

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00819

研究課題名(和文)カンピロバクター感染による栄養飢餓をターゲットとした栄養療法有用性の検討

研究課題名(英文)The study of nutrition starvation in *Campylobacter jejuni* infection for nutritional therapy

研究代表者

下畑 隆明 (SHIMOHATA, Takaaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：90609687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは一部の侵入性細菌の分解機構として働くことが知られている。しかし食中毒原因菌カンピロバクター・ジェジユニとオートファジーに関する研究報告は未だにない。本研究ではカンピロバクター感染におけるオートファジーの役割について研究を行った。カンピロバクター感染で誘導されるオートファジーは侵入菌と共局在を示さず、またオートファジー阻害剤処理は、上皮細胞内のアミノ酸含有量と菌の生存を低下させた。アミノ酸添加量に応じて細胞内での菌の生存が上昇するため、カンピロバクターが細胞侵入後に生存する上で、オートファジーは生存に重要なアミノ酸供給源としての役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Campylobacter jejuni is a major cause of bacterial hood borne illness worldwide. C. jejuni virulence is closely associated with entering into host epithelial cells. Against to invasive bacteria, autophagy is activated for bacterial clearance. But it is not clear how autophagy effect on the bacteria survive in invading C. jejuni. Here we investigated the role of autophagy in C. jejuni-infection. C. jejuni infection induced autophagy in host epithelial cells, but autophagy-associated proteins did not co-localized with C. jejuni. Additionally, inhibition of autophagy decreased bacterial survival and amino acid content in infected cells. The survival rate of intracellular bacteria were up-regulated by amino acid supplementation. Those data indicate that induction of autophagy could contribute to survive of C. jejuni in epithelial cells efficiently. Our data suggest that autophagy must be target of nutritional treatment in infection disease.

研究分野：食品衛生学

キーワード：Campylobacter jejuni Autophagy Amino acid

1. 研究開始当初の背景

腸管感染症による死亡の原因は『脱水』であり、脱水は『下痢』によって引き起こされる。WHO の提唱する下痢治療として糖と電解質の補給を目的とした経口補水療法 (Oral Rehydration Therapy :ORT) があり、特に発展途上国のコレラ治療で救命的な効果を得ている。経口補水療法における経口補水液 (Oral Rehydration Solution :ORS) は Na-グルコース共輸送体による電解質、糖質の細胞への取り込みを促すことで脱水状況を寛解させる。近年では先進国においても、熱中症の改善・対策にも積極的に用いられ、経口補水療法は発展を遂げている。

腸管における水の移送は腸管上皮細胞の Na⁺チャネル (吸収) と Cl⁻チャネル (分泌) の活性によってイオンバランスが保たれており、そのイオンの濃度勾配に従って水は移行する。そのため下痢症は、その発症機序から水や電解質が異常に分泌される『分泌型』、電解質の吸収障害に伴う『吸収障害型』、大きく2つに分類される。イオン輸送の主要因子として cAMP 依存性 Cl⁻チャネルの CFTR が知られており、CFTR は Cl⁻イオンチャネルの活性だけでなく、他のイオンチャネル活性にも関わり、イオン輸送の制御因子として機能している。コレラ菌が産生するコレラトキシンは腸管上皮細胞で細胞内 cAMP を増加させ CFTR を活性化し、水を管腔側へ引きよせる事で下痢を誘発することが知られている。コレラトキシンなど CFTR を介した『分泌型』の下痢症においては経口補水療法の効果が得られているが、CFTR の活性化を伴わない『吸収障害型』の下痢、または炎症などによる『漏出型、滲出型』の下痢症に関しては経口補水療法の有効性について化学的根拠が十分に得られていない。

