

新たな動脈壁平滑筋炎症制御因子の発見による動脈硬化の成因の解明

●白井睦訓 ◆東慶直 ◆三浦公志郎

山口大学医学部医学科生殖・発達・感染医科学講座

〈研究の目的と進め方〉

冠状動脈硬化部の80%以上で平滑筋細胞内で肺炎クラミジア菌の著しい増殖が確認され、周囲に強い炎症性変化をみることから動脈硬化の進展への関与が注目されている。硬化部にもみられる唯一の病原菌であることから平滑筋での炎症制御、長期感染定着と病変形成に関与する遺伝子探索を目的として、我国で初めての病原細菌全ゲノム配列決定となった我々が配列決定した肺炎クラミジア日本株の全1070遺伝子と、ヒト大動脈から作製した全遺伝子を網羅するcDNAライブラリーとの間で感染因子と宿主因子の相互作用をみる2ハイブリッドシステムを用いたマッチングによるスクリーニングを行い、動脈硬化・心筋梗塞発症に関連した相互作用因子を検出する。また、病原性とヒト感染特異性の高い肺炎クラミジアとゲノム構造が15%程度異なる低病原性のネコ・クラミジア（ネコとヒト結膜炎原因菌）を我々が新たに全ゲノム配列決定して、両菌の間で遺伝子機能比較やヒト感染細胞（大動脈平滑筋細胞と他細胞間比較）のヒト3万遺伝子発現プロファイル、クラミジア発現遺伝子パターン（クラミジア全遺伝子アレイを作製して用いた網羅的に比較して動脈硬化に関連する遺伝子を検出し、同遺伝子産物の動脈硬化での役割やその宿主遺伝子制御系を解明する。

〈研究開始時の研究計画〉

平成14年度

1. 肺炎クラミジア菌約200病原遺伝子を含んだライブラリーの作製（分担：白井）；

約200病原遺伝子のORFのライブラリーを作製する（一次ライブラリー）。

2. two-hybridのためのライブラリー（2次ライブラリー）作製（分担：白井）；

作製した一次ライブラリーから、two-hybridのためのベクターMatch Maker3 pGBKT7に各orfをクローニングして200orfのライブラリーを作製する。

3. ヒト大動脈由来の全遺伝子を含むtwo-hybridライブラリーをpGAD7ベクターを用いて作製し、上記クラミジア2次ライブラリーとの間で蛋白間相互作用をスクリーニングし、偽陽性の除外、再現性を確認する（分担：白井）。陽性ペア遺伝子の塩基配列を決定する。（分担：東）

4. 同定された相互作用情報を総合的に解析して病原性の発現系ネットワークを探索する。（分担：東）

〈研究期間の成果〉

これまで肺炎クラミジアが動脈硬化部に高率で検出されている報告は多数あったが、その検出率は様々であり、その試料の取り扱いや技術的な熟練度が常にその検出率に影響するとされてきた。我々も、動脈硬化特に心筋梗塞の基礎的、臨床的原因調査解析を実施しており（2,3,6,9,16,24）、宮崎大学医学部の浅田教授らと共同で冠動脈硬化部の病理切片よりDNAを調製し肺炎クラミジアの存在率および肺炎クラミジアの定量を試みた。懸案の

1つであった狭心症病態の程度と肺炎クラミジアの検出率および感染量には著しい差は見られなかったが、用いた狭心症50人の冠動脈硬化部の平滑筋細胞組織の100%に肺炎クラミジアが検出され、その平滑筋細胞の約20%が感染を受けている像が観察された。その組織切片中のヒトのゲノムDNAと肺炎クラミジアのゲノムDNAのコピー比率は、ヒトを1とした際に肺炎クラミジアは10~1000であり、極めて高い感染が起きていることが明らかとなった。狭心症病態の程度と肺炎クラミジアのゲノムDNA量の差は同様に顕著ではなかったが、肺炎クラミジアの多型による際がある可能性があり、今後の研究課題であることは明らかである。

