

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32728

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10033

研究課題名（和文）肺炎球菌性肺炎の重症化に関わる疾患感受性遺伝子の同定とその機能解析

研究課題名（英文）Identification and characterization of susceptibility gene for severe pneumococcal pneumonia

研究代表者

木村 聡一郎 (Kimura, Soichiro)

湘南医療大学・薬学部医療薬学科・教授

研究者番号：60408870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺炎球菌に対する疾患感受性遺伝子（群）を同定し、その役割・機能を解析した。比較ゲノム解析により責任遺伝子群を同定し、その遺伝子群にはケモカインレセプターであるCXCR2が含まれていた。Cxcr2およびそのリガンドであるCxcl1・Cxcl2の肺における発現量を測定したところ、野生型マウスと比較して肺炎重症型マウスでは発現誘導の遅延が認められた。また肺炎重症型マウスの好中球・マクロファージを解析したところ、遺伝子発現の結果に相関して好中球・マクロファージの肺への動員が遅延していた。感染初期の病原体への応答が遅れることが肺炎の重症化に関わることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎は、主要な死因別の死亡率において悪性新生物、心疾患に次ぐ第3位に位置しており、その死亡者のうち65歳以上の割合は97%にも達する。日本は超高齢化社会に突入しており、更なる肺炎による死亡者数の増加が懸念されることから、肺炎球菌性肺炎による重症化を理解することは喫緊の課題といえる。本研究では肺炎球菌性肺炎の重症化に関わる遺伝因子を特定することができ、それらが肺炎球菌感染の初期応答に不具合を生じることから、結果として肺炎の重症化が進行することがわかった。今後は肺炎球菌性肺炎の重症患者と本疾患因子との相関性を明らかにすることにより、重症化の予防・予測などに役立てられるものと期待している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified a disease susceptibility gene (group) against *Streptococcus pneumoniae* and analyzed its role and function. Comparative genomic analysis identified the susceptible gene group, which included the chemokine receptor CXCR2. The expression of Cxcl1 and Cxcl2 in the lungs was measured. Analysis of neutrophils and macrophages in mice with severe lung inflammation showed delayed recruitment of neutrophils and macrophages to the lungs in correlation with the gene expression results. It was suggested that the delayed response to pathogens in the early stages of infection is related to the severity of pneumonia.

研究分野：感染制御学

キーワード：肺炎球菌 肺炎 疾患感受性遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は、ブドウ球菌と並びヒトに対して病原性の強いグラム陽性球菌であり、市中肺炎の原因菌として最も高頻度に分離される起炎菌である。市中肺炎の原因菌の分離頻度を見ると、報告地域・国にかかわらず肺炎球菌が第一位であり、また成人の髄膜炎症例においても本菌によるものが30~40%で最も重要な原因菌となっている(Durand *et al.*: N Engl J Med, 1993)。また菌血症を合併した場合の死亡率は、65歳以上では20%、85歳以上では40%と高齢者ほど高くなる(Arts *et al.*: Clin Microbiol Rev, 2003)。

临床上問題となる肺炎球菌は限られた莢膜型であること、その莢膜型を考慮してワクチンが作られていることを考えると、肺炎球菌の莢膜型は臨床に直結する最も重要な病原因子であると考えられる。このため、莢膜型と病原性との関連も複数の検討が行われているが、病態の理解にまで繋がっていないのが現状である(Mitchell *et al.*: Clin Microbiol Infect, 2010)。

宿主側の生体防御反応も肺炎の増悪に関与しており、好中球貪食機能の低下や、好中球により過剰産生されたエラスターゼによる組織破壊などが、その一要因となっていることが実験的に証明されている(Cole *et al.* Adv Microb Physiol, 2014; Krone *et al.* Lancet Respir Med, 2014)。しかし、いずれも肺炎球菌性肺炎の重症化要因・機序を説明できるものではなく、臨床研究にまで到達できていないのが現状である。

