

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590474

研究課題名（和文）肺炎クラミジアの感染細胞内での生存・増殖様式を決定づける宿主応答と分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of pathogenic chlamydial infection to lymphocytes

研究代表者

山口 博之 (YAMAGUCHI HIROYUKI)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：40221650

研究成果の概要（和文）：申請者らは、病原性クラミジアのリンパ球細胞への感染様式と感染細胞に於ける細胞機能修飾機構について上皮細胞への感染様式と比較検討した。その結果、上皮細胞への付着にはヘパリングルカンが必要であるが、リンパ球細胞へ付着侵入には、この細胞外マトリックスを要求せず、未知の付着機構の存在が示唆された。また変異源物質 EMS を用いて病原性クラミジア感染抵抗性リンパ球細胞株の樹立に成功し、グランザイム K の発現異常がこの抵抗性に寄与している可能性について報告した。さらにリンパ球細胞に感染した病原性クラミジアは、生体防御因子 IFN γ からエスケープできることを発見した。

研究成果の概要（英文）：We assessed pathogenic chlamydial infection mechanism to lymphocytes when compared to epithelial cells. As a result, we found the unique chlamydial attachment process on lymphocytes, independent of heparin, which has a critical on bacterial general attachment to cells. It was also confirmed by using DNA microarray that pathogenic chlamydial survival in lymphocytes was controlled by granzyme K. Furthermore, we demonstrated that lymphocytes could provide a shelter for pathogenic chlamydiae to escape from IFN γ . Thus, pathogenic chlamydial infection mechanism to lymphocytes is unique when compared to epithelial cells, possibly connecting clinical significance.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：Chlamydomphila pneumoniae、リンパ球細胞、IFN γ 、付着、ヘパリン、グランザイム K

1. 研究開始当初の背景

偏性細胞内寄生性細菌肺炎クラミジアは二十数年前より、ヒトからヒトへ伝播する呼吸器感染症の原因菌として知られるように

なった新興感染症起因菌である(Chest, 95: 664-669, 1986)。肺炎クラミジア感染症はしばしば慢性化し喘息や慢性気管支炎の原因ともなる(JAMA, 266: 225-230, 1991)。健

常人における肺炎クラミジアに特異的な抗体保有率は約60-70%と高く、誰もが数度は感染する普遍的な細菌感染症として知られている (Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 8: 191-202, 1989; Chest, 121:1776-1781, 2002; N Eng J Med, 340: 115-126, 1999; Ann Intern Med, 192: 3397-3400, 1996)。近年になって、肺炎クラミジア血清抗体価が冠動脈疾患患者で健常者に対して有意に高く、動脈硬化病変部位や末梢血液単核細胞より本菌遺伝子が高率に検出され、動物への感染により動脈硬化の進展が認められることより本菌感染症と動脈硬化症との関連性が明らかになってきた (Lancet, 2: 983-986, 1988; J Clin Microbiol, 35: 48-52, 1997; J Infect Dis, 175: 883-890, 1997; Transfusion, 44: 1072-1078, 2004; Int J Exp Pathol, 87: 121-129, 2006)。一方、肺炎クラミジアは上皮細胞、血管内皮細胞、単球/マクロファージ、リンパ球細胞等の多種多様な細胞に感染する。しかしながら宿主細胞内での生存・増殖様式は感染細胞の種類により異なり、上皮系細胞内では良好に発育するが (Infect Immun, 64: 1614-1620, 1996)、単球/マクロファージでは感染するが細胞内で死滅する (Infect Immun, 70: 2392-2398, 2002; Infect Immun, 73: 4560-4570, 2005)。更に最近の申請者達の研究によりリンパ球細胞に感染した肺炎クラミジアは、持続感染に移行し顕著な細胞内増殖を示さないことが明らかになった (Infect Immun, 69: 7753-7759, 2001; FEMS Microbiol Letters, 216: 229-234, 2002; Curr Microbiol, 50: 160-166, 2005)。またリンパ球細胞に感染した肺炎クラミジアは、汎用されている抗菌剤で除菌できないことや (Antimicrob Agents Chemther, 47: 1972-1975, 2003; Antimicrob Agents Chemther, 52: 1991-1998, 2008)、CD3 分子の発現抑制を誘導することも見いだした (Microb Pathog, 45: 290-296, 2008)。この様に、肺炎クラミジアのリンパ球細胞への感染様式は上皮細胞等と明らかに異なっているが、これら違いを規定する要因は不明である。

