

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6月6日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790410

研究課題名（和文）

オリエンチア・ツツガムシが産生すると予想されるペプチドグリカンの機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of peptidoglycan of *Orientia tsutsugamushi*.

研究代表者

中山 恵介（NAKAYAMA KEISUKE）

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：10347057

研究成果の概要（和文）：

マウス感染モデルにおいてホスホマイシンがツツガムシ病の治療効果を示すことが明らかとなった。マウス生存率の上昇に必要な薬剤量を体重換算すると、ヒトへの投与量として適切な範囲に収まること、また現在、治療に用いられているテトラサイクリンとは作用機序が異なることから、本剤はアレルギー等でテトラサイクリン系が使用できない場合の代替薬、あるいはテトラサイクリン系との併用薬として、ツツガムシ病の治療に新規に用いることができると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Fosfomycin showed curative effect of the Tsutsugamushi disease in a mouse infection model. It was thought that fosfomycin was also useful for treatment of the Tsutsugamushi disease in humans as a concomitant or/and alternative agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：微生物、細菌、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

恙虫病は、東アジアや東南アジアを中心とする広い範囲に分布する疾患で、世界における年間総罹患者数は100万人を超えると推定されている。日本では四類感染症に分類され、1980年代初頭から患者数が増加している再興感染症である。本疾患の起因菌であるオリエンチア・ツツガムシは、ダニの一種であるツツガムシの体細胞中で共生状態を維持している。一方、ダニの刺咬に伴い哺乳動物に移行した菌は、刺咬部周辺にてマクロファー

ジや好中球の貪食を受けるものの、それらの細胞質中で増殖した後、血行性に全身に広がり、微小血管内皮細胞に侵入・増殖して恙虫病を引き起こす。適切な治療が行われなかった場合には30%以上という高い致死率を示す疾患であるものの、その病原性メカニズムはほとんど解明されておらず、ワクチンも存在しない。

申請者のグループは、オリエンチア属細菌の代表的な強毒株であるオリエンチア・ツツガムシ IKEDA 株の全塩基配列（2,008,987bp）

を決定し、詳細なゲノム解析を行った。この結果、これまでオリエンチアには存在しないとされてきた PGN の合成遺伝子群（ムレインモノマー合成遺伝子群）が一部を除きほぼ完全に保存されていることが明らかになった（K.Nakayama et al., DNARes.15,2008）。プロテオーム解析により、これらの遺伝子産物が確認され（未発表データ）、PGN 合成系が機能している可能性が示されたため、各種細胞壁合成阻害剤の感受性試験を行った。この中で、宿主細胞内移行性の高いホスホマイシンを培地に加えたところ、オリエンチアの増殖を顕著に抑制することが明らかになった（図 1）。この増殖抑制効果は、オリエンチアに PGN 成分が存在し、細菌の増殖や安定性に影響している可能性を強く示唆している。現在この知見を恙虫病の治療に応用すべく、マウスを用いた動物実験を行っている段階である。本菌には N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンを重合する transglycosylase や、LipidII 内のペンタペプチドにおける D-ala-D-ala 間を開裂する低分子量ペニシリン結合蛋白質をコードする遺伝子が存在しないことから、一般的な網目状構造を持つ PGN 層が形成されている可能性は低いと考えられる。さらに、ペプチド鎖の構成成分である D-ala を L-ala に変換する *alr* 遺伝子を欠如していることを考慮すると、「L-Ala-D-Glu-mesoDAP」に「N-アセチルムラミン酸-N-アセチルグルコサミン」が結合した GM-Tri-DAP や、「N-アセチルムラミン酸」が結合した M-Tri-DAP が合成系の終産物であると推測される。GM-Tri-DAP や M-Tri-DAP は、哺乳動物細胞の細胞質に存在し、PGN 構成成分を認識する自然免疫系分子・NOD1、NOD2 の代表的なリガンドとして知られている。リガンドを認識した NOD 分子は炎症反応関連遺伝子群の転写因子である NF- κ B の活性化を誘導する。実際にオリエンチア感染細胞では NF- κ B の活性化が認められるが、本菌には LPS が存在しないことから、異型 PGN が炎症反応の惹起を引き起こしている可能性が高い。さらに NF- κ B の活性化は、細胞内寄生菌の消化・殺菌に関与する宿主細胞のオートファジーを抑制する因子の一つであることが報告されており、異型 PGN が宿主細胞内におけるオリエンチアの増殖に NF- κ B の活性化を介して働いている可能性も示唆される。このように、異型 PGN の機能や、異型 PGN を認識するヒトの免疫機構を明らかにすることは、恙虫病の病原性メカニズムを明らかにする上で非常に重要であるため、その解明を試みる。

