

令和元年6月19日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19619

研究課題名(和文)肺炎マイコプラズマによる肺外疾患発症に関わる肺外移行メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the translocation mechanism of *M. pneumoniae* across the human bronchial epithelial barrier.

研究代表者

山本 武司 (Yamamoto, Takeshi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20632566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎マイコプラズマ感染症は約25%の頻度で肺外疾患と呼ばれる多彩な合併症を伴うことが知られており、この肺外疾患の発症には肺炎マイコプラズマの肺外責任部位への移行が関与すると考えられている。本研究ではその詳細なメカニズムについての検討を行い、結果として、肺炎マイコプラズマが上皮細胞のバリア機構を破壊せず、細胞間隙あるいは細胞内を通過することで肺外に移行することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎マイコプラズマの感染経路は主に経気道飛沫感染であるが、呼吸器症状の有無によらず、肺外疾患においても同様に呼吸器が本菌の主要な侵入部位となると考えられている。そのため肺外疾患においても、気道上皮のバリア機構は肺炎マイコプラズマの最初の侵入障壁として機能しており、その通過メカニズムの解明は肺炎マイコプラズマによる肺外疾患の制御基盤の構築に不可欠であるといえる。本研究の成果はその一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mycoplasma pneumoniae infection is known to be accompanied by a variety of complications called extrapulmonary manifestations with a frequency of about 25%, and the translocation of *M. pneumoniae* to the extrapulmonary site is thought to be partly involved in the development of these extrapulmonary diseases. In this study, we investigated the translocation mechanism of *M. pneumoniae* across the human bronchial epithelial barrier, and found *M. pneumoniae* translocates through paracellular or transcellular route without affecting epithelial barrier integrity.

研究分野：細菌学

キーワード：肺炎マイコプラズマ

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

### 1. 研究開始当初の背景

肺炎マイコプラズマは呼吸器感染症の主要な病原体の一つとして知られる細菌である。本菌感染に伴うマイコプラズマ肺炎は、古典的な細菌性肺炎とは異なり、一部の重症化例を除くと経過は良好であり、入院を必要としない症例が多数みられる。しかしながら、マイコプラズマ肺炎はその特徴として、脳炎、肝炎、心筋炎、関節炎といった多彩な合併症、いわゆる肺外疾患を伴うことが知られており、これらは入院加療を必要とする重症例が比較的多いとされている。

現在、肺外疾患は、「宿主成分と交差抗原性を示す肺炎マイコプラズマ由来の成分によって感作された T 細胞や B 細胞を中心とした全身性の免疫反応」と、「肺炎マイコプラズマの責任部位への移行と局所での病原性発現」が、単独あるいは複合的に作用して発症すると考えられている。実際、肺外疾患患者では、肺炎マイコプラズマの菌体成分と交差反応性を示す自己抗体の産生を認め、血液、脳脊髄液、心嚢液等から肺炎マイコプラズマが検出されており、本菌による「全身性の免疫反応」と本菌の「肺外移行」が肺外疾患において重要な因子であることを窺い知ることができる。

肺外疾患における肺炎マイコプラズマの感染経路は経気道感染であるとされている。従って、「全身性の免疫反応」は、その詳細は不明であるが、呼吸器内にて本菌を貪食したマクロファージが T 細胞に抗原提示をすることで始まると予想される。一方、「肺外移行」は、傷害された呼吸器上皮細胞の間隙より本菌が肺外局所に移行するものであると考えられているが、より傷害の程度の高い肺炎患者よりも肺炎症状を呈していない場合の方が肺外疾患の罹患頻度が高いことから、「肺外移行」には本菌の病原性機構(細胞内侵入性等)の積極的な関与が示唆される。

### 2. 研究の目的

肺外移行には上皮バリアの突破が必要だが、これには tight-junction (TJ) を破壊し、細胞間隙を通過する「Paracellular 経路」、上皮細胞の細胞質に侵入し、細胞内を通過する「Transcellular 経路」ならびに貪食細胞に取り込まれた状態でバリアを通過する「Trojan-horse 経路」の3経路のいずれかが関与することが予想される。そこで本研究では肺炎マイコプラズマ感染に伴う肺外疾患の発症機構の解明と予防・治療標的候補の探索を最終的な目的として、肺外疾患に関わる本菌の「肺外移行」に重要な上皮バリア通貨メカニズムの解析を行った。

### 3. 研究の方法

ヒトの気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞を用いてトランスウェル上に細胞単層を形成させ、単層の通過の程度を CFU アッセイにて解析した。また、単層の完全性を電気抵抗値の変化ならびに FITC-デキストリンの通過を指標に評価した。さらに感染に伴う細胞の損傷およびそのメカニズムをクリスタルバイオレット法ならびに LDH リリースアッセイを用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)肺炎マイコプラズマは細胞単層を破壊しない

