

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17470

研究課題名（和文）性器クラミジア感染による活性酸素の調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of adjustment mechanisms of reactive oxygen species by chlamydial infection

研究代表者

山崎 智弘（YAMAZAKI, Tomohiro）

北海道医療大学・医療技術学部・講師

研究者番号：10784829

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：性器クラミジアは、性感染症の主要な原因細菌である。一方、活性酸素（ROS）の産生増加は、がん細胞の発生に関与しているとされる。性器クラミジア感染でも感染細胞内でのROSの調節が報告されており、NADPHオキシダーゼ（Nox）の発現調節などが関与していると考えられている。そこで、本研究では、性器クラミジア感染時のNox発現について調査したが、Nox発現には有意な変化は見られなかった。しかし、Nox阻害剤やROS産生を調整する試薬を用いると性器クラミジアの増殖が抑制されることが確認された。このように、性器クラミジアの増殖には細胞内ROS産生が何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Nox阻害剤や他のROS調節試薬を使用することで性器クラミジアの増殖に影響を与えることを明らかにした。これにより、細胞内ROS産生が性器クラミジアの細胞内増殖に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。今後さらなる研究により、性器クラミジアの感染細胞内でのROS調節機構を明らかにすることで、性器クラミジアの病態形性機構の解明に繋がり、感染拡大の防止に貢献できるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：Chlamydia trachomatis is one of the main causes of sexual transmitted disease worldwide. On the other hand, the increased production of reactive oxygen species (ROS) thought to be involved in the development of cancer cells, and it has been reported that C. trachomatis modulates ROS production in infected host cells. It is considered that regulation of the expression of NADPH oxidase (Nox) is involved in chlamydial ROS regulation. Therefore, in this study, we investigated the expression of Nox during chlamydial infection, but no significant difference was found. However, it was confirmed that Nox inhibitor and other ROS regulating reagents suppress the chlamydial growth. Thus, it was suggested that intracellular ROS production may have some influence on the growth of C. trachomatis.

研究分野：病態解析学

キーワード：性器クラミジア 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

(1) 性器クラミジア感染症

性器クラミジア (*Chlamydia trachomatis*) は、世界中で 1 億 2 千万人以上の感染者が存在している性感染症の原因菌である (WHO Guidelines 2012)。我が国でも、厚生労働省の「感染症発生動向調査」で報告されている種々の性感染症の中で、性器クラミジア感染症は毎年 2 万 5 千人程度の感染者が発生しており、最も感染者数の多い性感染症である。加えて、性器クラミジア感染症の多くは無症候性であり、感染者が気付かぬうちにパートナーや性行為相手に感染を拡大してしまうことで、感染が拡大してしまう問題点がある。そのため、既に性感染症の中で最大の感染者数を示しているにもかかわらず、実際の感染者数は報告者数よりもさらに多いとかがえられている。また、性器クラミジアは偏性細胞内寄生性という、細胞内でのみ増殖するという特異な性質を有しているため、感染してヒト細胞内に入り込んだ性器クラミジアには宿主の免疫機構である抗体が有効に働かず、一度治療しても再感染が容易である。このため、性器クラミジア感染症は、感染の拡大を抑止することが難しい感染症のひとつである (Walker ら PLoS One 2008)。

(2) 性器クラミジアの病態

性器クラミジアは偏性細胞内寄生性という特異な性質のために、感染宿主の細胞内に潜り込むことで、宿主の防御機構となる抗体や炎症性サイトカインなどの免疫機構から回避する術を有している (Witkin ら Clin Vaccine Immunol 2017)。そのため、性器クラミジア感染症は慢性化しやすく、感染が長期化することで生殖器粘膜層が癒痕化し、慢性炎症が起こり、その結果として骨盤内炎症性疾患 (PID) や不妊の原因となる (Lusk と Konecny Curr Opin Infect Dis 2008)。さらに、慢性炎症が継続することに加えて、疫学的にも卵巣がんや子宮頸がんとの関連性が強く示唆されている (Trabert J Natl Cancer Inst 2019、Zhu Medicine (Baltimore) 2016)。