2. 研究の目的

恙虫病の起原菌であるオリエンチア・ツツガムシ（以下、オリエンチア）はリケッチア科

に属するグラム陰性細菌である。偏性細胞内寄生菌である本菌には、一般的な遺伝学的実験手法を用いることが困難であるため、その病原性メカニズムはほとんど明らかになっていない。これまで本菌にはペプチドグリカン（以下、PGN）が存在しないとされてきたが、申請者が中心となって行ったゲノム解析の結果、PGN 合成に関わる遺伝子群が一部を除いてほぼ完全に保存されていることが明らかになった。そこで各種細胞壁合成阻害剤の感受性試験を行ったところ、宿主細胞移行性の高いホスホマイシンがオリエンチアの増殖を強く抑制するという知見を得た。ホスホマイシンによる増殖抑制効果は、本菌の宿主細胞内増殖に PGN が重要な役割を果たしていることを示唆しているが、PGN 合成遺伝子群の構成から、オリエンチアの PGN は通常とは異なる構造をもつことが予想される。このような異型 PGN の機能や、これを認識するヒトの免疫機構を明らかにすることは病原性メカニズムを解明する上で重要であることから、オリエンチア・ツツガムシが産生すると予想される異型 PGN の同定、異型 PGN を認識する宿主細胞因子の特定、異型 PGN の細胞内増殖への関与の解明を試みる。

3. 研究の方法

オリエンチアが産生すると予想される PGN について、現在までに「ホスホマイシンのオリエンチア増殖抑制効果の解析」「オリエンチア感染マウスに対するホスホマイシンの効果の解析」「精製オリエンチア菌体を対象とした PGN 成分の同定」を行ってきた。本申請では、これらの解析結果をもとに異型 PGN がオリエンチア増殖に果たす役割を明らかにするための解析を行う。これまでの解析から、精製したオリエンチア菌体には PGN 構成成分が極めて少量しか存在しないことが明らかになっている。そこで、オリエンチアが増殖中の宿主細胞からの「①異型 PGN の同定」をアミノ酸分析装置を用いて試みる。この解析では、オリエンチアの増殖に伴う異型 PGN 量の変化や、異型 PGN の構造の解明に繋がるデータを得ることも目標とする。次段階として、異型 PGN に対する宿主側の認識機構を明らかにするための解析を行う。初めに、オリエンチア感染細胞における NF- κ B の活性化レベルを経時的に定量し、炎症反応惹起のタイミングや異型 PGN の合成パターンとの相関を明らかにする（「②オリエンチア感染細胞における NF- κ B の活性化パターンの解析」）。次に、自然免疫機構である NOD1・2 分子によって異型 PGN が認識されるか明らかにするため、「③ NOD1・2 のノックアウト細胞株における NF- κ B 活性化パターンの解析」を行う。これらの解析結果から異型 PGN が NOD 分子を介して炎症

反応の惹起に関与している可能性が示唆された場合には、「④異型 PGN が細胞内増殖に与える影響の解析」を行い、NF- κ B の活性化がオートファジーの抑制を通じて本菌の細胞内増殖に関与しているか明らかにする。

【22 年度】

①異型 PGN の同定

宿主細胞にオリエンチアを接種後、1 日・3 日・5 日・7 日が経過した時点で宿主細胞と共にオリエンチアを回収する。セルホモジナイザーを用いて機械的に破壊して得た破砕物懸濁液を遠心分離して粗細胞壁を得た後、酵素処理と化学的処理により PGN 分画を得る。この PGN 分画を用いてアミノ酸組成とペプチド構造の決定を行う。アミノ酸組成については、加水分解した PGN を自動アミノ酸分析計を用いて同定する。宿主細胞には PGN の構成成分であるムラミン酸や D-isoGln は存在しないため、これを指標に PGN の同定を行う。ペプチド構造の決定については化学法によって行う予定である。これらの解析については、広島大学大学院医歯薬学総合研究科細菌学教室の菅井基行教授の指導を受ける。解析装置については同教室設置の機器を利用することが可能である。

