

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670278

研究課題名(和文) 病理学的アプローチより紐解くクラミジア感染症の難治化予測診断マーカーの探索

研究課題名(英文) Search of the predictive diagnosis marker of the Chlamydia infection, using a pathological experiment.

研究代表者

中村 眞二 (Nakamura, Shinji)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40207882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クラミジア(Ct)は、約10%程度の感染がみられる性感染症のポピュラーな原因菌である。このCtを無治療でいると、一部の感染者に繊維化を伴う卵管閉塞など難治化することが知られているが、その理由は不明である。IL-1やPGE2などの炎症性メディエーターの動態を検索し、Ct感染症の難治化の原因を検討した結果、間質の浸潤細胞にIL-1・IL-1Ra・PGE2の陽性細胞を認めたが、Ct感染の有無による所見の差は無かった。Ct感染患者では、扁平及び腺上皮細胞にIL-1とPGE2の強く発現されていた。この結果はPGE2が炎症を慢性化し難治化への誘因の1つとして重要な働きをしていること示唆している。

研究成果の概要(英文)：Chlamydia trachomatis is the most common sexually transmitted pathogen that the approximately 10% of infection are occurred. Leaving the chlamydia infection untreated, leading to complication such as tubal obstruction and fibrosis in part infected person is known, but the reason is unclear. In this study, we investigated the expression of inflammatory mediators including IL-1, IL-1Ra, IL-6 and PGE2 to find a cause of complications, especially fibrosis by chlamydial infections. The positive cells of IL-1, IL-1Ra, and PGE2 were appeared in interstitial infiltrating cells, but there were no significance differences between infected patients with chlamydial and not infected patients. However, in chlamydia infected patient, squamous epithelium and columnar epithelium epithelium of the cervix, and glandular epithelia was celled IL-1 alpha and strong expressions of PGE2. The results suggest that PGE2 plays an important role in the precipitating factor of complication by chlamydia infection.

研究分野：病理学

キーワード：クラミジア 性感染症 インターロイキン1 インターロイキン1レセプターアンタゴニスト プロスタグランジンE2

1. 研究開始当初の背景

クラミジア(*Chlamydia trachomatis*)は健康女性の約 5-10%程度の膣頸管部に感染が見られる性感染症の中でも最もポピュラーな原因である。また、本研究分担者(北大グループ)らも札幌市中の健常妊婦の生殖器スワブ約 14%からクラミジアが検出されることを明らかにしているように、本邦における健常者のクラミジア罹患率は予想以上に高い。クラミジア感染を無治療・放置すると約 2-5%の頻度で骨盤内感染症(PID)に移行し[Haggertyら 2010(JID), Colletら 2011(Int JID)], さらにPID患者の約 15-20%程度は、卵管や卵巣に繊維化を伴う卵管閉塞や子宮外妊娠を起こすことが知られている[Washingtonら 2000(JAMA), Haggertyら 2010(JID)]。何故一部の女性でのみ難治化が起こるのだろうか。またクラミジア感染症の難治化は予想できないだろうか。

また、IL-1Ra は、IL-1(α や β)とアミノ酸レベルで 19-30%の相同性を示す 22-25kDa の二量体の糖蛋白だが[Arend1991(JCD)], IL-1 受容体に結合しても細胞にシグナルは伝わらない。故に IL-1Ra は、IL-1(α や β)の IL-1 受容体への結合を競合的に阻害し IL-6・PGE2 を介した組織の繊維化を抑える可能性がある。また IL-1Ra の欠損は重篤な皮膚炎を起こすので、このアンタゴニストは過剰な免疫応答を沈め自己免疫疾患の発症を防ぐ上でも重要な働きを演じている[Aksentijevichら 2009 (N Eng J Med)]。

その一方で、クラミジア感染症を含む慢性的な炎症反応の引き金を引く様々な細菌感染症への IL-1Ra の診断・治療への応用はいまだない。IL-1Ra がかりにクラミジアのような繊維化を伴う慢性感染症に効果があるのなら、難治化したクラミジア感染者では、その感染局所において IL-1Ra が激減しているはずである。すなわち、感染局所で産生される IL-1Ra の検出は、クラミジア感染症の難治化を占う的確なマーカーになりうる可能性が高い。実際のクラミジア感染粘膜面では、IL-1Ra の産生は感染症の慢性化を阻止しているのか大変興味深い。

