

令和元年6月19日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11439

研究課題名(和文) 誤嚥性肺炎における肺組織傷害・重症化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of lung tissue injury in aspiration pneumonia

研究代表者

土門 久哲 (DOMON, Hisanori)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00594350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では肺炎による年間死亡者数が約12万であり、特に高齢者で増加し続けている。本疾患が重症化すると、敗血症などの侵襲性感染症を合併することが報告されている。本研究ではそのメカニズムとして、肺炎球菌が好中球からプロテアーゼを漏出させ、自己プロテアーゼが肺組織の自然免疫受容体およびサイトカインを分解して免疫機構を崩壊させることで、菌が血中に侵入するという肺炎重症化カスケードモデルを明らかにした。肺炎重症化機構を細菌と宿主の両面から分子レベルで解析し、長期的な治療・予防法研究の基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、病原細菌(肺炎球菌)が感染した宿主よりプロテアーゼを誘導して、間接的に肺の免疫機構を崩壊させることを明らかにした点において、学術的意義が高い。肺炎球菌は近年薬剤耐性化の進行が問題になっているが、プロテアーゼ阻害剤の開発により薬剤耐性の有無に関わらず肺炎治療に結びつけることが可能であることも示唆された。肺炎を軽症化・治療補助する薬剤開発の提案ができれば、数千億円の波及効果が推計されており、社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Bacterial pneumonia constitutes a leading cause of morbidity and mortality worldwide, being responsible for approximately 3.5 million deaths annually. In this study, we showed that pneumococcal autolysis induces pneumolysin release, which exerts cytotoxicity against infiltrating neutrophils. However, we also observed that pneumolysin exhibited less cytotoxicity against alveolar epithelial cells and macrophages. Therefore, *S. pneumoniae* exploits NE leakage from degraded neutrophils to promote alveolar epithelial cell injury. We also demonstrated that NE cleaves Toll-like receptors and inflammatory cytokines. Our work indicates that NE induced by *S. pneumoniae* subverts the innate immune response and that inhibition of this enzyme may constitute a novel therapeutic option for the treatment of pneumococcal pneumonia.

研究分野：口腔細菌学, 免疫学

キーワード：肺炎球菌 ニューモリシン 好中球エラスターゼ 肺炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国の肺炎による死亡数は年間約 12 万であり、特に高齢者で増加し続けている。超高齢社会を迎える今日において、高齢者に好発する呼吸器感染症を予防することは喫緊の課題と云える。高齢者における肺炎の発症原因のうち、約 9 割に誤嚥の関与があるとの報告があり、健康寿命の延伸や QOL の向上のため、歯科領域においても肺炎の基礎的研究は重要な課題である。

近年、好中球は内在するエラスターゼを過剰放出することによりヒト組織を傷害する可能性が示唆されている。一般的に、好中球エラスターゼは細菌など異物の分解、消化に関与する。一方、肺炎球菌性肺炎においては、肺組織に過剰な好中球の浸潤とエラスターゼ活性の上昇がみられるにもかかわらず、肺炎球菌の排除が十分にされないまま重症化し、肺傷害が引き起こされることが知られている。これらの知見から、肺炎球菌は好中球エラスターゼによる排除から回避し、そのエラスターゼを悪用することで肺組織の破壊と感染拡大を巧妙に達成している可能性を推察した。

2. 研究の目的

研究代表者は、肺炎球菌が膜孔形成毒素であるニューモリシンを用いて好中球の細胞膜を溶解し、貪食を回避するとともに、強制的にエラスターゼを漏出させることで肺傷害を惹起する」という仮説を立てた。本研究では、肺炎重症化機構を細菌と宿主の両面から分子レベルで解析し、長期的な治療・予防法研究の足掛かりとする。