2. 研究の目的

肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) は呼吸器感染症起因菌であり動脈硬化症との関連性も指摘されている。肺炎クラミジアは上皮細胞、血管内皮細胞、単球/マクロファージ、リンパ球細胞等の多種多様なヒト細胞に感染する。しかしながら宿主細胞内での生存・増殖様式は感染細胞の種類により異なり、上皮系細胞内では良好に発育するものの単球/マクロファージ内では死滅しリンパ球細胞では持続感染に移行し顕著な細胞内増殖を示さない。この違いは肺炎クラミジアが

保有する多様な感染機構に起因するものと考えられるが、その詳細は明らかではない。本研究では、肺炎クラミジアのヒトリンパ球細胞内での生存・増殖様式を決定づける宿主応答に関わる分子基盤を明らかにすることを目的として、以下の3つの視点より上皮系細胞や単球/マクロファージへの感染様式と比較しながら研究を実施した。

- (1) 肺炎クラミジアのリンパ球細胞における付着様式
- (2) リンパ球細胞内でのクラミジア制御機構
- (3) IFN γ に対する感受性について、解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 肺炎クラミジアのリンパ球細胞における付着様式: 病原性クラミジアの上皮細胞への付着には、菌側分子外膜蛋白 OmcB と細胞側分子ヘパリン側鎖を持つグルカンさらに未知の細胞側分子との三分子の架橋結合が必要である [Zhang ら 1992 (Cell), Moelleken ら 2008 (Mol Microbiol)]。そこでリンパ球細胞 (Jurkat) への肺炎クラミジアの付着にヘパリンを要求するか否かについて、ヘパリングルカン添加時の付着率についてフローサイトメトリーや蛍光抗体法を駆使し精査した。

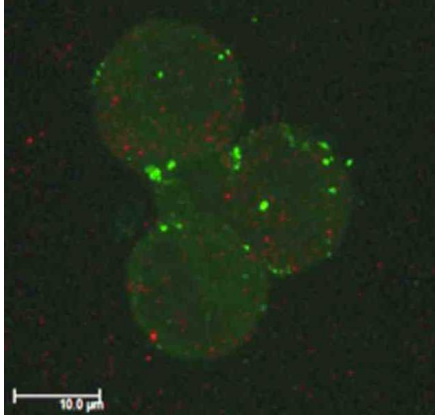
(2) リンパ球細胞内でのクラミジア制御機構: 肺炎クラミジア近縁種性器クラミジアの付着・侵入に対して感染抵抗性を示す変異リンパ球細胞 (Jurkat) 株を確立し DNA マイクロアレイにて遺伝子発現変化について検討し、抵抗性に関わる分子の同定を試みた。

(3) IFN γ に対する感受性について: IFN γ は上皮細胞内のクラミジアを排除する上で極めて重要な感染防御因子である。マウスとヒトではその下流で起こる感染細胞内での防御イベントが大きく異なり、マウスでは p47 GTPase (Irgm1) を介したオートファジーによって、ヒトでは indole-2, 3-dioxygenase (IDO) を介した細胞内トリプトファンプールの枯渇がその排除機構の主体と考えられている [Nelson ら 2005 (PNAS)]。すなわち、ヒトにおいて IFN γ 刺激により IDO が誘導されない細胞があれば、その細胞はクラミジアの生体内での生存をサポートするシェルターとしての役割を担う可能性が高い。そこで IFN γ に対するリンパ球細胞内の肺炎クラミジアの感受性と IDO の発現について検討した。