そこで実際のクラミジア感染患者生殖器粘膜面での IL-1 と IL-1Ra(周辺シグナルメディエーターも含む)のバランスシートを主に病理学的視点より解析し、クラミジア感染症の難治化予測診断マーカーの探索を計画した。

2. 研究の目的

生体内に侵入したクラミジアは主に粘膜上皮細胞内に形成した『封入体』と称する細胞膜小胞内で増殖するが、同時に IL-1 を主体とする様々な炎症性サイトカイン・ケモカインを産生誘導することも古くから知られている[Rothmel 1989 (Infect Immun), Abdul-Saterら 2009(JBC)]。クラミジアの細胞内増殖は NOD1 から NFkB を介して

IL-1a の産生を誘導するが [Welter-Stahlら 2006(Cell Microbiol), Kavathasら 2012(Mucosal Immunol)], 分泌された IL-1a は IL-1 受容体を介してマクロファージをさらに活性化する [Charles2009 (Annu Rev Immunol), Franchiら 2012 (Nat Immunol)]。活性化マクロファージは、インフラマソーム・カスパーゼ 1 依存的に IL-1 β を産生し [Franchiら 2012 (Nat Immunol)], その刺激は炎症性メディエーター(IL-6 や PGE2)を介し繊維芽細胞の浸潤を誘発すると考えられている [Charles2009 (Annu Rev Immunol)]。このようにクラミジア感染症に伴う線維化を伴う難治化は、クラミジア自身の細胞内増殖ではなく、むしろ IL-1 を主体とする炎症性サイトカインを介した二次的な生体反応に強く依存している可能性が高い。その一方で、生体内の IL-1 (α と β) からの細胞刺激は、マクロファージより産生される IL-1 受容体アンタゴニスト IL-1Ra の抑制制御下にあつて無秩序な細胞刺激は入らない。これらから IL-1 と IL-1Ra とのバランスシートの乱れがクラミジア感染症の難治化への関与が明らかになれば、これを基礎とした診断が可能になると考えられる。

さらに、クラミジア感染時の IL-1Ra と IL-1 のバランスシートの乱れは、実際の臨床の現場で非侵襲的検査のメルクマールになる可能性を検討するため、クラミジア感染が疑われる非淋菌性尿道炎の患者尿を対象として検証する。尿検体は、仙台の市中病院より提供を受ける(研究協力者: あいきりニック・伊藤)。尿検体沈渣からは PCR にてクラミジア遺伝子を検出するとともに、上清からは IL-1 や IL-1R などの炎症性メディエーターを抗原レベルで検出する。またクラミジア陽性患者の陰転化と炎症性メディエーターの検出量との関連性についても経時的にモニタリングし、感染の遷延化を助長する因子を探索する。尿検体からはクラミジア遺伝子とさまざまな炎症性メディエーターを同時に検出する必要がある。

本研究では、まずクラミジア感染が認められたパピローマ検診後の子宮頸管部粘膜面残余ハパラフィンブロック検体より免疫組病理学的に IL-1 と IL-1Ra を検出し炎症所見と照合しながら検討する。また実際の非淋菌性尿道炎患者の尿からも IL-1 と IL-1Ra を検出しクラミジア感染症の遷延化との関連を探索する。さらに試験管内の実験にて IL-1Ra がクラミジアの細胞内での増殖にどのような影響を与えるのかを検証する。以上を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)クラミジア感染症例の検索。パピローマウイルス検診後残余パラフィンブロック標本からのクラミジア陽性標本のスクリーニングした。まず苫小牧市立病院より提供されたパピローマウイルス検診後残余パラフィン

