

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15465

研究課題名（和文）新規*Helicobacter cinaedi*由来病原因子の構造解析と病原性評価研究課題名（英文）Structural analysis and virulence assessment of novel factor in *Helicobacter cinaedi*

研究代表者

青木 沙恵（Aoki, Sae）

国立感染症研究所・細菌第二部・研究員

研究者番号：10908453

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000 円

研究成果の概要（和文）：Caco-2細胞およびHT29細胞に*H. cinaedi*を感染させ、lactate dehydrogenaseを測定することで細胞傷害性を評価したところ、HcaAの欠損によって傷害性が有意に低下した。また細胞への接着実験では、HcaAの欠損によりCaco-2細胞への付着菌数が有意に減少した。C57BL/6マウスに野生株およびHcaA欠損株を感染させ、感染後7、14、および28日目に細菌の定着を評価したところ、HcaAの欠損により定着菌数が有意に減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、*H. cinaedi* が産生するタンパク質であるHcaAが病原性を有しており、感染病態に寄与している可能性を示した。特に、HcaAによる接着能は生体内においても認められたことから、*H. cinaedi*の感染成立に寄与していることが明らかとなった。したがって、多様な感染病態を示す *H. cinaedi* 感染症における HcaAの役割を明らかにし、*Helicobacter* 属菌の新規病原因子の解明や、*H. cinaedi* 感染メカニズムに対する理解につながることを期待されるものである。

研究成果の概要（英文）：The cytotoxicity of *H. cinaedi* infection in Caco-2 and HT29 cells was assessed using a lactate dehydrogenase assay, and it was found that cytotoxicity significantly decreased upon HcaA knockout. Adhesion assays further revealed that the HcaA-knockout strain showed significantly reduced attachment to Caco-2 cell compared to that of the wild-type strain. Furthermore, when C57BL/6 mice were infected with wild-type and HcaA-knockout strains, bacterial colonization was evaluated on days 7, 14, and 28 post-infection. The results indicated that the number of colonized bacteria significantly decreased in mice infected with the HcaA-knockout strain.

研究分野：細菌学

キーワード：*Helicobacter cinaedi* autotransporter protein

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter 属菌は、ヒトだけではなく、イヌやネコ、ブタなどの哺乳動物および鳥類などから分離される細菌種である。また、生息部位によってグループ分けされており、胃に生息する菌種は gastric *Helicobacter* と呼ばれ、その代表的な菌種である *H. pylori* はヒトにおいて胃がんの原因となる病原性細菌である。一方、腸肝に生息する菌種は enterohepatic *Helicobacter* と呼ばれ、その中でも、*H. cinaedi* がヒトから高頻度に分離されている。

H. cinaedi は、免疫力が低下した易感染者における菌血症や蜂窩織炎の起因菌として知られており、近年では、極めて重篤な病態である感染性動脈瘤の患者からの分離も報告されている (Matsuo T. et al. BMC Infect. Dis., 2020)。多彩な病態を示す *H. cinaedi* 感染症は、*H. cinaedi* が bacterial translocation により生息部位である腸肝から血管や筋肉組織へ移行することに由来する (Kawamura I. et al., J Infect Chemother., 2014)。*H. cinaedi* の主要な細菌毒素として、宿主細胞に対して膨化やアポトーシスを誘導する、細胞膨化致死因子 (cytolethal distending toxin, CDT) が知られているが、*H. cinaedi* の組織への侵入機構や、CDT 以外の病原因子はほとんど報告されておらず、未知の病原因子を有していることが推測される。以上のことより、*H. cinaedi* はポスト *H. pylori* 時代における、病原性を有する *Helicobacter* 属菌のひとつとして、注視すべき細菌種であるといえる。

これまでに、申請者が所属する国立感染症研究所・林原絵美子らの研究グループでは、*H. cinaedi* のゲノム解析を行い、病原性に関与する因子として *H. cinaedi* autotransporter protein A (HcaA) を見出したが、立体構造や生体内での機能の詳細については明らかになっていない。

2. 研究の目的

そこで本研究は、*H. cinaedi* 感染症における HcaA の役割を解明するため、HcaA の立体構造や機能の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

HcaA の機能を解析するため、protease 活性、培養細胞に対する細胞障害活性および接着活性等の測定に加え、感染細胞を用いた Dual RNA-sequencing による細菌と細胞間の相互作用を解析した。また、生体内における HcaA の役割および菌体上での局在性を解明するため、*H. cinaedi* 菌全体および HcaA の菌体外排出領域の組換えタンパク質あるいは高抗原性が予測されるペプチドを用いてポリクローナル抗体を作製し、免疫電子顕微鏡法やイムノブロット法から HcaA の局在性を明らかにした。さらに、*H. cinaedi* 野生株および HcaA ノックアウト株をマウスに感染させ、生体内における HcaA の影響を評価した。

4. 研究成果

HcaA の局在性を確認するため、HcaA をターゲットとした抗体を用いてイムノブロットおよび免疫蛍光染色による観察を行った。その結果、HcaA は膜画分に局在し、菌体外に分泌されていない可能性が示唆された。また、HcaA および他のヘリコバクター属菌が産生する類似体の立体構造を比較したところ、立体構造自体は類似しているものの、接着に寄与することが予想されるモチーフは *H. cinaedi* にのみ認められることがわかった。加えて、HcaA の生体内における機能を明らかにするため、*H. cinaedi* を感染さ

せた THP-1 細胞のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、HcaA 産生株を感染させた群では非感染群に比べ 116 個の遺伝子の発現が上昇しており、このうち CXCL1 や CXCL8 などの炎症促進に寄与するタンパク質をコードする遺伝子を含む 92 個の遺伝子は HcaA 欠損株を感染させた群でも上昇していたが、NF- κ B 活性化の転写因子である TICAM-1 をコードする遺伝子を含む 24 個の遺伝子については HcaA 欠損株を感染させた群では上昇していなかった。一方、発現が減少した遺伝子については、HcaA 産生株を感染させた群では非感染群と比較して 51 個の遺伝子が認められたが、HcaA 欠損株を感染させた群ではほとんどの遺伝子 (47 遺伝子) で発現減少が認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoki Sae、Mori Shigetaro、Matsui Hidenori、Shibayama Keigo、Kenri Tsuyoshi、Rimbara Emiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization of HcaA, a novel autotransporter protein in <i>Helicobacter cinaedi</i> , and its role in host cell adhesion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msphere.00403-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青木 沙恵、森 茂太郎、松井 英則、柴山 恵吾、見理 剛、林原 絵美子
2. 発表標題 Characterization of novel autotransporter protein HcaA in <i>Helicobacter cinaedi</i>
3. 学会等名 第96回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木 沙恵、森 茂太郎、松井 英則、柴山 恵吾、見理 剛、林原 絵美子
2. 発表標題 <i>Helicobacter cinaedi</i> における新規病原因子の特徴および役割の解明
3. 学会等名 第29回日本ヘリコバクター学会 学術集会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------