

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18590832  
 研究課題名（和文）  
 レジオネラ菌無作為遺伝子変異法を用いたレジオネラ肺炎重症化機序の解明  
 研究課題名（英文）  
 Mechanism of developing severe Legionella pneumonia  
 研究代表者  
 菊地 利明（KIKUCHI TOSHIAKI）  
 東北大学・病院・講師  
 研究者番号：10280926

研究成果の概要：レジオネラ菌 (*Legionella pneumophila*) は重症肺炎の起炎菌として、しばしば臨床的問題となっている。当該研究ではレジオネラ菌の無作為遺伝子変異株を作製し、その原因遺伝子の探索を行った。その結果、レジオネラ菌ゲノム上に計 7 個の責任遺伝子が同定された。これらはレジオネラ菌において分泌機構に関わっていることが知られている遺伝子だったため、なんらかの分泌因子がレジオネラ菌より分泌され、これによってレジオネラ肺炎が重症化するものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：重症肺炎、レジオネラ肺炎、無作為遺伝子変異法

## 1. 研究開始当初の背景

レジオネラ菌 (*Legionella pneumophila*) は細胞内寄生性を特徴とするグラム陰性桿菌で、集中治療室管理が必要な重症肺炎の起炎菌として、しばしば臨床的問題となっている。しかし、レジオネラ菌が、外来抗菌薬治療が可能な軽症肺炎の起炎菌となることは少なく、『なぜレジオネラ肺炎が重症化しやすいのか』はよくわかっていない。

これまでわれわれは、レジオネラ肺炎重症化の要因として、レジオネラ菌に対する宿主免疫応答を取り上げ研究を行ってきた。その中で、樹状細胞とマクロファージではレジオ

ネラ菌に対する細胞応答が全く異なること、レジオネラ感染初期の自然免疫にはマクロファージがより重要であること、そして、そのマクロファージはレジオネラ菌の細胞傷害作用をより受け易いことを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

レジオネラ肺炎が重症化しやすい要因として、レジオネラ菌による細胞傷害作用に着目し、トランスポゾンを用いてレジオネラ菌の無作為遺伝子変異株を作製することによって、この分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

Howard A. Shuman 教授らの方法 (Mol. Microbiol. 11:641-53, 1994) に従い、カナマイシン耐性遺伝子を挿入するトランスポゾンのプラスミドを用いて、レジオネラ菌の無作為遺伝子変異株の作製を行った。具体的には、プラスミドをエレクトロポレーション法でレジオネラ菌に遺伝子導入し、カナマイシン耐性株を、カナマイシン含有 BCYE プレートで選択することによって、レジオネラ菌の無作為遺伝子変異株を作製した。なおこの目的で、Tn903 由来のプラスミド pLAW330 と、mini-Tn10 由来のプラスミド pCDP05 を準備した。トランスポゾン mini-Tn10 に比べ、トランスポゾン Tn903 のゲノム挿入は高効率ではあるが、無作為ではないことが一般に懸念されるため、用意した二種類のトランスポゾンの遺伝子導入効率と無作為性を実際に比較した上で、以後の実験で用いるトランスポゾンを決定した。このように作製したレジオネラ菌の無作為遺伝子変異株から、その細胞傷害性を指標に、スクリーニングを行い、細胞傷害性を失ったレジオネラ菌遺伝子変異株を選択した。

### 4. 研究成果

(2006 年度) レジオネラ菌の無作為遺伝子変異株を作製する目的で、Tn903 由来のプラスミド pLAW330 と、mini-Tn10 由来のプラスミド pCDP05 の大量調製をアルカリ法で行った。次に、レジオネラ菌のコンピテント細胞を作製し、pLAW330 と pCDP05 をそれぞれエレクトロポレーション法で遺伝子導入した。pLAW330 や pCDP05 を遺伝子導入したレジオネラ菌を 25  $\mu$ g/ml のカナマイシン含有 BCYE プレートで選択培養したところ、いずれのプラスミドを導入しても多数の変異株が得られた。そこで、以後の実験では pCDP05 を用いて遺伝子変異株を作製した。