ブロックより、パラフィン切片を作成後、脱パラフィンを行い、DNAを抽出した。その後、クラミジア遺伝子特異プライマーを用いてPCRを施行し、クラミジア感染の有無を検索し、陽性症例群と陰性群に分類した。尚、臨床検体を取扱いにあたり、順天堂大学および北海道大学の倫理委員会の承認を得ている。

(2)子宮頸管部粘膜におけるクラミジア感染細胞と炎症性メディエーターの免疫組織化学的検討。クラミジア感染陽性症例群と陰性群それぞれからパラフィン切片を作製し、まず、PCRでクラミジア感染陽性となった症例で、抗クラミジア抗体を用いて感染細胞を特定する。さらに、IL-1(α , β), IL-1Ra, IL-6, PGE2, TNF α , Caspase-1に対する特異抗体を用いて免疫染色を実施し、クラミジア感染における子宮頸管部粘膜での炎症性メディエーターの動向を検証した。抗体は、IL-1 α (GeneTex, Inc., GTX113088, rabbit polyclonal, 1:200), IL-1 β (Santa Cruz Bio., sc-7884, rabbit polyclonal, 1:100), IL-1Ra (Santa Cruz Bio., sc-374084, rabbit polyclonal, 1:50), IL-6 (Biorbyt Ltd., orb10911, rabbit polyclonal, 1:100), PGE2 (Biorbyt Ltd., orb6819, rabbit polyclonal, 1:300), TNF α (Proteintech, 60291, mouse monoclonal, 1:100), Caspase-1 (Cell Signaling Technology, Inc., 2225, rabbit polyclonal, 1:50), Chlamydia trachomatis (Biorbyt Ltd., orb23918, mouse monoclonal, 1:100)を使用した。Chlamydia trachomatisの以外の抗体は、全てクエン酸バッファの熱処理による抗原性賦活化を施した。検出はポリマー試薬 ImmPRESS Reagent (Vector Laboratories Ltd.)で検出し、発色はDABで行い、ヘマトキシリンで核染色、光学顕微鏡 (Zeiss Axioplan2) で観察した。

(3)子宮頸管部粘膜における炎症性メディエーターの網羅的な解析。免疫組織化学的検討で用いたパラフィン標本よりRNAを抽出し、ランダムシーケンスの配列から炎症性メディエーターの網羅的な動きも検証確認する計画であったが、検体が生検のため、非常に小さくRNAの回収量が解析に不十分だったので、ターゲットを蛋白に変更して実施した。先ず、クラミジア感染陽性群と陰性群から各々3症例を抜粋し、子宮頸管部粘膜の重層扁平上皮のみをレーザーマイクロダイセクションにより採取し、Trypsin (Promega, V5111)で分解処理し、LC/MS (液体クロマトグラフィー質量分析法)にて炎症性メディエーターの網羅的な蛋白質の解析を行った。

4. 研究成果

(1)PCRによるクラミジア陽性標本のスクリーニングによって、クラミジア陽性標本5症

例を得たが、検証に十分な症例数を確保するには至らなかった。

(2)クラミジア感染細胞は子宮頸部粘膜の重層扁平上皮細胞 (Fig.1 左) や腺上皮 (Fig.1 右) にも認められた。

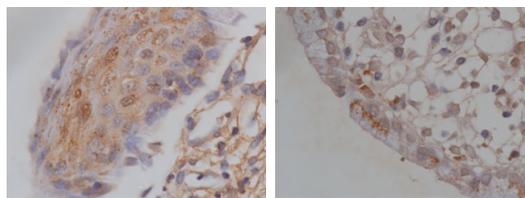


Fig.1 Chlamydia trachomatis (Ct)

炎症性メディエーターの検索では、子宮頸部間質の浸潤細胞にIL-1(α や β)・IL-1Ra・IL-6・PGE2の陽性細胞を認めた (Fig.1-4) が、クラミジア感染陽性群と陰性群間における陽性所見の明らかな差は認めなかった。

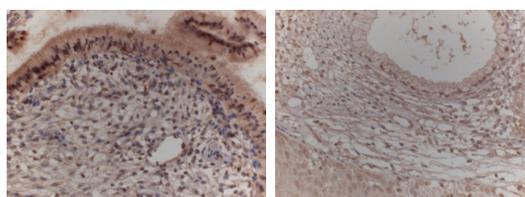


Fig.2 IL-1 α 左 CT(+), 右 CT(-)