(3) がん形成と活性酸素種

一般に、がん細胞の形成には活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) の増加が関与しているのではないかと考えられている (Vaughn と Deshmukh Nat Cell Biol 2008)。例えば、乳がん細胞では、ミトコンドリアの ROS 産生が増加することによって、エストロゲンによる細胞増殖が促進され、がん細胞の成長を促進していることが明らかとなっている (Liou と Storz Free Radic Res 2010)。加えて、ROS は細胞内の様々なシグナル応答に関係していることが分かっており、例えば細胞内の ROS が増加することで、IL-1 や IL-8 などの炎症性サイトカインが増加することが知られている。さらに、ROS によって NF- κ B が活性化することにより、Caspase 経路が活性化され、アポトーシスが誘導されることも分かっている (D'Autréaux と Toledano Nat Rev Mol Cell Biol 2007)。このアポトーシスの誘導とがん細胞の増殖は逆の反応のように思われるが、ROS が増加することでがん細胞の増殖がアポトーシスによる細胞死以上に促進され、がんの進行が起こっている可能性が示唆されている (Assi Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2017)。このように、ROS は細胞のがん化およびがん細胞の増殖に決定的な役割を担っていると考えられ、性器クラミジアとの関連性が示唆されている卵巣がんや子宮頸がんの発生にも影響している可能性が高いと考えられる。

(4) 性器クラミジア感染細胞での ROS の働き

細胞内 ROS 産生は、Small GTPase の一つである Rac1 を介した NADPH オキシダーゼ (Nox) の活性化によって引き起こされる。反対に、ROS は還元型グルタチオン (GSH) によって還元され減少することが分かっている。GSH は γ -グルタミンスクロトランスフェラーゼとして働く Chac1 によって分解されるが、GSH が分解されると、ROS の減少が抑制され、その結果、細胞内 ROS は増加する。また、ROS 自身も Chac1 の発現を上昇させることが知られており、さらに ROS が増加する結果となる (Chen ら Oncotarget 2017)。性器クラミジア感染においても、ROS が感染早期に増加し、感染後期には減少することが報告されている (Gaëlle ら Infect Immun 2010)。しかし、性器クラミジア感染における ROS 調節がどのような経路を介して起こるのか、また、性器クラミジア感染による病態形成にどのような役割があるかはまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、上記のような背景を元に、性器クラミジア感染による細胞内 ROS 調節機構がどのような経路で起こるのかを明らかにしたいと考えた。そのために、本研究課題では、「Nox 経路を介した ROS 誘導シグナルの解明」および「GSH 経路を介した ROS 調節機構の解明」の 2 つに焦点を当ててまず検討を行った。加えて、「細胞内 ROS を変化させる薬剤によって、性器クラミジア感染がどのように変化するか」について検討した。

3. 研究の方法

(1) 性器クラミジア感染実験の菌数測定

性器クラミジア L2-434Bu 株は HeLa 細胞に加え、800 × g、30 分間遠心し、吸着感染させた。感染後、上清を新鮮な 10% ウシ胎児血清入りダルベッコ改変イーグル培地(10% FCS-DMEM) に交換し、37 °C、5% CO₂ 条件下で 48 時間培養した。培養後、感染 HeLa 細胞を削り取り、チューブに回収して、-80 °C で 1 晩以上保存した。解凍した検体を段階希釈し、新しい HeLa 細胞に加え、800 × g、30 分間遠心し、吸着感染させた。その後、上清を 2 ng/mL Cycloheximide 入り 10% FCS-DMEM に交換し、37 °C、5% CO₂ 条件下で 48 時間培養した。培養後、エタノールで細胞を固定し、抗クラミジア LPS 抗体 (デンカ生研) で染色し、蛍光顕微鏡で性器クラミジアが形成する細胞内封入体の数をカウントし、菌数とした (封入体形成単位: IFU)。

遺伝子発現実験および細胞内 ROS 産生を変化させる薬剤を用いた実験に使用する性器クラミジアは、HeLa 細胞への感染多重度 (MOI) 3 になる様に感染させた。感染後、適当な時間になるまで 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。それぞれの実験に適当な時間で、感染 HeLa 細胞を削り取ってチューブに回収し、-80 °C で 1 晩以上保存した。解凍して細胞を凍結融解した後、IFU を測定して菌数とし、性器クラミジアの増殖能の変化を確認した。

ROS 産生関連遺伝子ノックダウン細胞への感染実験については、本研究室で別の研究のために作製されていた、shRNA を導入した細胞を使用して、同様に性器クラミジアを感染させて実験した。