(2007 年度)、細胞傷害性を指標に 11 株のレジオネラ菌遺伝子変異株を選択した。この 11 株において、継代により薬剤耐性遺伝子が脱落しないことと、ベクター全体ではなくトランスポゾン部分のみの挿入であることをまず確認した。さらに、これらの遺伝子変異株から DNA を抽出し、トランスポゾン周囲の塩基配列を決定することによって、トランスポゾンの挿入によって変異した遺伝子の同定を行った。

(2008 年度) 選択した 11 株において変異遺伝子を同定したところ、レジオネラ菌ゲノム (ACCESSION NC\_002942 / 3, 397kb) 上 500kb 付近に 5 遺伝子と、同じくレジオネラ菌ゲノム上 3, 000kb 付近に 2 遺伝子、計 7 個の責任遺伝子が認められた。これらはレジオネラ菌において菌外への分泌機構に関わっていることが知られている遺伝子だったため、なん

らかの分泌因子がレジオネラ菌より分泌され、これによってレジオネラ菌の細胞障害作用が発揮されているものと考えられた。そこで、33 個の既知の分泌因子について、その細胞障害作用を調べてみた。しかし、いずれにもその活性は認められず、これ以外の分泌因子が関わっているものと考えられた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Fujimura S, Sato T, Mikami T, Kikuchi T, Gomi K, Watanabe A. Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilms formed on titanium medical devices. *Int J Antimicrob Agents* 32:481-484, 2008. 査読有
2. Chen S, Ndhlovu LC, Takahashi T, Takeda K, Ikarashi Y, Kikuchi T, Murata K, Pandolfi PP, Riccardi C, Ono M, Sugamura K, Ishii N. Co-inhibitory roles for glucocorticoid-induced TNF receptor in CD1d-dependent natural killer T cells. *Eur J Immunol.* 38:2229-2240, 2008. 査読有
3. Inoue A, Xin H, Suzuki T, Kanehira M, Kuroki Y, Fukuhara T, Kikuchi T, Maemondo M, Nukiwa T, Saijo Y. Suppression of surfactant protein A by an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor exacerbates lung inflammation. *Cancer Sci.* 99:1679-1684, 2008. 査読有
4. Nukiwa T, Suzuki T, Fukuhara T, Kikuchi T. Secretory leukocyte peptidase inhibitor and lung cancer. *Cancer Sci.* 99:849-855, 2008. 査読有
5. Fujimura S, Watanabe A, Fuse K, Kikuchi T, Gomi K, Tokue Y. In vitro susceptibility of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to manufactured generic drugs compared with the brand vancomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 31:391-392, 2008. 査読有
6. Watanabe A, Fujimura S, Kikuchi T, Gomi K, Fuse K, Nukiwa T. Evaluation of dosing designs of carbapenems for severe respiratory infection using Monte Carlo simulation. *J Infect Chemother.* 13:332-340, 2007. 査読有
7. Zaini J, Andarini S, Tahara M, Saijo Y, Ishii N, Kawakami K, Taniguchi M, Sugamura K, Nukiwa T, Kikuchi T. OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4+ Th cell

antitumor immunity in mice. *J Clin Invest.* 117:3330-3338, 2007. 査読有

8. Xin H, Kanehira M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kikuchi T, Nukiwa T, Saijo Y. Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 25:1618-1626, 2007. 査読有

9. Gomi K, Watanabe A, Aoki S, Kikuchi T, Fuse K, Nukiwa T, Kurokawa I, Fujimura S. Antibacterial activity of carbapenems against clinically isolated respiratory bacterial pathogens in Japan between 2005 and 2006. *Int J Antimicrob Agents.* 29:586-592, 2007. 査読有

10. Oishi H, Okada Y, Kikuchi T, Sado T, Oyaizu T, Hoshikawa Y, Suzuki S, Matsumura Y, Kondo T. Lipid-mediated transbronchial human interleukin-10 gene transfer decreases acute inflammation associated with allograft rejection in a rat model of lung transplantation. *Transplant Proc.* 39:283-285, 2007. 査読有

