

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860859

研究課題名(和文) 早産起因微生物、ウレアプラズマの宿主細胞感染メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of *U. parvum* infection mechanism

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)・免疫部門・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) 3,000,000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。流早産胎盤における *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* は宿主細胞に取り込まれた後、微小管に沿って移動しERまで運ばれた後、ガレクチンの集積が起こり一部の *U. parvum* がオートファジーによって分解されていた。さらにリサイクリングエンドソームに取り込まれて細胞外へエクソサイトーシスされ、新たな宿主細胞に再感染している事も示された。

研究成果の概要(英文)：Genital mycoplasmas, including *Ureaplasma* spp., are among the smallest human pathogenic bacteria and are associated with preterm birth. *U. parvum* was internalized into HeLa cells by clathrin-mediated endocytosis and survived for at least 14 days around the perinuclear region. After 3 h of infection, *U. parvum* induced the cytosolic accumulation of galectin-3 and was subsequently entrapped by the autophagy marker LC3. However, when using atg7^{-/-} MEF cells, autophagy was inadequate for the complete elimination of *U. parvum* in HeLa cells. *U. parvum* also colocalized with the recycling endosome marker Rab11. Furthermore, the exosomes purified from infected HeLa cell culture medium included *U. parvum*. In these purified exosomes ureaplasma lipoprotein multiple banded antigen, host cellular annexin A2, CD9, and CD63 were detected. This research has successfully shown that *Ureaplasma* spp. utilize the host cellular membrane compartments possibly to evade the host immune system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ウレアプラズマ 絨毛膜羊膜炎 オートファジー エクソサイトーシス

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、ガードネレラ、ウレアプラズマなどが明らかにされている。そのなかでも私たちは、ウレアプラズマによる子宮内感染に着目し研究を行っている。私達は、流産胎盤の42%から本菌が同定され、絨毛膜羊膜炎と優位に正の相関を示した(Namba, F. *et al.*, *Pediatr Res.* 2010)。ウレアプラズマは通常健康な人からも分離され、常在菌であるのか、病原細菌であるのか長らく議論があった。Menon, R. *et al.*, (*Am J Obstet Gynecol.* 2009) の論文では加熱後の死菌は培養細胞において炎症反応が惹起されないと報告し、一方、Shimizu T. *et al.*, (*Immunology.* 2011)、Li, Y.H. *et al.*, (*Biol Neonate.* 2001) は、ウレアプラズマの外膜タンパク質である精製 MBA で炎症性サイトカインの発現が誘発されている事を示した。しかし、いずれも培養細胞系での検討で流産との関連を示すことは出来なかった。最近、私達はウレアプラズマの外膜タンパク質 MBA が TLR を介して炎症反応を起こし、妊娠マウスにおいて流産や早産を起こす事を報告した (Uchida, K. *et al.*, *J Reprod Immunol.* 2013)。菌の発見から60年を経て、これらの検討から漸く流産を引き起こす病原因子の単離に至った。また、ナノ粒子を用いた研究からウレアプラズマの菌体の大きさが妊娠マウス胎盤機能を障害することも見出した (Yamashita K. *et al.*, *Nat Nanotechnol.* 2012)。以前から研究室では母体が本菌に対する IgG を有している事が明らかにしていたが、なぜ感染を防御できないのかは不明であった。最近、私達はヒトウレアプラズマがクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって宿主細胞内に侵入し、細胞内で増殖する事、侵入後初期エンドソームから後期エンドソームへと細胞内を移動している事を明らかにした。

近年、病原細菌やウイルスによる感染症において、宿主細胞は細胞質に入り込んだ病原

性細菌を見つけ出し、オートファゴソーム、そしてリソソームへと輸送した後分解することにより、細胞質における病原性微生物の増殖を抑制している (Randow, F. and Munz, C. *Trends Immunol.* 2012) ことが報告されている。宿主細胞内へ侵入したバクテリアやウイルスは、異物を排除する機構として宿主細胞内でオートファジーによって分解されている事が報告されている (Birmingham, C. L., *et al.*, *J Biol. Chem.* 2006, Kageyama, S. *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 2011)。このような事実から、ウレアプラズマが宿主細胞内へ侵入した際に、宿主細胞でのオートファジーによって分解されているのか明らかにする。