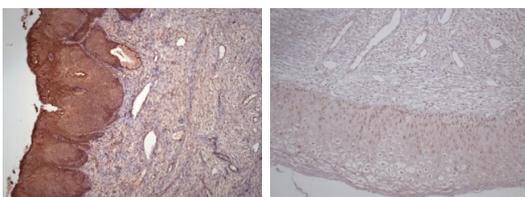


Fig.3 IL-1 β 左 CT(+), 右 CT(-)

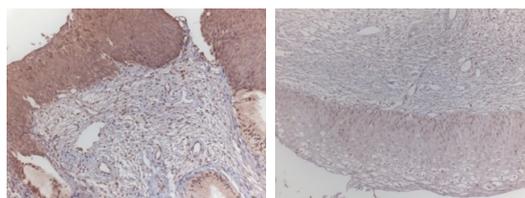


Fig.4 IL-6 左 CT(+), 右 CT(-)

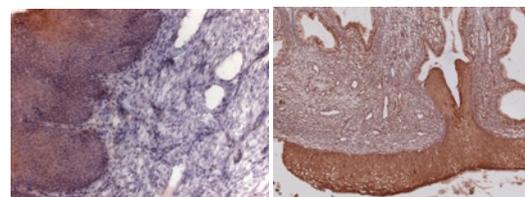


Fig.5 IL-1Ra 左 CT(+), 右 CT(-)

クラミジア感染陽性群の中に、IL-1 α や IL-6 陽性の浸潤細胞が多数見られた症例があり、この症例のIL-1Ra陽性浸潤細胞は、少ない傾向であった (Fig.5)。

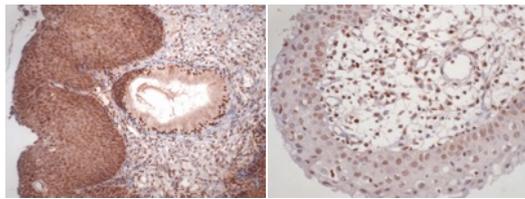


Fig.6 PGE2 左 CT(+), 右 CT(-)

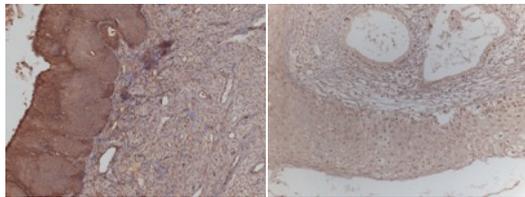


Fig.7 IL-1α 左 CT(+), 右 CT(-)

子宮頸部の扁平上皮においては、IL-1Ra がクラミジア感染陽性群と陰性群と共に発現が認められた (Fig. 5). 一方クラミジア感染陽性群に、扁平上皮細胞及び腺上皮細胞に IL-1α と PGE2 の強く発現されていた症例があり、これは陰性群では認められない所見であった (Fig. 6, 7).

線維芽細胞に作用しコラーゲンなどの関連遺伝子の誘導を起こして線維化を促進する PGE2 が、免疫細胞や炎症の場である上皮や間質組織に高発現していたことは、炎症を慢性化に誘導して、そのことが難治化への誘因の1つとして重要な働きをしていることを示唆している。

これらの症例において IL-1 と IL-1Ra とのバランスシートの乱れによって、線維化が惹起されるような明確な証拠は免疫組織化学的所見からは得ることができなかった。

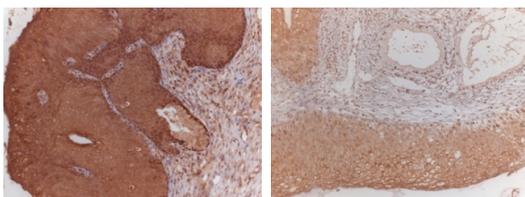


Fig.8 Caspase1 左 CT(+), 右 CT(-)