3. 研究の方法

3ヶ年計画の当初の2年間は、自己融解酵素およびニューモリシン組換えタンパク質ならびにその遺伝子欠失株を作製し、それらの宿主細胞に対する作用を好中球エラスターゼ漏出誘導能に焦点を当てて解析する。次に、好中球エラスターゼが肺の防御機構に関わる細胞群であるマクロファージと肺上皮細胞に及ぼす細胞毒性について免疫学的、分子生物学的に解析を行う。最終年度は1~2年目の *in vitro* 解析を基盤として、自己融解酵素およびニューモリシン気管支投与マウスを作製・解析することにより、肺炎球菌の好中球エラスターゼ漏出誘導を介した肺傷害および肺炎拡大メカニズムを明らかとする。

4. 研究成果

(1) 肺炎球菌の自己融解酵素および菌体内毒素ニューモリシン遺伝子組換え体の作製

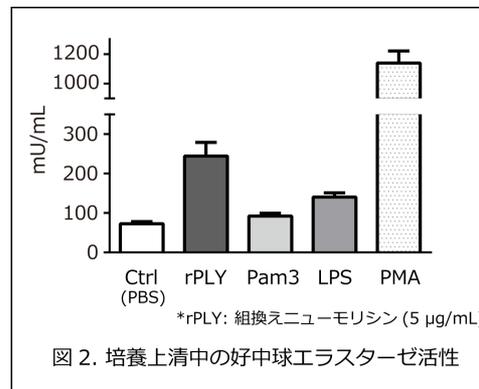
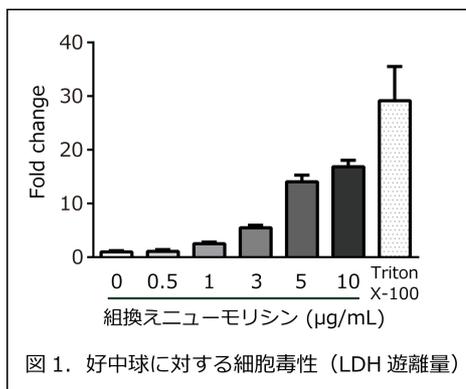
新潟大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認（承認番号：SD00112, SD00114, SD00124）のもと、大腸菌発現系を用いて、自己融解酵素およびニューモリシンの遺伝子組換え体を作製した。

(2) ニューモリシン遺伝子欠失株の作製

ニューモリシン遺伝子の一部を PCR で増幅し、遺伝子欠失用ベクターにクローニングした。これを肺炎球菌 D39 株に導入し、ニューモリシン遺伝子欠失株を作製した。

(3) 好中球に対するニューモリシンの細胞毒性

新潟大学倫理委員会の承認のもと（承認番号:25-R9-07-13）、ヒト由来の好中球を単離した。次に、ニューモリシンを培地に添加し6時間後の作用を解析した。その結果、ニューモリシンは好中球の細胞膜に結合して破壊し、細胞死を誘導すること（図1）、細胞死した好中球からエラスターゼが過剰に漏出すること（図2）が明らかとなった。さらに、野生型肺炎球菌の培養上清は好中球に対し細胞死を誘導することが明らかとなった。一方、ニューモリシン遺伝子欠失株より採取した培養上清は、ほとんど細胞死を誘導しなかった。これらの結果から、肺炎球菌は、主にニューモリシンの作用により好中球を細胞死させ、エラスターゼを漏出させることを明らかにした。



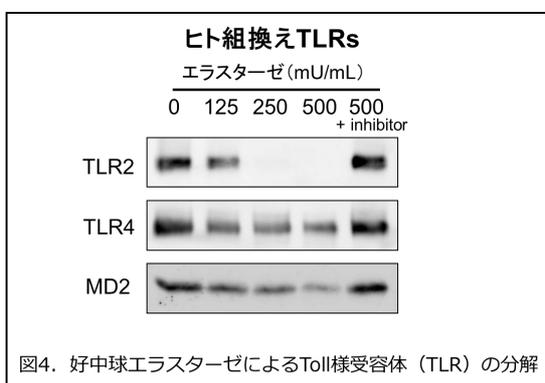
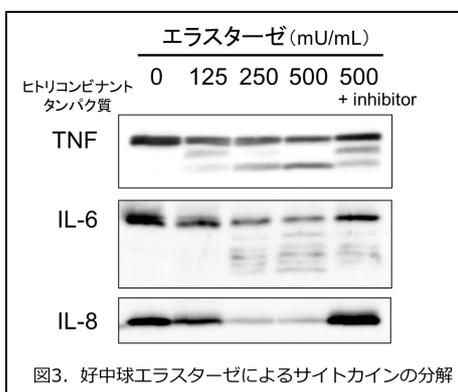
(3) 宿主細胞に対するニューモリシンもしくは好中球エラスターゼの細胞毒性