2. 研究の目的

上記研究背景からも、ヒト宿主に対する本菌の病原性メカニズムおよび本菌に対する宿主側の感染防御メカニズムを解明し、治療・予防戦略を執ることが急務である。既に申請者らのグループでは肺炎球菌に対する致死感受性の高いマウス種を見出し、これを基に致死感受性に関わる責任遺伝領域の特定を概ね終えている。そこで本研究では、肺炎球菌に対する疾患感受性遺伝子(群)を同定し、その役割・機能を解析する。本研究により得られる知見は、重症細菌性肺炎治療・ワクチン予防に対して新しい方向性を示せるものと期待している。

3. 研究の方法

既に申請者らは、肺炎球菌に対する致死感受性の高いマウス種を見出し、これを利用して責任遺伝領域の特定を終えている。そこで本研究では、本領域内に存在する遺伝情報を利用して、対象マウスから全ゲノム情報を取得して比較遺伝学的解析を行い致死感受性要因の特定を行う。また感染免疫学的手法により肺炎球菌の認識および防御反応に関わる因子を探索し、肺炎の重症化と肺炎球菌の莢膜型との関連性を明らかにする。

(1) ゲノム解析の実施

CBA/JN マウスの全ゲノム配列を決定し、責任遺伝子領域を中心に近縁マウス種との配列比較解析を実施する。得られた配列データをもとに解析サーバー内で参照配列(CBA/JおよびC57BL/6)に対し取得リードをマッピングすることにより、配列決定・変異の検出を行う。

(2) 生体防御反応と病原体認識機構の解析

責任遺伝領域に存在するケモカインレセプターであるCxcr2およびそのリガンドであるCxc11とCxc12の肺での発現量を調べたところ、感染3日後をピークとした肺内菌数の増加と相関してCBA/JNマウスにおいて強く発現していた。そこで感染後の時系列を解析し、感染早期・中期・後期のどの時期に反応性が強く見られるかを特定する。また、反応性の違いが最も見られる時期の肺を回収し、各種炎症細胞等の解析を行う。

(3) 肺炎の重症化と肺炎球菌の莢膜型との関連性

肺炎球菌は莢膜の構造の違いにより約100種類の莢膜型が報告されており、莢膜型により病原性や薬剤耐性が異なることが知られている。これまでの我々の検討においても、莢膜型19Fの肺炎球菌では肺炎の重症化が認められるが、莢膜型3や莢膜型14では肺炎の重症化が認められないことが分かっている。そこで19F型の莢膜欠損株を分与(輪島先生・名城大学)いただき、CBA/JNマウスでの反応性について調べる。

4. 研究成果

(1) CBA/JN マウスの全ゲノム解析

CBA/JN マウスの全ゲノム配列を決定した。責任遺伝子領域を中心に C57BL/6 および CBA/J マウス (CBA/JN マウスの近縁種) との配列比較解析を実施したが、各種構造遺伝子内に変基置換などの変異は認められなかった。肺炎球菌感染時には、CBA/JN マウス (肺炎重症型) と CBA/J マウス (野生型) とでは遺伝子発現量に差が認められるため、これらの要因について更に検討する必要がある。

(2) 疾患感受性遺伝子の生体防御反応への関与

CBA/JN マウスの責任遺伝領域内に CXCR2 が存在する。予備検討において、責任遺伝領域に存在するケモカインレセプターである CXCR2 およびそのリガンドである CXCL1 と CXCL2 の肺での発現量を調べたところ、感染3日後をピークとした肺内菌数の増加と相関して CBA/JN マウスにおいて強く発現していた。そのため、これらの遺伝子発現量について詳細な検討を行ったところ、特に感染初期において CBA/JN マウスでの遺伝子発現量の遅延が認められた。また、CBA/J および CBA/JN マウスの好中球・マクロファージ数を FACS 解析により検討したところ、遺伝子発現の結果に相関して CBA/JN マウスでは好中球・マクロファージの肺への動員が遅延していた。これらのことは、CBA/JN マウスにおいて感染後の初期応答が遅延していることを示唆している。今後は、特に感染初期に焦点をあて、好中球・マクロファージを単離し肺炎球菌に対する貪食能・殺菌能の観察、両者のクロストーク、抗原提示に関与する樹状細胞やその後の T 細胞の分化・増殖への影響を明らかにしたい。