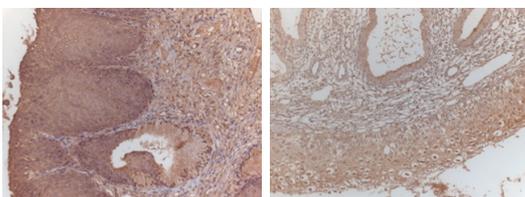


Fig.9 TNFα 左 CT(+), 右 CT(-)

また、Caspase-1 は、クラミジア感染陽性群症例の扁平上皮に高発現し、間質の浸潤細胞にも陽性細胞が多数認められた。陰性群では、中程度の発現であり、浸潤細胞では、弱陽性の細胞が認められるのみだった (Fig. 8). PGE2 の産生律速段階酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) の誘導型 COX-2 の誘導には、IL-1 の関与が大きいとされているが、今回の

結果から、PGE2 の扁平上皮における高発現は、Caspase-1 による可能性を示している。

TNFα の組織内分布は、Caspase-1 に類似していたが、Caspase-1 に比べ、腺細胞にも扁平上皮と同程度の発現が認められた (Fig. 9).

クラミジア感染陽性中に子宮頸部粘膜の扁平上皮に PGE2 など多くの炎症関連分子が発現している症例を認めたことの意義は、今後、検討していく必要があると考える。

(3) 子宮頸管部粘膜上皮における網羅的蛋白質解析により、1,155 のタンパク質が同定された。クラミジア感染陽性群及び陰性群において、各群でのスペクトラル・カウント (SpC) での相対値が 70%以上かつ群間 G-検定値 $p < 0.05$ で、全 $SpC > 5$ を有意タンパク質とし、更に各群に有意なタンパク質の PPI 解析を実施した結果、クラミジア感染陽性群において Natural killer cell mediated cytotoxicity が有意に高発現していた。今回用いた症例は、パピローマウイルス検診の症例で炎症と関わりのある組織を使用したことが影響したとも考えられる。IL-1α と PGE2 やそれらに関連する蛋白はリストアップされなかった。

申請当初の実際非淋菌性尿道炎患者の尿からも IL-1 と IL-1Ra を検出しクラミジア感染症の遷延化との関連を探索および試験管内の実験にて IL-1Ra がクラミジアの細胞内での増殖への影響の検証は、臨床サンプルの入手が困難になったことなどの諸事情により準備のみで実験には入れなかった。

今回解析に使用した症例は、パピローマウイルス検診後残余パラフィンブロック標本だったので、背景に感染・炎症の影響を排除できないのと、特にクラミジア感染陽性群においては、病理学的所見からも明らかに扁平上皮の増生が認められ、既に正常の組織とは言えないサンプルが含まれており、クラミジア感染と炎症性メディエーターとの関係を検証するには、問題があった可能性があり、今後検討を継続する時は、症例の適切な選別が必須である。

クラミジア感染の難治化に関して、間質の浸潤細胞を線維化の中心に推論したが、今回の免疫組織化学の結果から、扁平上皮の関与の可能性も考えられ、予想以上に複雑な機序が存在するのかもしれない。本研究は、IL-1Ra IL-1 のバランスシートの乱れを実際のクラミジア感染粘膜面での確に捉えようとする研究の方向性は世界に類を見ない斬新で独創的でチャレンジングな研究であったが、本研究の最終目的であった IL-1Ra を用いた難治化予想マーカーの開発には、まだ多数の症例の解析が必要である。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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

中村 眞二 (NAKAMURA, Shinji) 順天堂大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 4 0 2 0 7 8 8 2

(2) 研究分担者

松尾 淳司 (MATSUO, Junji) 北海道大学・保健科学研究所・講師
研究者番号: 5 0 3 5 9 4 8 6

石津 明洋 (Ishizu, Akihiro) 北海道大学・保健科学研究所・教授
研究者番号: 6 0 3 2 1 9 5 7

(3) 連携研究者

(4) 協力研究者

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: 4 0 2 2 1 6 5 0

伊藤 晋 (ITO, Shin)