2. 研究の目的

日本で最も多い食中毒はカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) であり、その発生件数は細菌性食中毒の約半数にも上る事が報告されている。カンピロバクターはコレラ菌のような毒素を産生する株も少なく、主要な病原因子は特定されていないため下痢発症機序も未だ不明である。申請者はこれまでの研究で腸管上皮細胞のイオン輸送に関する研究で、カンピロバクター感染では CFTR の活性は低下し、コレラトキシンとは異なる下痢発症機序により下痢症が誘導されていることを明らかにしてきた (Negoro, Shimohata et al. J Infect Chemother. 2014)。さらにカンピロバクター感染に感染した腸管上皮細胞内では、細胞内異化経路として知られる、オートファジーが誘導され、(データ未発表)、アミノ酸イオンバランスが生じている可能性を示してきた (データ未発表)。

これまでの申請者の①～③の研究結果か

ら、カンピロバクター感染による下痢症はコレラトキシンによる『分泌型』の下痢と異なるメカニズムで誘導され、アミノ酸代謝変動を伴う栄養障害が生じていることが予想される。本研究ではカンピロバクター感染によるエネルギー供給障害や、アミノ酸代謝障害のメカニズムを解明し、感染緩和や治療を目的とした経口補水療法に、既存の補水液に考慮されてこなかったアミノ酸補充の有用性の検討を行う事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではカンピロバクター感染によるオートファジー誘導機構の解明(1)、感染によるアミノ酸飢餓と栄養動態の解析(2)、主に2つの観点から研究を進めた。

(1)カンピロバクター感染によるオートファジー誘導機構の解析としては感染宿主細胞内におけるシグナル変動の解析、カンピロバクターのオートファジー誘導因子の検索、2種類の実験を行った。

(2)感染細胞における栄養動態の変動解析においては、CE-MS によるメタボローム解析を中心に検討を行い、アミノ酸を中心に注目し細胞内侵入菌の生存との関連について解析を進めた。

4. 研究成果

(1)カンピロバクター感染によるオートファジー誘導機構の解析 感染宿主細胞内におけるシグナル変動の解析

近年、細胞侵入菌の除去システムとして、選択的オートファジー(ゼノファジー)が誘導されることが知られている。カンピロバクター感染によるオートファジー誘導の確認をウエスタンブロットング解析で行い、またオートファジーの誘導と細胞侵入菌の生存の関連についてゲンタマイシンプロテクションアッセイによる評価を行った。

オートファゴソーム形成のマーカータンパク質、LC3-II の解析を行うと、カンピロバクター感染時間依存的に LC3-II の蓄積が生じていることが確認できた。一方、選択的オートファジーによる分解の指標として用いられる p62 や NDP52 については、感染による分解の亢進は確認できなかった。

免疫染色を行い、宿主細胞に侵入したカンピロバクターとオートファゴソーム、オートリソソームの局在を確認しても、侵入菌との共有は確認されず、宿主細胞に侵入したカンピロバクターはオートファジーによる異物の除去機構に認識されていないことが示唆された。

一方で大変に興味深いことに、オートファジーの阻害剤存在下で細胞侵入菌の生存を評価すると、オートファジーの阻害で菌の生存がむしろ低下することが明らかとなった。以上の結果から、カンピロバクター感染にお

いて誘導されるオートファジーは菌の除去機構と言うよりも、むしろ菌の生存を助ける働きを示していることが示唆された。

(1)カンピロバクター感染によるオートファジー誘導機構の解析 カンピロバクターのオートファジー誘導因子の検索

カンピロバクター感染におけるオートファジー誘導機構について解析を進めると、主要な病原因子とされている接着・浸入性を欠損したカンピロバクター変異株 (CapA::cm^r) においてもオートファジーが誘導される事が明らかとなった。一方で加熱死菌ではオートファジーが誘導されず、生菌の産生する何らかの因子が細胞外からオートファジーを誘導していることが示唆された。そこで、感染実験後の培養上清を回収し、加熱処理や限外濾過フィルター処理を行い、オートファジー誘導因子の特徴について解析を行った。研究期間内にオートファジー誘導因子を特定することができなかったが、オートファジー誘導因子は耐熱性の 3kDa 以下の化合物であるという事が明らかとなった。