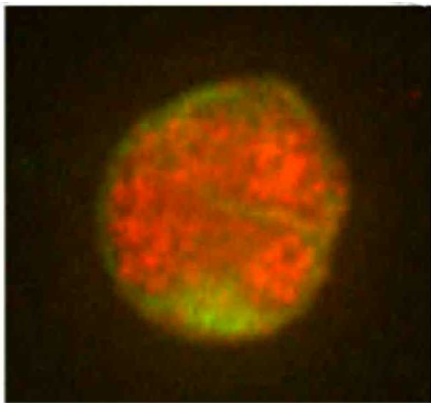
4. 研究成果

(1) 肺炎クラミジアのリンパ球細胞における付着様式: 我々はヘパリン側鎖を持つグルカンの発現が極めて低いリンパ球細胞にも病原性クラミジアが効率良く結合し細胞

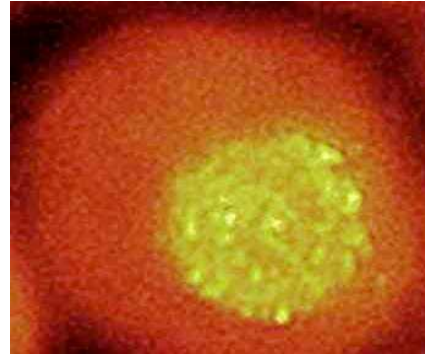
内へ侵入後、細胞膜で隔絶された封入体内で増殖することを明らかにした (Kobayashi ら 2011)。この結果は、病原性クラミジアが新規の架橋結合様式にてリンパ球細胞に付着し侵入していることを示唆している。以下写真はヘパリン(赤)の発現がほとんど検出されない Jurkat 細胞に付着している肺炎クラミジア(緑)。



(2) リンパ球細胞内でのクラミジア制御機構: EMS 存在したで性器クラミジアを Jurkat 細胞に感染させ、非感染細胞を選択肢クローン化した。DNA マイクロアレイ解析の結果、グランザイム K の発現が野生株に比べ 100 倍程度増加していることを見いだした。変異株はグランザイム K を細胞質に大量に産生していた (Kubo ら 2012)。下写真はグランザイム K の異常発現の見られる性器クラミジア感染抵抗性 Jurkat 株。



(3) IFN γ に対する感受性について: IFN γ 存在下でヒトリンパ球細胞内の病原性クラミジアの増殖について検討したところ、リンパ球細胞内のクラミジアの増殖は IFN γ の影響を全く受けなかった。IFN γ に対する抵抗性は肺炎クラミジアのみならず性器クラミジアでも確認している。ヒト末梢血液細胞より精製したリンパ球細胞内でのクラミジアの生存も IFN γ の影響を全く受けなかった。さらに感染リンパ球細胞内では IFN γ の刺激でも IDO が全く発現しないことを見いだした。



現在投稿準備中。上写真は IFN γ 存在下にもかかわらずヒトリンパ球細胞 Jurkat 内で発生に増殖する病原性クラミジア。

これら研究成果は、クラミジアが生体防御機構をエスケープするためにリンパ球細胞を巧みに利用している可能性を示唆している。

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 17 件)

① Hojo F, Sato D, Matsuo J, Miyake M, Nakamura S, Kunichika M, Hayashi Y, Yoshida M, Takahashi K, Takemura H, Kamiya S, Yamaguchi H. Ciliates expel environmental *Legionella*-laden pellets for stockpiling food. *Applied Environmental Microbiology*, 2012, in press, 査読有.

② Okude M, Matsuo J, Nakamura S, Kawaguchi K, Hayashi Y, Sakai H, Yoshida M, Takahashi K, Yamaguchi H. Environmental chlamydiae alter the growth speed and motility of host acanthamoebae. *Microbes and Environments*, 2012, in press, 査読有

③ Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Abe K, Minami K, Yamaguchi H. Frequency of *Chlamydia trachomatis* in *Ureaplasma*-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. *BMC Infectious Diseases*, 2012, in press, 査読有.