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や宿主細胞のウレアプラズマに対する免疫応答、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*) を培養細胞 (HeLa, MEF, Atg7 knockout MEFs) の培養液に加え、宿主細胞へ侵入後の細胞内局在因子の関係やオートファジーとの関係についてエンドソームのマーカーである Rab11、オートファジーのマーカーである LC3 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。また、微小管、ガレクチン 3, 8, 9S, annexinA2

を安定発現する細胞株を作製し *U. parvum* を Vybrant™ Cell-Labeling Solutions DiI で蛍光ラベルした後、細胞内に取り込ませて *U. parvum* との関係について蛍光顕微鏡観察を行った。さらに *U. parvum* の再感染の可能性について調べる為にエクソソーム関連因子、CD9, CD63, annexin A2 との相互作用についても抗体を用いて免疫染色やウェスタンブロッティングを行い再感染能力について明らかにした。

4. 研究成果

早産由来の *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、*U. parvum* はクラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれた後、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ことが明らかになった。さらに宿主細胞内に侵入した *U. parvum* の細胞内局在について詳細に調べた。細胞骨格タンパク質である微小管を安定発現する細胞株を作製し、DiI ラベルした *U. parvum* を感染させてライブイメージングを行ったところ、細胞内に侵入した *U. parvum* は微小管に沿って移動しているのが観察された。ノコダゾール処理して微小管の構造を崩壊させると細胞内の *U. parvum* は細胞全体に広がって局在していたことから、細胞内に取り込まれた *U. parvum* は微小管に沿って各細胞小器官に運ばれているのではないかと考えられる。宿主細胞に取り込まれた *U. parvum* が ER に局在しているのが観察された。ER に *U. parvum* が局在していたことから取り込まれた *U. parvum* がオートファジーによって分解されている可能性があるか、HeLa やオートファゴソーム形成に関与している Atg7 KO, WT MEFs 細胞に *U. parvum* を感染させてオートファジーのマーカである LC3 の抗体を用いて調べた。その結果、HeLa や WT MEF 細胞では LC3 と *U. parvum* が共局在しているのが免疫蛍光染色で観察されたが、Atg7 KO MEF 細胞では *U. parvum* 感染によるオートファジーは誘導されなかった。さらに

U. parvum 感染細胞と非感染細胞において WB 解析を行ったところ、オートファジー誘導の際に上昇が確認される LC3-II のタンパク量の増加が認められたことから、*U. parvum* 感染によってオートファジーの誘導が起きている事が示された。Atg7 WT, KO MEF 細胞に *U. parvum* を感染させて Gentamicin invasion assay を行い感染細胞内での *U. parvum* 生存数について調べた。その結果 WT に比べ KO MEF 細胞で *U. parvum* の生存数が増加しているのが示された。この結果は、宿主細胞に感染した *U. parvum* の一部がオートファジーによって分解されている可能性がある事を示唆していると考えられる。これまで種々の細菌が細胞内に侵入しオートファジーが活性化されるとガレクチンが細菌を被覆し、リソソームと結合している事が明らかになっていることから、*U. parvum* 感染によってガレクチンが集積するか調べた。ガレクチン 3 を安定発現する細胞株を作製し *U. parvum* を感染させて免疫蛍光染色を行い観察した結果、感染前は細胞全体に局在していたガレクチンが *U. parvum* 感染によってドット状に局在し *U. parvum* と共局在しているのが観察された。さらにガレクチン 8、9s の安定発現細胞株を作製し、作製された細胞株に *U. parvum* を感染させてガレクチンの集積が起こるか調べたところ、ガレクチン 8、9s はガレクチン 3 と同様に *U. parvum* 感染によって集積しているのが観察された。*U. parvum* 感染によるガレクチン 3 の集積がエンドサイトーシスのどの時期に起きているかを調べたところ、後期エンドソームのマーカである LAMP1 とガレクチン 3 の局在が一致している事が明らかになり、ガレクチンが後期エンドソームからオートファジー活性に関与している事が示唆された。これらの結果からガレクチンが宿主細胞を細菌感染から保護している可能性が示唆された。また、宿主細胞内に取り込まれた *U. parvum* の一部はオートファジー経路を逸脱し、少なくとも 14 日間は宿主細胞内で生存している事が確認さ