②オリエンチア感染細胞における NF- κ B の活性化パターンの解析

オリエンチア感染細胞では NF- κ B の活性化が認められる。この NF- κ B の活性化が異型 PGN に起因するものか検討するため、初めに NF- κ B の活性化パターンの詳細を明らかにする。各宿主細胞に Lipofectamine2000Reagent (Invitrogen) を用いて、NF- κ B の活性化レベルに応じてルシフェラーゼを産生する (NF κ B)6-tk-ELuc (PEST) プラスミド (TOYOBO) をトランスフェクションする。トランスフェクション後の宿主細胞をルシフェリンを添加した培地にて 24 時間培養した後、オリエンチアを M.O.I.=1~10 で接種し、細胞培養機能搭載のルミノメーター:Kronos・Dio (ATTO) を用いて 15 分ごとに 10 秒間の発光強度リアルタイム積算測定を行いながら 5 日間培養を行う。次に、培養の各段階においてホスホマイシンを添加し、異型 PGN の合成を止めた後のパターンの変化を観察する。また、ファゴソームから宿主細胞の細胞質に移行するものの、増殖が進まず 2~3 日の内に消化されることが観察されているオリエンチア弱毒株・KUROKI 株等を用いた感染実験も並行して行い、病原性の違いと NF- κ B の活性化レベルの相関を明らかにする。

【23 年度】

③NOD1・2 のノックアウト細胞株における NF- κ B 活性化パターンの解析

NOD 分子による異型 PGN の認識と NF- κ B 活性化の関係を明らかにするため、siRNA による NOD1・2 のノックアウト細胞株にオリエンチ

アを感染させ、NF- κ B 活性化パターンを明らかにする。siRNA には santacruz 社製の NOD1siRNA、もしくは NOD2siRNA を使用する。宿主細胞へのトランスフェクションは、同社のレンチウイルス・ノックダウンシステムを用いる。RT-PCR を用いて転写抑制効果を確認すると共に、抗 NOD 抗体 (santacruz) を用いて NOD 産生の抑制レベルを確認した後、本細胞にオリエンチアを感染させ、NF- κ B の活性化レベルを明らかにする。

④異型 PGN がオートファジーに与える影響の解析

NF- κ B の活性化は、細胞内寄生菌の消化・殺菌に関与するオートファジーを抑制する因子の一つであることが報告されていることから、異型 PGN が NF- κ B の活性化を介してオリエンチアの増殖に関与している可能性が示唆される。そこで初めに、オリエンチア感染細胞におけるオートファジーの動態を明らかにするための解析を行う。宿主細胞にオリエンチアを接種後、3 時間・12 時間・1 日・2 日・3 日・5 日が経過した時点で宿主細胞を回収・可溶化処理し、MBL 社製の抗 LC3 抗体を使用してウェスタンブロッティングを行いオートファゴソームのマーカー蛋白質である LC3-I と LC3-II の定量を行う。この結果をもとに、NOD 分子のノックアウト細胞株を宿主細胞に用いる条件下や、ホスホマイシン添加時におけるマーカー蛋白質の変動を明らかにし、異型 PGN がオートファジー機能に与える影響を検討する。同様に、オートファジーによる宿主細胞内消化を受けることが予想されるオリエンチア弱毒株を感染させた際のマーカー蛋白質の発現量についても明らかにする。また、抗 LC3 抗体を用いたオリエンチア感染細胞の免疫染色を行い、オートファゴソームの局在性を解析する。これらと並行して、オートファジー関連蛋白質である Atg5 を欠損するマウス胎児由来繊維芽細胞である RCB2711 を宿主に用いてオリエンチアの培養を行い、ホスホマイシン添加による増殖性の変化を解析する。なお、水島昇博士が樹立した RCB2711 細胞については、同博士の使用許可を得た上で理研バイオリソースセンターから既に分与を受けており、解析に使用できる状態である。