まず、細胞単層の通過における「Paracellular 経路」の関与を評価するため、肺炎マイコプラズマ感染に伴う細胞単層の電気抵抗値の変化ならびに FITC-デキストリンの通過の程度を調べた。その結果、感染 24 時間以内では細胞単層の電気抵抗値に変化はなく、FITC-デキストリンの明らかな通過の程度の上昇は見られなかった。このことから「Paracellular 経路」は関与しないものと考えられたが、他の研究グループより、肺炎マイコプラズマは細胞単層の破壊を伴わずに組織深部に侵入することが報告されたことから、そのメカニズムについてより詳細な解析を進めることにした。

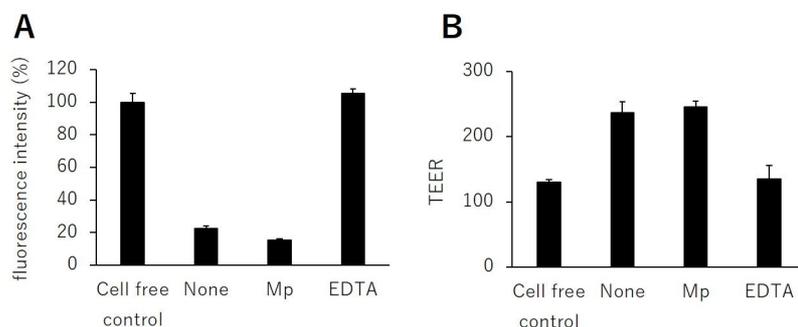


図1 肺炎マイコプラズマは細胞単層を破壊しない

A. 細胞単層の FITC-デキストリン透過性を蛍光プレートリーダーにて解析した。EDTA 処理では単層なし対照 (Cell free control) と同程度の FITC-デキストリンの通過が観察されたが、肺炎マイコプラズマ感染 (Mp) では顕著な FITC-デキストリン通過の変化が観察されなかった。  
B. 経上皮電気抵抗 (TEER) の変化を抵抗値測定システム (Millicell) で解析した。肺炎マイ

コプラズマ感染は A の結果同様電気抵抗値に影響を及ぼさなかった。

### (2)肺炎マイコプラズマは過酸化水素による細胞の剥離を抑制する

肺炎マイコプラズマの主たる細胞傷害性因子としては過酸化水素が知られている。そこで過酸化水素刺激に伴う細胞の剥離の程度を調べた結果、過酸化水素はおおよそ 100 $\mu$ M 以上の濃度で 6 時間以上刺激した際に、細胞の剥離を惹き起こすことがわかった。続いてこのような過酸化水素誘導性の細胞の剥離が肺炎マイコプラズマ感染においても認められるか調べたところ、肺炎マイコプラズマは数百  $\mu$ M 程度の過酸化水素を産生するにもかかわらず、BEAS-2B 細胞をほとんど剥離させないことが分かった。そこで、肺炎マイコプラズマを事前に感染させておくことで過酸化水素誘導性の細胞の剥離が低下するか調べた結果、肺炎マイコプラズマ感染細胞では細胞の剥離の顕著な低下が認められた。このことから肺炎マイコプラズマは過酸化水素による細胞の剥離を抑制する性質を備えていることが明らかとなった。

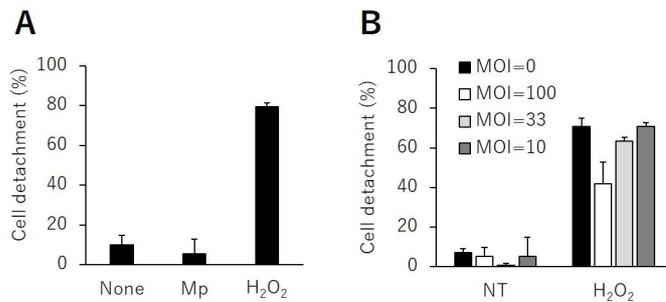


図 2 肺炎マイコプラズマは過酸化水素による細胞の剥離を低下させる

A. 肺炎マイコプラズマ感染および過酸化水素刺激後の細胞の剥離の程度をクリスタルバイオレット法にて解析した。肺炎マイコプラズマ感染は過酸化水素刺激とは異なり細胞をほとんど剥離させなかった。

B. 肺炎マイコプラズマを事前に感染させておくことで、過酸化水素誘導性の細胞の剥離は低下した。

### (3)肺炎マイコプラズマは過酸化水素誘導性の細胞死を抑制する

続いて肺炎マイコプラズマがどのようにして過酸化水素による細胞の剥離を抑制するのか調べるため、まず過酸化水素による細胞剥離のメカニズムの解析を行った。その結果、過酸化水素誘導性の細胞の剥離は parthanatos の阻害薬である DPQ 処理によって顕著に低下することがわかった。この parthanatos はネクローシス様の細胞死であり、膜透過性の亢進を伴うが、過酸化水素刺激に伴うそれは細胞剥離とほぼ同じタイミングで起きた。さらに肺炎マイコプラズマが過酸化水素誘導性の parthanatos を抑制するか調べた結果、本菌はこの過酸化水素刺激に伴う膜透過性の亢進を抑制することが明らかとなった。