れた。そこで、細胞内に侵入し生存している *U. parvum* のその後の挙動について解析を行った。宿主細胞内に取り込まれた *U. parvum* の一部はリサイクリングエンドソームのマーカである Rab11 と共同在しているのが観察された。*U. parvum* の一部がリサイクリングエンドソームに取り込まれていたことから細胞外にエクソサイトーシスされているか調べた。小胞輸送やエンドサイトーシス、エクソサイトーシスに関与し、細胞内から細胞外へ膜を通過することが明らかになっている annexinA2-EGFP を安定発現する細胞株を作製し、作製された細胞株に DiI ラベルした *U. parvum* を感染させて、24 時間後にエクソソーム画分を分離してきて観察を行った。感染 24 時間で annexinA2 と *U. parvum* が共同在しているのが観察された。感染 24 時間後の培養上清を回収しエクソソーム画分に DiI ラベルされた *U. parvum* が含まれているか蛍光顕微鏡観察したところ、annexinA2-EGFP と DiI ラベルされた *U. parvum*、さらに DAPI の局在が一致しているのが観察された。さらにエクソソーム画分をエクソソームのマーカである CD63, CD9, annexinA2 と *U. parvum* の抗体 MBA を用いて Western blotting を行ったところ、*U. parvum* を感染させていないサンプルには MBA は検出されなかったが、*U. parvum* を感染させたエクソソーム画分には MBA が検出されたことから、感染させた細胞から *U. parvum* がエクソサイトーシスされている事が示された。感染 24 時間後のエクソソーム画分が含まれている培養上清を *U. parvum* を感染させていない WT HeLa 細胞の培養ディッシュに入れて 24 時間後に観察したところ、WT HeLa 細胞の細胞質に annexinA2-EGFP と DiI ラベルされた *U. parvum* が局在しているのが観察された。この結果から *U. parvum* を含むエクソソームが新たな宿主細胞への感染能力を有している事が示唆された。

宿主細胞に感染した *U. parvum* は、宿主細胞膜を利用しながら、免疫グロブリン等の宿主

の免疫機構を回避している可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1) 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、第 41 号、26-7、
2014

2) 西海史子、柳原格

U. parvum 感染とガレクチンの関係
日本マイコプラズマ学会誌、第 43 号、15-16、
2016

3) Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* Serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan. *Genome Announc.* 2014 May 22;2(3). pii: e00256-14. doi: 10.1128/genomeA.00256-14. Wu HN, Nakura Y, Motooka D, Nakamura S, Nishiumi F, Ishino S, Kawai Y, Tanaka T, Takeuchi M, Nakayama M, Fujita T, Yanagihara I.

4) Surfactant protein-D attenuates the lipopolysaccharide-induced inflammation in human intestinal cells overexpressing toll-like receptor 4.

Saka R, Wakimoto T, Nishiumi F, Sasaki T, Nose S, Fukuzawa M, Oue T, Yanagihara I, Okuyama H. *Pediatr Surg Int.* 2016
Ja+*n;32(1):59-63. doi:
10.1007/s00383-015-3812-y.

5) Human thioredoxin-1 attenuates the rate of lipopolysaccharide-induced preterm delivery in mice in association with its anti-inflammatory effect.

Namba F, Kobayashi-Miura M, Goda T, Nakura Y, Nishiumi F, Son A, Kubota A, Yodoi J,

Yanagihara I. *Pediatr Res.* 2016 Sep;80(3):433-9.
doi: 10.1038/pr.2016.100.

6) Intracellular fate of *Ureaplasma parvum*
entrapped by host cellular autophagy.

Nishiumi F, Ogawa M, Nakura Y, Hamada Y,
Nakayama M, Mitobe J, Hiraide A, Sakai N,
Takeuchi M, Yoshimori T, Yanagihara I.
Microbiologyopen. 2017 Jan 15. doi:
10.1002/mbo3.441.

〔学会発表〕(計3件)

1) 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41回学術集
会 東京 (2014.5.22-23)

2) 西海史子、柳原格

Ureaplasma parvum の細胞内侵入メカニズ
ムの解析
第88回 日本細菌学会総会 岐阜
(2015.3.26-28)

3) 西海史子、柳原格

U. parvum 感染とガレクチンの関係
日本マイコプラズマ学会 第43回学術集
会 長崎 (2016.6-24-25)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

西海 史子 (Fumiko Nishiumi)

大阪府立母子保健総合医療センター研究
所 免疫部門 流動研究員
研究者番号：60599596