肺炎クラミジアの冠動脈硬化部における感染状況を調べたところ、軽度、高度狭心症計50人の冠動脈硬化部の平滑筋細胞組織の100%で動脈壁平滑筋細胞に肺炎クラミジアの高密度感染を検出し、局所炎症の惹起に関与していた。肺炎クラミジアの約100遺伝子は真核生物の遺伝子に類似する（10,14,18,19）。これら主要な病原因子と相互作用するヒト大動脈遺伝子を2ハイブリッド法を用いてcDNAライブラリーから検出した。肺炎クラミジアset遺伝子（ヒトクロマチン関連因子ホモログ）やmpg1遺伝子は肺炎クラミジア自身か宿主のクロマチン構造に関連すると考えられ、ある種の細胞外マトリックス蛋白質（大動脈壁平滑筋層で弾性を制御している細胞外マトリックススタンパクファミリー フィブリンのEGF様Ca結合ドメインが相互作用ドメインであった）との相互作用が同定された（クラミジア感染患部で、大動脈弾性繊維の断裂病変形成に関与？）（図1）。この肺炎クラミジアのキネシン/ミオシン類似因子であるKhc蛋白質や封入体膜構成蛋白質であるIncA2をベイトにすると、それぞれミトコンドリア膜に局在する蛋白質ATP6,NADH dehydrogenaseとamine oxidaseが同定された（大動脈平滑筋細胞の増殖や脱分化制御に関与？）。この封入体膜遺伝子をHeLa細胞に導入・発現させたところ、発現タンパク質の局在はミトコンドリアに一致しており同膜電位を変化させて透過性に関与することがわかった。同遺伝子導入細胞はアポトーシスを起こしやすいことを解明した。これら相互作用因子の結合ドメインも解明した。それらの相互作用による宿主細胞変化をさらに解析中である。その他約80の全く新しい肺炎クラミジア菌-宿主間タンパク相互作用を検出している。50種程度の薬物スクリーニングの結果、アスピリンなど数種の薬物が肺炎クラミジア感染排除に働くことも判明した（2,11,12）。

クラミジアのクロマチン関連因子蛋白質SETやMPG1が、マイクロフィブリルやトロポエラスチンと細胞表面の結合に関与する細胞外マトリックス蛋白質と結合する可能性が示された。クラミジア感染が動脈硬化部位のプラーク破綻の原因となっているとする報告もあり、肺炎クラミジアの蛋白質との相互作用による大動脈中膜の弾性繊維の断裂や配列の乱れなどの動脈硬化病変、血管内腔が閉塞との関連が注目される（図1）。