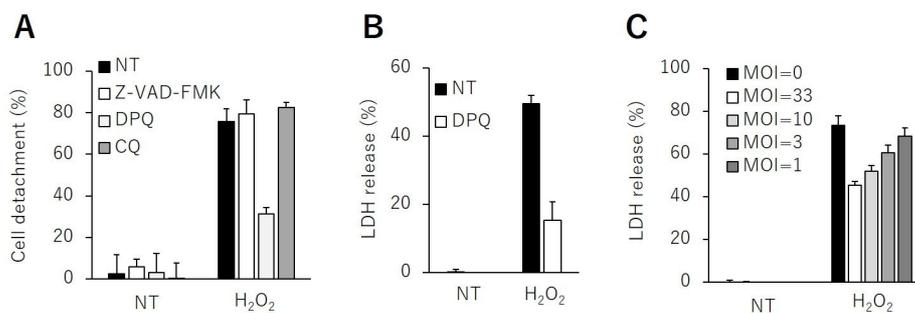


図 3 肺炎マイコプラズマは過酸化水素誘導性の parthanatos を抑制する

A. 過酸化水素刺激に伴う細胞の剥離が DNA ダメージ依存性の細胞死の阻害薬処理によって抑制されるか解析した。同細胞剥離は parthanatos の阻害薬である DPQ 処理でのみ抑制された。

B. 過酸化水素刺激が parthanatos を誘導するか簡易的に評価するため、刺激後の細胞の膜透過性の亢進を細胞内からの乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出を指標に解析した。過酸化水素刺激は LDH の放出を促し、これは DPQ 処理によって抑制された。

C. 肺炎マイコプラズマを事前に感染させておくことで、過酸化水素誘導性の膜透過性の亢進は DPQ 処理同様抑制された。

以上の結果から、肺炎マイコプラズマは自身の細胞傷害性因子である過酸化水素によって誘導される細胞死を抑制することで、細胞単層の完全性を維持した状態で細胞間隙を通過し、組織深部に侵入する可能性が示唆された。肺炎マイコプラズマは「あし」と呼ばれる特徴的な運動

装置によって、上皮細胞表面のシアル酸に接着し、運動する。そのため、感染細胞・組織の破壊は接着・運動効率の低下をきたし、細胞表面での感染の維持や組織深部への感染巣の拡大に不利益に働く可能性があることから、このような感染細胞の保護機構は本菌の病原性に重要なものであると予想される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Yamamoto T, Kida Y, Kuwano K. Mycoplasma pneumoniae protects infected epithelial cells from hydrogen peroxide-induced cell detachment. Cellular microbiology, e13015, 2019. [査読有り]

DOI: 10.1111/cmi.13015

Yamamoto T, Kida Y, Sakamoto Y, Kuwano K. Mpn491, a secreted nuclease of Mycoplasma pneumoniae, plays a critical role in evading killing by neutrophil extracellular traps. Cellular microbiology, 19(3), 2017. [査読有り]

DOI: 10.1111/cmi.12666

山本武司、木田豊、坂本勇一、桑野剛一. 肺炎マイコプラズマの分泌型ヌクレアーゼは好中球の NETs による殺菌の回避に重要である. 日本マイコプラズマ学会雑誌, 43, 62-63, 2016. [査読無し]

〔学会発表〕(計 4件)

山本武司. Mpn491 を標的としたマイコプラズマ肺炎ワクチンおよび治療薬. 第 30 回インターフェックスジャパン, 2017.

山本武司、木田豊、坂本勇一、桑野剛一. Mycoplasma pneumoniae prevents staurosporine-induced apoptosis in murine macrophage cell line, J774A.1. 第 90 回日本細菌学会総会, 2017.

山本武司、木田豊、坂本勇一、桑野剛一. 肺炎マイコプラズマの分泌型ヌクレアーゼは好中球の NETs による殺菌の回避に重要である. 第 43 回日本マイコプラズマ学会学術集会, 2016.

Yamamoto T, Kida Y, Sakamoto Y, Kuwano K. Mpn491, a secretory nuclease of Mycoplasma pneumoniae is important for escaping NETs-mediated killing of neutrophils. The 13th Korea - Japan International Symposium on Microbiology, 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/micro/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。