(3) 肺炎の重症化と肺炎球菌莢膜との関連性について

本肺炎球菌性肺炎モデルでは莢膜型 19F の肺炎球菌が肺炎の重症化に関わっており、その他の莢膜型 (3 型、14 型) では肺炎の重症化は認められなかった。このため、宿主側の疾患感受性遺伝子と病原体側の病原因子 (莢膜構造) の両方の因子が重なった時に肺炎が重症化する可能性がある。そこで、19F 型の莢膜欠損株を用いて CBA/JN マウスでの反応性について調べた。19F 型莢膜を保有しない莢膜欠損株を CBA/JN マウスに感染させると、肺炎は重症化せず、欠損株は直ちに排除された。このときの Cxcr2、Cxc11/2 の遺伝子発現を調べたところ、野生型菌株のような反応の遅延は認められなかった。以上の結果から、莢膜構造が肺炎の重症化に機能している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nakakubo Sho, Kimura Soichiro, Mimura Kazuyuki, Kajiwara Chiaki, Ishii Yoshikazu, Konno Satoshi, Tateda Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Traditional Japanese Herbal Medicine Hochu-Ekki-to Promotes Pneumococcal Colonization Clearance via Macrophage Activation and Interleukin 17A Production in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 569158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.569158	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 -

1. 著者名 Mimura Kazuyuki, Kimura Soichiro, Kajiwara Chiaki, Nakakubo Sho, Schaller Matthew A., Ishii Yoshikazu, Standiford Theodore J., Kunkel Steven L., Tateda Kazuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Pneumococcal conjugate vaccine modulates macrophage-mediated innate immunity in pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae following influenza	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	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） 10.1016/j.micinf.2019.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木村聡一郎、石井良和、館田一博
2. 発表標題 肺炎球菌保菌マウスモデルを用いたワクチンによる保菌排除の検討
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shindo R, Kimura S, Ishii Y, Tateda K
2. 発表標題 Genetic linkage analysis identifies pneumococcal susceptibility locus in mice
3. 学会等名 The 3rd Asian Pneumococcal Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakao R, Iwabuchi Y, Kimura S, Hirayama S, Morino S, Suzuki M, Ohnishi M
2. 発表標題 Intranasal vaccine development using probiotic E. coli-derived membrane vesicles carrying pneumococcal capsular polysaccharides
3. 学会等名 15th Vaccine Congress
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村聡一郎、石井良和、舘田一博
2. 発表標題 肺炎球菌保菌マウスモデルを用いた保菌排除の基礎的検討
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村聡一郎
2. 発表標題 肺炎球菌に対する宿主応答の基礎的解析 (ワーク ショップ: 多角的な研究アプローチで再考する肺炎球菌感染症)
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 木村聡一郎、石井良和、舘田一博
2. 発表標題 肺炎球菌性重症化肺炎マウスモデルを利用した疾患感受性遺伝領域の探索
3. 学会等名 微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 三村一行、木村聡一郎、中久保祥、石井良和、舘田一博
2. 発表標題 インフルエンザ後の二次性肺炎球菌肺炎マウスモデルにおける肺炎球菌結合型ワクチンの自然免疫活性化作用の検討
3. 学会等名 第67回日本感染症学会東日本地方会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村聡一郎、舘田一博
2. 発表標題 不思議なミクロの世界 -目からウロコの微生物学講座- 肺炎球菌
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村聡一郎、田中裕美
2. 発表標題 肺炎球菌の重症化に関わる疾患感受性遺伝子の同定・機能解析
3. 学会等名 第150回東邦医学会例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三村一行、木村聡一郎、石井良和、舘田一博
2. 発表標題 インフルエンザ後の二次性肺炎球菌性肺炎における肺炎球菌結合型ワクチン効果
3. 学会等名 第91回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村聡一郎、三村一行、館田一博
2. 発表標題 肺炎球菌保菌マウスモデルを利用した病態解析
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村聡一郎
2. 発表標題 肺炎球菌の保菌を考える（教育講演）
3. 学会等名 第70回日本化学療法学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 進藤綾大，梶原千晶，館田一博，木村聡一郎
2. 発表標題 肺炎球菌性肺炎における疾患感受性遺伝子の同定と病態増悪機構の解明
3. 学会等名 第34回微生物シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>湘南医療大学薬学部感染制御学研究室： https://sums.ac.jp/html/department/pharmacy/laboratory/lab007.html</p>
--

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
---------	---------