肺炎クラミジア近縁種のクラミジア・フェリスの全ゲ

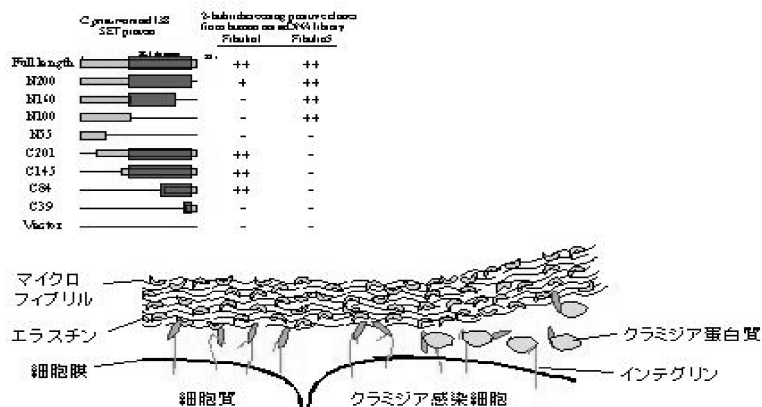


図1 動脈硬化と血管構成細胞外マトリックス構造肺炎クラミジア蛋白質と細胞外マトリックス蛋白質の相互作用

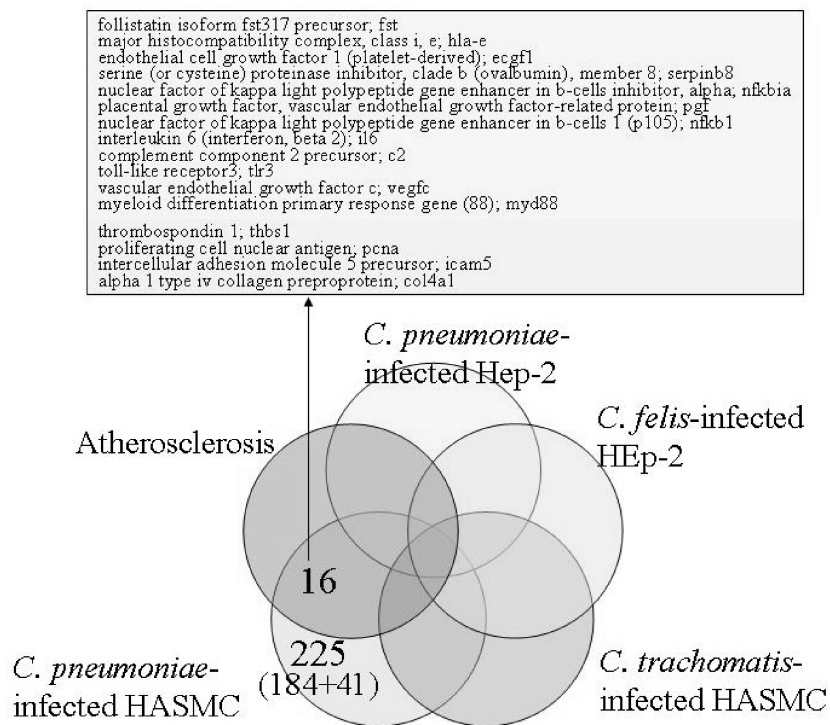


図2 DNA マイクロアレイによる肺炎クラミジア感染大動脈平滑筋細胞にユニークに発現する動脈硬化症関連遺伝子の探索

ノム構造を決定したので両菌遺伝子の比較解析により動脈硬化関連因子探索の手がかりとなることが期待される(1)。ヒト正常大動脈由来平滑筋細胞とHEp2細胞(対照)それぞれに肺炎クラミジア、クラミジア・フェリス菌を感染させて、ヒト3万遺伝子発現をマイクロアレイ解析して動脈硬化・心筋梗塞関連遺伝子データベースと比較することにより、肺炎クラミジア感染大動脈由来平滑筋にユニークな動脈硬化症関連遺伝子16コと新たな動脈硬化関連候補遺伝子合計224個を検出した(図2)

その他、心筋梗塞、動脈硬化関連遺伝子解析や動脈硬化部感染菌クラミジア関連遺伝子機能の解析とその派生的解析成果として多くの成果報告や特許があるが紙面の都合上割愛する(文末のリスト参照)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究者は、日本ではじめて病原細菌の配列決定を行い、心筋梗塞、動脈硬化との関連が注目される肺炎クラミジアの全ゲノムの遺伝子情報を得ている研究グループで、日本株の全遺伝子情報をもつ数少ない研究者である。また、本研究で、肺炎クラミジアに近縁種で人畜共通感染でヒトに結膜炎や肺炎を起こすクラミジア・フェリス菌の全ゲノム配列決定し、世界で初めての人畜共通の細胞内寄生性病原細菌のゲノム構造が判明した(特許出願、論文発表)。クラミジア・フェリスは肺炎クラミジアに最も近似したゲノムを持つにもかかわらず、両者は全く異なる疾患を発症することから、両菌のゲノム比較解析で肺炎クラミジアにユニークな遺伝子群を抽出できた。また、初期培養ヒト大動脈平滑筋細胞をもちいて両細菌の感染細胞でヒト3万遺伝子のDNAマイクロアレイ比較解析データと、心筋梗塞、動脈硬化の関連遺伝子データベースや遺伝子制御マップを利用した情報解析により、動脈硬化と血管感染特異性という難解な問題解決のカギとなる遺伝子群を抽出できたことから、疾病原因を探索する手がかりになることが国内外で期待されている。

国内外でゲノム情報に基づいて遺伝子ネットワークの統合的解析を進める研究は緒についたばかりで、全ゲノム解析と病原因子の解析を同時に進めてきた当該研究者のこれまでの実績を活かした本プロジェクトは世界にユニークかつ信頼度の高いものと一定の評価を得ている。心筋梗塞、動脈硬化と肺炎クラミジアの関連に注目する国内外の研究者には大きな関心になっていることは確かである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

今回の相互作用が実際に心筋梗塞、動脈硬化など疾患を起こしているかの解明は完了できていない難解な課題である。特にヒトの大動脈硬化材料と健康人大動脈材料でのマイクロアレイ比較解析は試みたが材料の取得が難しく、検体数を増やさなければ明確なことが言えない。

今回の検討で動脈平滑筋の感染・炎症制御因子が一定数の遺伝子に絞られ、動脈硬化の進展を統合的に解析する手がかりには十分になった。この解析である程度の動脈硬化の発病機構の理解に繋がり、主要死因を占める動脈硬化症、虚血性心疾患に対し今まで予想されなかった新たな治療・予防法が開発される科学実験的基礎になったと考える。

〈今後の課題〉

動脈硬化の成因解明を目的とした病原菌-宿主間遺伝子間相互作用ネットワークの解析は未だ少ないが、今回の相互作用が実際に心筋梗塞、動脈硬化など疾患を起こ

しているかの解明はまだ不十分で、多くの臨床的な検証も必要で、極めて大きな難解な課題でもある。微生物学者の戯言と認識している権威も多い。ヘリコバクター・ピロリが消化性潰瘍や胃癌の原因として報告されて後、多くの消化器学者が懐疑的であった長い時代をへて、ノーベル医学賞に値する発見とマジョリティに認定されるまでには大きな困難があったように、心筋梗塞、動脈硬化と高率に同硬化部に感染する肺炎クラミジアの関連をゲノム・遺伝子解析を通じて完全に証明する道のりは長いと感じている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Shirai M (他15名,最終16番目) Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydia felis* DNA Research 2006 in press.