④ Hayashi Y, Yimin, Matsuo J, Nakamura S, Kunichika M, Yoshida M, Takahashi K, Yamaguchi H. A domino-like chlamydial attachment process: *Parachlamydia acanthamoebae* attachment to amoebae is concurrently required for several amoebal released molecules and serine-protease activity. *Microbiology*, 2012, in press, 査読有

⑤ Kubo T, Ishida K, Matsuo J, Nakamura S,

Hayashi Y, Sakai H, Yoshida M, Takahashi K, Hirai I, Yamamoto Y, Yamaguchi H. *Chlamydia trachomatis* serovar L2 infection model using human lymphoid Jurkat cells. *Microbial Pathogenesis*, 2012, in press, 査読有

⑥ Ito A, Matsuo J, Nakamura S, Yoshida A, Okude M, Hayashi Y, Sakai H, Yoshida M, Takahashi K, Yamaguchi H. Amoebal endosymbiont *Protochlamydia* induces apoptosis to human immortal HEp-2 cells. *PLoS ONE*, 7:e30270, 2012, 査読有

⑦ Ishida K, Yamazaki T, Motohashi K, Kobayashi M, Matsuo J, Osaki T, Hanawa T, Kamiya S, Yamamoto Y, Yamaguchi H. Effect of the steroid receptor antagonist RU486 (mifepristone) on an IFN γ -induced persistent *Chlamydomonas pneumoniae* infection model in epithelial HEp-2 cells. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18: 22-29, 2011, 査読有

⑧ Matsuo J, Harimaya A, Fukumoto T, Nakamura S, Yoshida M, Takahashi K, Iida M, Fujii N, Yamaguchi H. Impact of anaerobic and oligotrophic conditions on survival of *Alloiooccus otitidis*, implicated as a cause of otitis media. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17: 478-482, 2011, 査読有

⑨ Kobayashi M, Ishida K, Matsuo J, Nakamura S, Nagasawa A, Motohashi K, Yao T, Hirai I, Yamamoto Y, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Yamaguchi H. *Chlamydomonas pneumoniae* attachment and infection in low proteoglycan expressing human lymphoid Jurkat cells. *Microbial Pathogenesis*, 51: 209-216 2011, 査読有

⑩ Oguri S, Matsuo J, Hayashi Y, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi H. Ciliates promote the transfer of the gene encoding the extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 527-530, 2011, 査読有

⑪ Hayashi Y, Nakamura S, Matsuo J, Fukumoto T, Yoshida M, Takahashi K, Mizutani Y, Yao T, Yamaguchi H. Host range of obligate intracellular bacterium *Parachlamydia acanthamoebae*. *Microbiology and Immunology*, 54: 707-713, 2010, 査読有

⑫ Matsuo J, Oguri S, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Hayashi Y, Kawaguchi K, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Yamaguchi

H. Ciliates rapidly enhance frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles, *Research in Microbiology*, 161: 711-719, 2010, 査読有

⑬ Fukumoto T, Matsuo J, Hayashi Y, Oguri S, Nakamura S, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Yamaguchi H. Impact of free-living amoebae on presence of *Parachlamydia acanthamoebae* in the hospital environment and its survival in vitro without requirement for amoebae. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 3360-3365, 2010, 査読有

⑭ Nakamura S, Matsuo J, Hayashi Y, Kawaguchi K, Yoshida M, Takahashi K, Mizutani Y, Yao T, Yamaguchi H. Endosymbiotic bacterium *Protochlamydia* can survive in acanthamoebae following encystation. *Environmental Microbiology Reports*, 2: 611-618, 2010, 査読有

⑮ Matsuo J, Kawaguchi K, Nakamura S, Hayashi Y, Yoshida M, Takahashi K, Mizutani Y, Yao Y, Yamaguchi H. Survival and transfer ability of phylogenetically diverse bacterial endosymbionts in environmental *Acanthamoeba* isolates. *Environmental Microbiology Reports*, 2: 524-533, 2010, 査読有