(2) 核酸抽出およびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

感染細胞の DNA は、ハイピュア PCR テンプレートプレパレーションキット (Roche) を用いて、RNA は FastGene™ RNA 精製キット (日本ジェネティクス) を用いて、説明書に沿って抽出した。RNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて、逆転写し、cDNA を合成した。

抽出された核酸は、Taq polymerase (New England Biolabs) を用いて、PCR にて複製し、定性的に評価した。定量評価には、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用いて、リアルタイム PCR を行った。

(3) ROS および GSH の測定

感染細胞における ROS 産生の評価は、ジヒドロエチジウム (Funakoshi) または CellROX™ Green Reagent, for oxidative stress detection (Thermo Fisher Scientific) を用いて、蛍光顕微鏡および蛍光プレートリーダーにて評価した。

4. 研究成果

(1) 性器クラミジア感染細胞における Nox 発現

胃がんの原因となるピロリ菌感染では胃上皮細胞において、Rac1 および Nox を介して ROS 産生が増加している (Hartog ら PLoS Pathog 2016)。また、ピロリ菌感染が胃上皮細胞の細胞内 GSH を抑制し、その結果 ROS が増加することも知られている (Beil ら Dig Dis Sci 2000, Shirin ら Cancer Lett 2001)。そこで、本研究では、性器クラミジア感染細胞における Rac1 および Nox の発現量を調べた。しかしながら、Nox 発現には有意な変化が見られなかった。一方、Nox の発現量を抑制する薬剤を用いたところ、性器クラミジアの増殖に影響があることが確認された。このことから、性器クラミジアの増殖に Nox が直接的に関連している可能性は少ないが、Nox を介した細胞の変化は性器クラミジアの増殖に影響を与えている可能性が示唆された。

(2) 性器クラミジア感染細胞における ROS 産生

ROS 産生の増加は、細胞のがん化との関連が示唆されているが、性器クラミジアによる病態形成における ROS の役割は明らかではない。そこで、本研究では、性器クラミジア感染細胞における ROS の測定を試みた。しかしながら、ジヒドロエチジウムおよび CellROX™ Green Reagent, for oxidative stress detection を用いて測定した ROS 産生能に有意な変化は見られなかった。また、技術的な問題点として、性器クラミジアによる細胞がん化を考慮して慢性感染を意図した HeLa 細胞での 48 時間培養実験では、HeLa 細胞自身が過増殖状態となり、細胞密度の上昇によって ROS 産生が増加してしまっていた。そのため、様々な条件で検討をしてはみたものの、非感染細胞と感染細胞での ROS 産生状態の違いを測定することが困難であった。

(3) GSH 経路を介した ROS 調節と性器クラミジア感染の関連性解析

Chac1 はアポトーシス促進する因子として発見された GSH を分解する酵素であり、ROS の調節に関与しているとされる (Mungrue ら J Immunol 2009)。ピロリ菌感染細胞において、Chac1 が過剰に発現誘導され、その過剰産生された Chac1 が GSH を分解することで、細胞内 ROS が増加し、がん化に関与している可能性が報告されている (Wada ら FEBS Open Bio 2018, Ogawa ら Helicobacter 2019)。そこで本研究では、Chac1 発現を shRNA で抑制したノックダウン細胞で性器クラミジアの増殖能を調べた。しかしながら、Chac1 ノックダウン細胞で性器クラミジアの増殖能に有意な変化は観察されなかった。

(4) ROS 産生を変化させた際の性器クラミジアの細胞内増殖能の変化

また、Nox や ROS 産生の性器クラミジア増殖能への影響を調べるために、ROS 産生を調節する試薬を用いて実験を行った。結果として、ROS 産生調整試薬によって性器クラミジアの増殖に変化が出ることが観察された。

これらのことから、Nox や Chac1 などのピロリ菌感染で既存の ROS 調節因子は直接的には性器クラミジアの増殖には関与していない可能性が高いが、細胞内 ROS そのものは性器クラミジアの増殖に密接に関連している可能性が高いことが示唆された。このことから、性器クラミジア感染と細胞のがん化に ROS が関連している可能性があり、研究を進めることで性器クラミジアによるがん形成機序の解明に繋がるのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------