2. Shirai M (他9名, 10番目) Serotonin and melatonin, neurohormones for homeostasis, as novel inhibitors of infectious by the intracellular parasite chlamydia. *J. Antimicrob. Chem.* 56,861-8,2005

3. Shirai M (他16名, 13番目) Beneficial effect of preinfarction angina on in-hospital outcome is preserved in elderly patients undergoing coronary intervention for anterior acute myocardial infarction. *Circulation J.* 69:630-5, 2005.

4. Shirai M (他17名, 14番目) Effects of glucose abnormalities on in-hospital outcome after coronary intervention for acute myocardial infarction. *Circulation J.* 69:375-9, 2005.

5. Shirai M (他8名, 5番目) Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* 279:38701-9, 2004.

6. Shirai M (他14名, 14番目) The white blood cell count is an independent predictor of no-reflow and mortality following acute myocardial infarction in the coronary interventional era. *Ann Med.* 36:153-60, 2004..

7. Shirai M (他13名, 13番目) Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of H. pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *British J. Hematol.* 124,91-6, 2004.

8. Shirai M (他9名, 7番目) Inhibitory Actions of Several Natural Products on Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Hsp60 from *Chlamydia pneumoniae* J138. *J Agric Food Chem.* 52: 6326-9, 2004

9. Shirai M (他16名, 13番目) Effect of preinfection angina pectoris on infarct size and in-hospital mortality after coronary intervention for acute myocardial infarction. *American J. Cardiol.* 92:840-843, 2003.

10. Shirai M (他3名, 4番目) In silico inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae. *DNA Research*, 10 : 9-17, 2003.