⑯ Matsuo J, Kobayashi M, Nakamura S, Mizutani Y, Yao T, Hirai I, Yamamoto Y, Yamaguchi H. Stability of *Chlamydomonas pneumoniae* in a harsh environment without the requirement for acanthamoebae. *Microbiology and Immunology*, 54: 63-73, 2009, 査読有

⑰ Kawaguchi K, Matsuo J, Osaki T, Kamiya S, Yamaguchi H. Prevalence of helicobacter and acanthamoeba in natural environment. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 465-471, 2009, 査読有

[学会発表] (計 20 件)

① Yamaguchi H: BA26 「Intracellular Bacteria and Cell Response」 Pathogenic and environmental chlamydiae, as symbionts in eukaryotes. IUMS2011, Sapporo, 2011. 9.

② Hayashi Y, Yimini, Nakamura S, , M. Takahashi K, Matsuo J, Yamaguchi H: Establishment of *Parachlamydia acanthamoebae*-Specific Monoclonal Antibodies and Their Use for Analysis of Its Bacterial Attachment and Developmental Cycle into *Acanthamoeba*. 111th ASM General Meeting, New Orleans,

USA, 2011, 5.

③ Ishida K, Kobayashi M, Matsuo J, Nakamura S, Yamaguchi H: *Chlamydomonas pneumoniae* Attachment and Infection in Low Proteoglycan Expressing Human Lymphoid Jurkat Cells. 111th ASM General Meeting, New Orleans, USA, 2011, 5.

④ Masumoto M, Yamazaki T, Abe K, Minami K, Matsuo J, Yamaguchi H: Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma* Species with Subtypes on Women Attending Their First Prenatal Visit in A Community Hospital, Sapporo, Japan. 111th ASM General Meeting, New Orleans, USA, 2011, 5.

⑤ Kubo T, Kobayashi M, Nakamura S, Matsuo J, Yamaguchi H: A *Chlamydia trachomatis* LGV Serovar L Infection Model using Established Human Lymphoid Cell line, Jurkat Cells. 111th ASM General Meeting, New Orleans, USA, 2011, 5.

⑥ Okude M, Matsuo J, Nakamura S, Hayashi Y, Yoshida Y, Yoshida M, Takahashi K, Yamaguchi H: Phenotypic Properties in Amoebae Controlled by Environmental *Chlamydia*. 111th ASM General Meeting, New Orleans, USA, 2011, 5.

⑦ Ito A, Matsuo J, Nakamura S, Hayashi Y, Yoshoda A, Yoshoda M, Takahashi K, Yamaguchi H: Amoebal Endosymbiont *Protochlamydia* Induces Apoptosis in Human Immortal Cells by Bacterial Attachment with A Requirement for Viable Bacteria. 111th ASM General Meeting, New Orleans, USA, 2011, 5.

⑧ Ishida K, Kobayashi M, Matsuo J, Nakamura S, Yamaguchi H: *Chlamydomonas pneumoniae* Attachment and Infection in Human Lymphoid Jurkat Cells. IUMS2011, Sapporo, 2011. 9.

⑨ Masumoto M, Yamazaki T, Abe K, Minami K, Matsuo J, Yamaguchi H: Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma* Species on Women Attending Their First Prenatal Visit in A Community Hospital, Sapporo, Japan. IUMS2011, Sapporo, 2011. 9.

⑩ Sato D, Hayashi Y, Nakamura S, Yoshida M, Takahashi K, Matsuo J, Yamaguchi H: Ciliates Expel Pellets Packaged *Legionella pneumophila* for Storing against Emergency (Stockpiling Food). IUMS2011, Sapporo, 2011. 9.

⑪ Kubo T, Kobayashi M, Nakamura S, Matsuo J, Yamaguchi H: A *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 Infection Model using Human Lymphoid Cell line, Jurkat Cells.