肺胞上皮細胞 A549 およびマウスマクロファージ RAW264.7 培養培地にニューモリシンを添加したが、細胞毒性はほとんど観察されなかった。次に、両細胞培養培地に好中球エラスターゼを添加したところ、いずれの細胞も傷害を受け、ウェルプレートから剥離した。一方で、肺炎球菌の自己溶菌酵素は、好中球を含め、いずれの細胞にも毒性を示さなかった。したがって、肺胞内におけるニューモリシンの主なターゲットは好中球であり、そこから漏出するエラスターゼを用いて肺を傷害していることが明らかとなった。

(4) 宿主の自然免疫応答に対する好中球エラスターゼの作用解析

好中球エラスターゼは、強力なセリンプロテアーゼであり、肺胞上皮細胞を傷害するだけでなく、様々な宿主由来タンパク質を分解する可能性がある。次に、エラスターゼが宿主の自然免疫応答に及ぼす影響について解析を行った。マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞に対し、熱処理した肺炎球菌死菌もしくは大腸菌由来 LPS とともに好中球エラスターゼを培地に添加した。一定時間後の炎症性サイトカイン遺伝子転写量を real-time PCR 法にて、培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法にて定量した。その結果、エラスターゼは IL-6、IL-8、および TNF の炎症性サイトカイン遺伝子の転写を有意に抑制した。同様に、培養上清中の各サイトカイン検出量を有意に低下させた。さらに、好中球エラスターゼによる炎症性サイトカインの分解の有無を、Western blot 法にて調べたところ、いずれのサイトカインに対しても直接分解作用があり（図3）、マクロファージ貪食能をも低下させることが明らかとなった。

次に、好中球エラスターゼ添加群における NF- κ B の活性化について免疫蛍光染色法で解析したところ、同分子の核内への移行が有意に低下していた。このメカニズムとして、好中球エラスターゼが宿主の Toll 様受容体を分解することが明らかとなった（図4）。



(5) 肺炎マウスモデルにおける好中球エラスターゼの作用解析

まず、肺炎球菌 D39 株をマウスの気管支に感染させ、肺炎モデルを作製した。感染 18 時間後に肺胞洗浄液を採取し、洗浄液中のエラスターゼ活性について解析したところ、有意な上昇が認められた。このような所見は、ヒトの重症肺炎においても報告されている。そこで、エラスターゼインヒビターをマウスに投与し、その後同様に肺炎球菌を感染させたところ、肺胞洗浄液中の肺炎球菌生菌数の低下、エラスターゼ活性の低下、肺胞中におけるサイトカイン濃度の上昇、および肺炎球菌の血液への侵入抑制等の作用が認められた。したがって、*in vivo* においても肺炎球菌はエラスターゼを好中球から漏出させることで、宿主の自然免疫応答を攪乱し、肺炎を重症化させていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

以下全て査読あり。

1. Hiyoshi T, Domon H, Maekawa T, Nagai K, Tamura H, Takahashi N, Yonezawa D, Miyoshi T, Yoshida A, Tabeta K, Terao Y.: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces detachment and death of human gingival epithelial cells and fibroblasts via elastase release following leukotoxin-dependent neutrophil lysis. *Microbiol Immunol*, in press. doi: 10.1111/1348-0421.12672.
2. Tamura H, Maekawa T, Domon H, Hiyoshi T, Yonezawa D, Nagai K, Ochiai A, Taniguchi M, Tabeta K, Maeda T, Terao Y.: Peptides from rice endosperm protein restrain periodontal bone loss in mouse model of periodontitis. *Arch Oral Biol*. 98: 132-139, 2019. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.11.021.
3. Nagai K, Domon H, Maekawa T, Hiyoshi T, Tamura H, Yonezawa D, Habuka R, Saitoh A, Terao Y.: Immunization with pneumococcal elongation factor Tu enhances serotype-independent protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Vaccine*. 37(1): 160-168, 2019. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.11.015.