4. 研究成果

22 年度は主に「*in vivo* におけるホスホマイシンのオリエンチア増殖抑制効果の検討」を行った。L929 細胞を用いて培養したオリエンチア Ikeda 株を 1×10^4 菌体ずつマウス腹腔内に接種し、菌体接種 5 日後から 0、10、20、30、50mg のホスホマイシン (FOSMICIN-S) を 1 日 1 回・14 日間にわたり腹腔内投与した。菌体接種から 23 日後 (ホスホマイシン投与終了 5 日後) までマウスの生存率と体重変化

を観察した結果、0mg 投与群ではオリエンチア接種後 17 日目までに全頭が死亡し生存率が 0%だったのに対し、10、20mg 投与群では生存率が 50%に上昇し、死亡例についても生存日数の延長効果が認められた。さらに 30mg 以上の投与群では生存率が 100%となり、マウス感染モデルにおいてホスホマイシンがツツガムシ病の治療効果を示すことが明らかとなった。さらに、投薬条件の最適化を図るため、0、2.5、5、10mg のホスホマイシンを 1 日 2 回 (10 時と 18 時)・14 日間にわたり腹腔内投与し、同様の観察と解析を行った結果、0mg 投与群では菌体接種後 15 日目までに全頭が死亡し生存率が 0%だったのに対し、2.5mg・1 日 2 回投与群では生存率が 50%に上昇し、死亡例についても生存日数の延長効果が認められた。さらに 5mg および 10mg・1 日 2 回投与群では生存率が 100%となり、複数回に分けて投与することにより、より少ない濃度で治療効果が得られることが明らかとなった。マウス生存率の上昇に必要な薬剤量を体重換算すると、ヒトへの投与量として適切な範囲に収まること、また現在、治療に用いられているテトラサイクリンとは作用機序が異なることから、本剤はアレルギー等でテトラサイクリン系が使用できない場合の代替薬、あるいはテトラサイクリン系との併用薬として、ツツガムシ病の治療に新規に用いることができると考えられた。研究代表者は、平成 23 年 4 月 1 日に宮崎大学医学部感染症学講座から同大医学部感覚運動医学講座眼科学分野に異動した。このため、平成 23 年度は主として、①平成 23 年度までに行った解析に使用した技術の伝達、②平成 23 年度までに行った解析において生じた検体の整理と移譲、③「*in vivo* におけるホスホマイシンのオリエンチア増殖抑制効果の検討」結果の論文化、④異動先での新たな実験・解析設備の準備と解析系の再構築を行った。①については、宮崎大学医学部感染症学講座客員研究員である山本正悟博士や大学院生である北野智一氏に対し、リアルタイム PCR 法を用いたオリエンチア・ツツガムシ菌体数定量法等を中心に全ての実験系で伝達が完了している。現在も協力研究体制のもと、申請研究は継続して行われている。②に関しては、他の研究機関からの分譲検体も含め、全てをデータベース化した上で、宮崎大学フロンティア科学実験センター・微生物ラボ附属 P3 実験施設内の超低温冷凍庫内に施錠して保存中である。③に関しては、in submission の状態である。④については、使用するリアルタイム PCR 装置の変更に伴い必要となった反応系の再構築と最適化を行い、前講座での解析と同列で使用できる結果を得ることが可能となっている。現在、オリエンチア以外の菌種も含め、NF- κ B の活性化と

細胞内寄生菌の消化・殺菌に関するオートファジーの抑制について解析を開始している。

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 1 件)

1. K. Nakayama, et al., Genome Comparison and Phylogenetic Analysis of *Orientia tsutsugamushi* Strains., DNA Research, 査読有、17、2010、281-291

[学会発表] (計 2 件)

1. 中山恵介、細胞壁合成阻害剤オリエンチアの増殖に与える影響、第 18 回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー、2010 年 6 月 13 日、佐渡市

2. 中山恵介・林 哲也、*R. heilongjiangensis* のゲノム解析・*O. tsutsugamushi* 新規分離株の MSL 解析、第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会、2011 年 1 月 15 日、大津市

[図書] (計 1 件)

中山恵介、医薬ジャーナル社、改訂版 人獣共通感染症、2011 年、176-180

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 恵介 (NAKAYAMA KEISUKE)

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：10347057