IUMS2011, Sapporo, 2011. 9.

⑫ Okude M, Matsuo J, Nakamura S, Hayashi Y, Yoshida Y, Yoshida M, Takahashi K, Yamaguchi H: Environmental *Chlamydiae* Control Growth and Motility of Amoebae. IUMS2011, Sapporo, 2011. 9.

⑬ Ito A, Matsuo J, Nakamura S, Hayashi Y, Yoshoda A, Yoshoda M, Takahashi K, Yamaguchi H: Attachment of Viable *Protochlamydia* Amoebal Endosymbionts to Human Immortal HEp-2 Cells Induced Apoptosis. IUMS2011, Sapporo, 2011. 9.

⑭ 福元達也、松本めぐみ、林 泰弘、秋沢宏次、清水 力、松野一彦、阿部清孝、南 邦弘、山口博之: ヒト生殖器スワブからの環境クラミジア *Parachlamydia acanthamoebae* 遺伝子の検出. 第85回日本感染症学会, 東京, ザ・プリンスパークタワー東京, 2011, 4.

⑮ 小栗 聡、松尾淳司、秋沢宏次、清水 力、鈴木春樹、松野一彦、山口博之: 繊毛虫を介したESBL産生大腸菌Rプラスミド伝播頻度: 繊毛虫数や菌数そして培養環境が伝播頻度に与える影響について. 第85回日本感染症学会, 東京, ザ・プリンスパークタワー東京, 2011, 4.

⑯ 伊藤敦史、布目直保、松尾淳司、中村眞二、山口博之: 環境クラミジア *Protochlamydia* sp. の株化ヒト細胞に対するアポトーシス誘導能. 第29回日本クラミジア研究会, 岐阜, じゅらくプラザ, 2011, 9.

⑰ 林泰弘、伊敏、松尾淳司、中村眞二、山口博之: 偏性細胞内寄生性細菌 *Parachlamydia acanthamoebae* のアカントアメーバへの付着・侵入機構. 第85回日本細菌学会総会, 長崎, 長崎ブリックホール, 2012, 3.

⑱ 石田香澄、久保剛流、伊敏、松尾淳司、中村眞二、山口博之: 病原性クラミジアのリンパ球細胞への感染とIFN γ 抵抗性. 第85回日本細菌学会総会, 長崎, 長崎ブリックホール, 2012, 3.

⑲ 松尾淳司、伊藤敦巳、中村眞二、山口博之: 環境クラミジア *Protochlamydia* はヒト上皮系細胞株HEp-2細胞に対してミトコンドリアを介してアポトーシスを誘導する. 第85回日本細菌学会総会, 長崎, 長崎ブリックホール, 2012, 3.

⑳ 山崎智拓、松本めぐみ、松尾淳司、中村眞二、山口博之: *Chlamydia trachomatis* と *Ureaplasma parvum* の混合感染について: 検出頻度と混合感染が宿主細胞に与える影響. 第85回日本細菌学会総会, 長崎, 長崎ブリックホール, 2012, 3.

[図書] (計2件)

① 山口博之(分担): クラミジア, 326-333, 標準微生物学, 第 11 版, 医学書院, 2012(教科書).

② 山口博之(分担): 第 1 章(1-34), 第 4 章(62-77), 微生物学実践問題, 南山堂, 2011(教科書副読本).

[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

研究成果の一部は当該研究室ホームページ (URL:<http://www.hs.hokudai.ac.jp/yamaguchi/>) にアップした.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 博之 (YAMAGUCHI HIROYUKI)
北海道大学・大学院保健科学研究所・教授
研究者番号: 40221650

(2) 研究分担者

松尾 淳司 (MATSUO JUNJI)
北海道大学・大学院保健科学研究所・助教
研究者番号: 50359486

神谷 茂 (KAMIYA SHIGERU)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号: 10177587

中村眞二: (NAKAMURA SHINJI)
順天堂大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40207882

(3) 連携研究者

なし

