームのマーカーである *rab7* 遺伝子のクローニングを行った。クローニングした *rab7* を用いて pEF1- ϕ C31-Bla-EGFP-Rab7 を構築し、細胞に構築したプラスミドを導入、EGFP-Rab7 が安定発現する細胞株を樹立した。この安定発現細胞株に *U. parvum* を感染させて Rab7 との関係について観察を行った。その結果 *U. parvum* は感染後 3 時間で Rab7 と共局在している事が示され、さらにもう一つの後期エンドソームのマーカーである LAMP1 との局在についても調べた結果、LAMP1 とも共局在している事が明らかになった。この結果は宿主細胞内に侵入した *U. parvum* が初期エンドソームから後期エンドソームに移動している事を示唆した。また、宿主細胞内に取り込まれた蛍光ラベルしていない *U. parvum* を透過型電子顕微鏡で観察したところ、蛍光顕微鏡観察で認められた蛍光ラベルした *U. parvum* と同様に宿主細胞の核周囲に局在しているのが観察された。さらに感染した細胞での細胞内小器官の観察を行ったところ、ミトコンドリ

アの膨化やクリステの構造異常が認められた。感染細胞においてミトコンドリアの構造異常が観察されたことから、感染細胞における ROS の産生について調べた。その結果、*U. parvum* 感染細胞ではコントロール細胞に比べ ROS の産生が上昇している事が明らかになった。

これらの結果から、*U. parvum* はクラスリン依存性のエンドサイトーシスで細胞内に侵入し、初期エンドソームから後期エンドソームへ移動しており、細胞内に侵入することで細胞内小器官の一つであるミトコンドリアの構造異常を引き起こし、細胞に傷害を与えているが、*U. parvum* 自身は宿主細胞内で徐々に増加しているという事が示された。今後、宿主細胞内に侵入した *U. parvum* がオートファジーによって分解される可能性があるのか、またリサイクリングエンドソームに取り込まれて細胞外へ放出されるのか明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) Fumiko Nishiumi and Itaru Yanagihara
Ureaplasma parvum and host cellular interactions
Japanese Journal of Mycoplasmaology, 39, 57-58, 2012
- 2) Xiao S. J., Wang L. Y., Kimura, M., Kojima H., Kunimoto H., Nishiumi F., Yamamoto N., Nishio K., Fujimoto S., Kato T., Kitagawa S., Yamane H., Nakajima K., Inoue A.
S1-1/RBM10: Multiplicity and cooperativity of nuclear localization domains.
Biol. Cell 105(4), 162-174, 2013
- 3) 西海史子、柳原格
Ureaplasma parvum の細胞内動態解析
日本マイコプラズマ学会雑誌、40, 50-51,

2013

〔学会発表〕(計8件)

- 1) Itaru Yanagihara, Kaoru Uchida, Kumiko Nakahira and Fumiko Nishiumi
Virulence factors of *Ureaplasma parvum*.
Joint Congress of The 5th Meeting of Asian Organization for Mycoplasmaology. The 38th Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmaology. Nagasaki, (2011.10.19-21)
- 2) 柳原格、味村和哉、名倉由紀子、西海史子、中平久美子
Nanoparticle can cross the placental barrier in pregnant mice.
日米コレラ 京都 (2011.8.3)
- 3) 久野秀太、小野寺章、西海史子、諸澤瑛、田中敦士、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一
非結晶ナノシリカの精子頭部への結合による精子運動性の低下
日本薬学会 第132年会 札幌 (2012.3.28-31)
- 4) 西海史子、柳原格
Ureaplasma parvum の細胞内取り込み機構・細胞内動態解析
日本マイコプラズマ学会 第39回学術集会 盛岡 (2012.05.24-25)
- 5) 小野寺章、西海史子、田中敦士、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一
非結晶ナノシリカの細胞膜への結合とナノ生殖毒性との関連
第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 武庫川女子大学 (2012.10.20)
- 6) 久野秀太、小野寺章、西海史子、諸澤瑛、

田中敦士、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一
非結晶ナノシリカの精子頭部への結合により精子運動性の低下
第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会
武庫川女子大学 (2012.10.20)

7) 小野寺章、西海史子、古田拓也、中平久美子、石井幸奈、本間安季、太田舞子、諸澤瑛、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一
非結晶ナノシリカの細胞膜への結合とナノ生殖毒性との関連
第 85 回日本生化学会大会 福岡
(2012.12.14-16)

8) 西海史子、柳原格
Ureaplasma parvum の細胞内動態解析
日本マイコプラズマ学会 第 40 回学術集会 東京 (2013.05.23-24)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西海 史子 (Fumiko Nishiumi)

研究者番号：60599596

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：