(2)感染細胞における栄養動態の変動解析

カンピロバクターは他の菌と異なり、糖質のエネルギー利用能が著しく低く、代わりにアミノ酸を炭素源にエネルギー代謝を行っていることが知られている。特にセリン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸に対する嗜好性が高く、これらのアミノ酸を主に炭素源として利用することが知られている。

オートファジーは宿主細胞侵入菌に対するアミノ酸の供給機構となっている可能性が考えられるため、感染細胞におけるアミノ酸含有量について解析を行い、アミノ酸供給と菌の細胞内生存の関連について検討を行った。

CE-MS によるメタボローム解析の結果から、興味深いことに、感染上皮細胞内ではセリン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸は低値となっているものの、その他多くのアミノ酸含有量が増加している事が明らかとなった。また感染後の培養上清をアミノ酸含有培地に置換し、細胞内生存菌数を調べてみると、添加したアミノ酸量依存的に宿主細胞内での生存菌数の割合が高くなる事が明らかとなり、アミノ酸が細胞内の菌の生存に関与する事が明らかとなった。

カンピロバクター感染細胞におけるアミノ酸含有量の変化に対し、オートファジーオートファジーがどれだけ関与しているのかを明確にするため、オートファジー阻害剤 (パフィロマイシン A1) 存在下でのアミノ酸含有量の変化について解析を行って見た。オートファジー阻害剤処理により、部分的にアミノ酸含有量の上昇が抑制された事から、感染細胞のアミノ酸含有量の変化に、一部オートファジーが加担している事が明らかとなった。

以上の検討結果から、カンピロバクター感染で誘導されるオートファジーは異物の分解機構として誘導されるオートファジー (ゼノファジー) とは異なっており、宿主細胞に侵入したカンピロバクターを認識しない事が明らかとなった。また感染で誘導されるオートファジーは、一部細胞内でのアミノ酸含有量に影響し、菌の細胞内での生存に利用されている可能性を示した。

本研究は、栄養・エネルギー供給と密接な関わりを持つオートファジーが、カンピロバクター感染における新しい治療のターゲットとなる可能性を示した。研究期間内では、アミノ酸が細胞内での菌の生存を高める機構を明らかにする事が出来なかった点や、細胞内での菌の生存に影響するアミノ酸の種類を特定できていない点など、多くの疑問点を残している。しかしながら将来的に栄養・エネルギー代謝の観点からカンピロバクターに特化した、新しい栄養療法治療の構築につながる新しい切り口を構築する事出来たと考えている。

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 2 件)

Hatayama Sho, Shimohata Takaaki, Amano Sachie, Kido Junko, Nguyen Anh Q, Sato Yuri, Kanda Yuna, Tentaku Aya, Fukushima Shiho, Nakahashi Mutsumi, Uebanso Takashi, Mawatari Kazuaki, Takahashi Akira. Cellular Tight Junctions Prevent Effective *Campylobacter jejuni* Invasion and Inflammatory Barrier Disruption Promoting Bacterial Invasion from Lateral Membrane in Polarized Intestinal Epithelial Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018 Jan 30;8:15. (査読あり)

Kido Junko, Shimohata Takaaki, Amano Sachie, Hatayama Sho, Nguyen Anh Quoc, Sato Yuri, Kanda Yuna, Tentaku Aya, Fukushima Shiho, Nakahashi Mutsumi, Uebanso Takashi, Mawatari Kazuaki, Takahashi Akira. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Reduces Microtubule-Dependent *Campylobacter jejuni* Invasion. *Infection and Immunity*. 2017 Sep 20;85(10). (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

天宅あや、下畑隆明、畑山翔、NGUYEN QUOC ANH、木戸純子、福島志帆、上番増喬、馬渡一諭、高橋章「*Campylobacter jejuni* 感染における小胞体ストレス応答は菌の侵入を抑制する」第 91 回日本細菌学会総

会、2019年3月27-29日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

福島志帆、下畑隆明、畑山翔、木戸純子、天宅あや、上番増喬、馬渡一諭、高橋章「*Campylobacter jejuni* 感染で誘導されるオートファジーは、宿主上皮細胞における菌の侵入および生存を促進する」第256回徳島医学会学術集会、2018年2月11日、徳島大学大塚講堂（徳島県・徳島市）