11. Shirai M (他10名,11番目) Aspirin Inhibits Chlamydia pneumoniae-Induced NF- κ B Activation, COX-2 Expression and PGE2 Synthesis, and Attenuates Chlamydial Growth. *J. Med. Microbiol.* 52 : 1-7, 2003
12. Shirai M (他5名,4番目) Effects of antiasthma drugs on the growth of Chlamydia pneumoniae in HEp-2 cells. *J. Infect. Chemother.* 9. 160-4, 2003.
13. Shirai M (他7名,8番目). A Change in PBP1 Is Involved in Amoxicillin Resistance of Clinical Isolates of Helicobacter pylori. *J. Antimicrobial Chemother.* 50 : 849-856, 2002
14. Shirai M (他10名,9番目) Cloning and characterization of adenylate kinase from Chlamydia pneumoniae. *J. Biol. Chem* 276 : 13490-13498, 2001.
15. Shirai M (他3名,1番目) Impaired development of HIV-1 gp160-specific CD8+ cytotoxic T cells by a delayed switch from Th1 to Th2 cytokine phenotype in mice with Helicobacter pylori infection. *Euro. J. Immunol.* 31 : 516-526, 2001.
16. Shirai M (他3名,2番目) Analysis of serological response to Chlamydia pneumoniae in patients with ischemic heart disease by recombinant MOMP-ELISA. *J. Infect. Chemotherapy* 7 : 180-185, 2001
17. Shirai M (他3名,4番目) Allelic exchange mutagenesis of rpoN encoding RNA-polymerase σ 54 subunit in Helicobacter pylori. *J. Infect. Chemotherapy* 7 : 148-155, 2001
18. Shirai, M. (他7名,1番目) Comparison of whole genome sequences of Chlamydia pneumoniae J138 from Japan and CWL029 from USA. *Nucleic Acids Research*, 28: 2311-2314, 2000.
19. Shirai, M. (他16名,1番目) Comparison of outer membrane protein genes omp and pmp in the whole genome sequences of Chlamydia pneumoniae isolates from Japan and US. *J. Infect. Diseases*, 181: S524-S527, 2000.
20. Kersulyte D, A. K. Mukhopadhyay, M. Shirai, T. Nakazawa, D. E. Berg (他4名,3番目) Functional organization and insertion specificity of IS607, a chimeric element of Helicobacter pylori. *J. Bacteriol.*, 182:5300-8, 2000.
21. Akada, J.K., M. Shirai, H. Takeuchi, M., Tsuda, T. Nakazawa (他4名,2番目) Identification of the urease operon in Helicobacter pylori and its control by mRNA decay in response to pH. *Molecular Microbiology*, 36:1071-1084, 2000.
22. Shirai, M., J.K. Akada (他3名,1番目) Accumulation of polyphosphate granules in H. pylori cells under anaerobic conditions. *J. Med. Microbiol.*, 49: 1-7, 2000 .
23. Kersulyte, D., A.K. Mukhopadhyay, B. Velapatino, M. Shirai (他27名,18番目) Differences in genotypes of Helicobacter pylori from different human populations. *J. Bacteriol.*, 182: 3210-3218, 2000.
24. Ouchi, K., F. Banyo, S. Kudo, M. Shirai (他4名,4番目) Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic and non-atherosclerotic tissue. *J. Infect. Diseases*, 181: S441-S443, 2000.
25. Shirai M (他6名,4番目) A possible novel src-related tyrosine kinase in cancer cells of LEC rats that develop hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology*. 32,92-9, 2000.
26. Yoshimatsu, T., M. Shirai. (他3名,2番目) Transmission of Helicobacter pylori from Challenged to Non-challenged Nude Mice Kept in a Single Cage. *Digest Dis. Science*, 45:1747-53, 2000
- 【関連する特許】
 発明者 白井睦訓 (他1名,1番目) 権利者 山口大学
 出願番号: 2005-125020、出願: 2005年4月22日
 「細胞内寄生性微生物に対し新規抑制効果を有するアポトーシス誘導剤。」
- 発明者 白井睦訓 (他1名,1番目) 権利者 山口大学
 出願番号: 2005-104669、出願: 2005年3月31日
 「クラミジア属細菌の抑制に効果のあるトリプトファン代謝中間産物。」
- 発明者 白井睦訓 (他2名,1番目) 権利者 山口大学
 出願番号: 2005-099818、出願: 2005年3月30日
 「肺炎クラミジアの IncA2蛋白質、クラミジアの Inc蛋白質群およびその利用法。」
- 発明者 白井睦訓 (他1名,1番目) 権利者 山口大学
 出願番号: 2005-001953、出願: 2005年1月6日
 「Pax5 欠損プロB細胞への遺伝子導入を利用した新規免疫細胞制御・分化因子遺伝子探索法と、それを利用した Rac1 および ERK5 の機能解明と免疫治療への利用。」
- 発明者 白井睦訓 (他4名,1番目) 権利者 山口大学
 出願番号: 2004-183135、出願: 2004年5月25日
 「新規核酸、及び当該核酸を用いたスクリーニング方法。」
- 発明者 白井睦訓 (他4名,1番目) 権利者 山口TLO
 出願番号: 2002-292548、出願: 2002年10月4日
 「ヘリコバクター・ピロリ菌臨床分離株の β -ラクタム系抗生物質アモキシシリン耐性に関与している pbp1 遺伝子の塩基配列とそれに基づいたアミノ酸配列の変異とそその変異を有するヘリコバクター・ピロリ変異株およびそれらの診断と治療法開発への利用法。」
- 発明者 白井睦訓 (他3名,1番目) 権利者 山口TLO
 出願番号: 2002-121606、出願: 2002年4月24日
 「肺炎クラミジアのDNAマイクロアレイ、肺炎クラミジア感染の有無を検査する方法および薬物のスクリーニング方法。」
- 【特許公開】
 特許公開2003-310257 発明者 白井睦訓 (他3名,1番目)

権利者 山口TLO「肺炎クラミジアのDNAマイクロアレイ、肺炎クラミジア感染の有無を検査する方法および薬物のクリーニング方法」

特許公開2001-289857 発明者 白井睦訓（他2名、1番目）
権利者 （株）フジレビオ「自己免疫性疾患の診断方法」

特許公開2001-289856 発明者 白井睦訓（他2名、1番目）
権利者 （株）フジレビオ「クラミジアニューモニエの測定方法及び測定試薬」

特許公開2001-288114 発明者 白井睦訓（他2名、1番目）
権利者 （株）フジレビオ自己免疫性疾患治療剤

【国際特許】

発明者 Shirai M（他4名、5番目）、権利者 米国国立衛生研究所、米国特許番号: US 6,214,347 B1, 取得年: 2001年4月10日、
Mutidetinant peptides that elicit helper T- lymphocyte, cytotoxic T lymphocyte, and neutralizing antibodies response against HIV-1.