4. Nagai K, Kimura O, Domon H, Maekawa T, Yonezawa D, Terao Y.: Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* clinical isolates from children with acute otitis media in Japan from 2014 to 2017. *J Infect Chemother*. 25(3): 229-232, 2019. doi: 10.1016/j.jiac.2018.08.018.
5. Kurosawa M, Oda M, Domon H, Isono T, Nakamura Y, Saitoh I, Hayasaki H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y.: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor promotes calcium ion uptake in RAW264.7 cells. *Microbiol Immunol*. 62(10): 617-623, 2018. doi: 10.1111/1348-0421.12647.
6. Domon H, Maekawa T, Yonezawa D, Nagai K, Oda M, Yanagihara K, Terao Y.: Mechanism of Macrolide-Induced Inhibition of Pneumolysin Release Involves Impairment of Autolysin Release in Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 62(11). pii: e00161-18, 2018. doi: 10.1128/AAC.00161-18.
7. Domon H, Nagai K, Maekawa T, Oda M, Yonezawa D, Takeda W, Hiyoshi T, Tamura H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y.: Neutrophil Elastase Subverts the Immune Response by Cleaving Toll-Like Receptors and Cytokines in Pneumococcal Pneumonia. *Front Immunol*. 9: 732, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00732.
8. Sakaue Y, Takenaka S, Ohsumi T, Domon H, Terao Y, Noiri Y.: The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: an in vitro study. *BMC Oral Health*. 18(1): 52, 2018. doi: 10.1186/s12903-018-0517-3.
9. Oda M, Kurosawa M, Yamamoto H, Domon H, Kimura T, Isono T, Maekawa T, Hayashi N, Yamada N, Furue Y, Kai D, Terao Y.: Sulfated vizantin induces formation of macrophage extracellular traps. *Microbiol Immunol*. 62(5): 310-316, 2018. doi: 10.1111/1348-0421.12589.
10. Nagai K, Domon H, Maekawa T, Oda M, Hiyoshi T, Tamura H, Yonezawa D, Arai Y, Yokoji M, Tabeta K, Habuka R, Saitoh A, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y.: Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. *Cell Immunol*. 325: 14-22, 2018. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.006.
11. Kurosawa M, Oda M, Domon H, Isono T, Nakamura Y, Saitoh I, Hayasaki H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y.: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor promotes bacterial adhesion and invasion in pharyngeal epithelial cells without serum via PI3K/Akt signaling pathway. *Microbes Infect*. 20(1): 9-18, 2018. doi: 10.1016/j.micinf.2017.09.007.
12. Nagai K, Domon H, Oda M, Shirai T, Ohsumi T, Terao Y, Arai Y.: Antimicrobial activity of ethylene-vinyl acetate containing bioactive filler against oral bacteria. *Dent Mater J*. 36(6): 784-790, 2017. doi: 10.4012/dmj.2016-321.
13. Oda M, Domon H, Kurosawa M, Isono T, Maekawa T, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y.: *Streptococcus pyogenes* Phospholipase A2 Induces the Expression of Adhesion Molecules on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Aorta of Mice. *Front Cell Infect Microbiol*. 7: 300, 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00300.
14. Murakami T, Saitoh I, Sato M, Inada E, Soda M, Oda M, Domon H, Iwase Y, Sawami T, Matsueda K, Terao Y, Ohshima H, Noguchi H, Hayasaki H.: Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1 promoter-driven selection markers. *Arch Oral Biol*. 81: 110-120, 2017. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.033.
15. Maekawa T, Kulwattanaporn P, Hosur K, Domon H, Oda M, Terao Y, Maeda T, Hajishengallis G.: Differential Expression and Roles of Secreted Frizzled-Related Protein 5 and the Wingless Homolog Wnt5a in Periodontitis. *J Dent Res*. 96(5): 571-577, 2017. doi: 10.1177/0022034516687248.
16. Domon H, Oda M, Maekawa T, Nagai K, Takeda W, Terao Y.: *Streptococcus pneumoniae* disrupts pulmonary immune defence via elastase release following pneumolysin-dependent neutrophil lysis. *Sci Rep*. 6: 38013, 2016. doi: 10.1038/srep38013.
17. Takenaka S, Oda M, Domon H, Ohsumi T, Suzuki Y, Ohshima H, Yamamoto H, Terao Y, Noiri Y.: Vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes *Streptococcus mutans* biofilm to detach by altering its internal architecture. *Biochem Biophys Res Commun*. 480(2): 173-179, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.021.
18. Yamamoto H, Oda M, Kanno M, Tamashiro S, Tamura I, Yoneda T, Yamasaki N, Domon H, Nakano M, Takahashi H, Terao Y, Kasai Y, Imagawa H.: Chemical Hybridization of Vizantin and Lipid A to Generate a Novel LPS Antagonist. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 64(3): 246-57, 2016. doi: 10.1248/cpb.c15-00828.