下畑隆明、木戸純子、畑山翔、上番増喬、馬渡一諭、高橋章「代謝産物の解析から紐解く *Campylobacter jejuni* の宿主細胞内生存戦略」第70回日本細菌学会中国・四国支部総会、2017年10月14-15日、広島大学東広島キャンパスレセプションホール（広島県・東広島市）

福島志帆、下畑隆明、畑山翔、木戸純子、天宅あや、神田結奈、鳴滝涼香、石田快、上番増喬、馬渡一諭、高橋章「*Campylobacter jejuni* 感染で誘導されるオートファジーは菌のクリアランス機構として働くのか」第38回日本食品微生物学会学術総会、2017年10月5-6日、徳島県郷土文化会館（徳島県・徳島市）

木戸純子、下畑隆明、天野幸恵、畑山翔、佐藤優里、神田結奈、天宅あや、福島志帆、中橋睦美、上番増喬、馬渡一諭、高橋章「CFTR reduced microtubule-mediated *Campylobacter jejuni* invasion」日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会、2017年8月8日、京都大学東南アジア研究所関連施設稲盛財団記念館3階大会議室（京都府・左京区）

畑山翔、下畑隆明、天野幸恵、木戸純子、神田結奈、天宅あや、福島志帆、中橋睦美、上番増喬、馬渡一諭、高橋章「宿主腸管上皮細胞の Tight Junction 形成が食中毒原因菌 *Campylobacter jejuni* の侵入機構に及ぼす影響について」第71回日本栄養食糧学会、2017年5月19-21日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県・宜野湾市）

天宅あや、下畑隆明、木戸純子、上番増喬、馬渡一諭、高橋章「*Campylobacter jejuni* 感染における小胞体ストレスの誘導」第91回日本感染症学会総会・学術講演会、2017年4月6-8日、京王プラザホテル（東京都・新宿区）

下畑隆明、木戸純子、佐藤優里、畑山翔、神田結奈、福島志帆、天宅あや、上番増喬、馬渡一諭、高橋章「*Campylobacter jejuni* infection activates amino acid uptake in HeLa cell」第90回日本細菌学会学術総会、2017年3月19-21日、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

下畑隆明、福島志帆、佐藤優里、扶川留音、木戸純子、神田結奈、天宅あや、畑山翔、中橋睦美、上番増喬、馬渡一諭、

高橋章「*Campylobacter jejuni* の宿主細胞内生存戦略に関する検討」第69回日本細菌学会中国・四国支部総会、2016年10月15-16日、かがわ国際会議場（香川県・高松市）

下畑隆明、福島志帆、佐藤優里、扶川留音、木戸純子、神田結奈、天宅あや、畑山翔、中橋睦美、上番増喬、原田永勝、馬渡一諭、高橋章「上皮細胞に侵入した *Campylobacter jejuni* のエネルギー獲得機構について」第37回日本食品微生物学会学術総会、2016年9月15-16日、タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

下畑隆明、佐藤優里、扶川留音、木戸純子、天野幸恵、畑山翔、中橋睦美、上番増喬、原田永勝、馬渡一諭、高橋章「代謝解析で明らかとなった *Campylobacter jejuni* 感染による宿主細胞での特徴的なアミノ酸変動について」第89回日本細菌学会総会、2016年3月23-25日、大阪国際交流センター（大阪府・大阪市）

佐藤優里、下畑隆明、扶川留音、根来幸恵、畑山翔、木戸純子、上番増喬、原田永勝、馬渡一諭、高橋章「メタボローム解析を用いた宿主細胞内の *Campylobacter jejuni* のエネルギー源獲得機構の検索」第8回日本カンピロバクター研究会総会、2015年12月3-4日、京都大学桂キャンパス（京都府・京都市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下畑 隆明 (SHIMOHATA, Takaaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：90609687