[学会発表](計 14 件)

1. 土門久哲, 國友栄治, 寺尾 豊: 口腔および上気道の病原細菌に対するヒノキチオールの抗菌作用解析, 第 60 回歯科基礎医学学会学術大会, 2018 年.
2. 土門久哲, 永井康介, 前川知樹, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊: 肺炎球菌性肺炎の重症化メカニズムの解析 - 新規肺炎制御法への展開 -, 第 6 回 五大学・口腔微生物研究会,

2018年.

3. 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 柳原克紀, 木村 征, 寺尾 豊: 肺炎球菌とマクロライド:新潟市内の耐性菌分離率と病原性抑制作用の解析, 第 57 回新潟化学療法研究会学術講演会, 2018年.
4. 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 柳原克紀, 木村 征, 寺尾 豊: マクロライド耐性肺炎球菌に対するマクロライド系抗菌薬の作用解析 第25回マクロライド新作用研究会 2018.
5. 土門久哲, 寺尾豊: 肺炎球菌性肺炎の重症化カスケード—細菌由来病原因子と好中球由来防御因子のせめぎ合い—, 第91回日本細菌学会総会, 2018年.
6. 土門久哲, 國友栄治, 寺尾 豊: 口腔領域の病原細菌に対するヒノキチオールの抗菌作用解析, 第91回日本細菌学会総会, 2018年.
7. 土門久哲: 自己溶菌を起点とする肺炎球菌の感染メカニズム, 第70回日本細菌学会関西支部総会, 2017年.
8. 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 寺尾 豊: ヒト好中球を利用する肺炎球菌の感染メカニズム解析, 第1回 オーラルサイエンス研究会, 2017年.
9. 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊: 肺炎の重症化に伴い誘導される宿主由来エラストラーゼの病原性解析, 第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017年.
10. 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 寺尾 豊: 肺炎球菌感染時における好中球エラストラーゼの *in vitro* 機能解析, 第90回日本細菌学会総会, 2017年.
11. 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 寺尾 豊: 肺炎球菌が誘導する宿主由来エラストラーゼによる自然免疫抑制メカニズム, 第49回レンサ球菌研究会, 2017年.
12. 土門久哲, 小田真隆, 川端重忠, 寺尾 豊: 肺炎球菌性肺炎の重症化メカニズムの分子解析, 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 2016年.
13. 寺尾 豊, 土門久哲: *Streptococcus pneumoniae* の肺組織障害におけるカスケード機構の解析, 第48回レンサ球菌研究会, 2016年.
14. 土門久哲, 小田真隆, 寺尾 豊: 肺炎球菌の自己融解に起点を発する肺障害のカスケード機構, 第55回新潟化学療法研究会, 2016年.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.dent.niigata-u.ac.jp/microbio/microbio.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 寺尾 豊

ローマ字氏名: (TERAO, yutaka)

所属研究機関名: 新潟大学

部局名: 医歯学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50397717

研究分担者氏名: 小田 真隆

ローマ字氏名: (ODA, masataka)

所属研究機関名: 京都薬科大学

部局名: 薬学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00412403