11. Gomi K, Kikuchi T, Tokue Y, Fujimura S, Uehara A, Takada H, Watanabe A, Nukiwa T. Mouse and human cell activation by N-dodecanoyl-DL-homoserine lactone, a *Chromobacterium violaceum* autoinducer. *Infect Immun.* 74:7029-7031, 2006. 査読有

12. Ohta H, Tazawa R, Nakamura A, Kimura Y, Maemondo M, Kikuchi T, Ebina M, Nukiwa T. Acute-onset sarcoidosis with erythema nodosum and polyarthralgia (Löfgren's syndrome) in Japan: a case report and a review of the literature. *Intern Med.* 45:659-662, 2006. 査読有

13. Nukiwa M, Andarini S, Zaini J, Xin H, Kanehira M, Suzuki T, Fukuhara T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Saijo Y, Nukiwa T, Kikuchi T. Dendritic cells modified to express fractalkine/CX3CL1 in the treatment of preexisting tumors. *Eur J Immunol.* 36:1019-1027, 2006. 査読有

14. Kikuchi T. Genetically modified dendritic cells for therapeutic immunity. *Tohoku J Exp Med.* 208:1-8, 2006. 査読有

15. Watanabe H, Maemondo M, Okouchi S, Suzuki T, Kikuchi T, Tazawa R, Ebina M, Saijo Y, Hoshikawa Y, Nukiwa T. A case of pulmonary Langerhans cell histiocytosis discovered by CT mass screening and followed by bronchoalveolar lavage][Article in Japanese. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* 44:869-873, 2006. 査読有

[学会発表] (計 37 件)

1. Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Zaini J, Watanabe A, Combined efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with device-related infection by biofilms-forming *S. aureus*. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. 平成 20 年 9 月 7 日、ケインズ、オーストラリア

2. 布施克浩、藤村 茂、五味和紀、菊地利明、渡辺 彰、*Pseudomonas aeruginosa* の産生色素と薬剤耐性に関する検討、第 56 回日本化学療法学会総会、平成 20 年 6 月 6 日、岡山

3. 五味和紀、藤村 茂、菊地利明、布施克浩、黒川いく、渡辺 彰 2007 年分離の呼吸器病原細菌に対するカルバペネム系 5 薬剤の抗菌力、第 56 回日本化学療法学会総会、平成 20 年 6 月 6 日、岡山

4. 藤村 茂、布施克浩、五味和紀、菊地利明、渡辺 彰、抗緑膿菌性注射用抗菌薬における先発品の薬剤感受性比較、第 56 回日本化学療法学会総会、平成 20 年 6 月 6 日、岡山

5. 藤村 茂、布施克浩、五味和紀、菊地利明、渡辺 彰、抗緑膿菌性注射用抗菌薬における先発品とジェネリック品の薬剤感受性比較、第 56 回日本化学療法学会総会、平成 20 年 6 月 6 日、岡山

6. Andarini S, Zaini J, Kikuchi T, Tahara M, Saijo Y, Ishi N, Sugamura K, Nukiwa T, Induction of antitumor immunity by intratumoral administration of genetically modified dendritic cells (DCs) to overexpress OX40 Ligand. American Thoracic Society International Conference, 平成 20 年 5 月 16 日、トロント、カナダ

7. Zaini J, Andarini S, Kikuchi T, Nukiwa T, OX40L-OX40 Interactions Contribute to NKT Activation in a Mouse Model of Allergic Airway Disease. American Thoracic Society International Conference, 平成 20 年 5 月 16 日、トロント、カナダ

8. 五味和紀、菊地利明、布施克浩、藤村 茂、渡辺 彰、2006~2007 年度に東北地区で分離された緑膿菌の薬剤感受性疫学調査成績、第 82 回日本感染症学会総会、平成 20 年 4 月 18 日、松江

9. 榊原智博、井上 彰、福原達朗、五味和紀、菊地利明、石本 修、菅原俊一、西條康夫、貫和敏博、上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異を認めた肺癌の一家系、第105回日本内科学会総会講演会、平成20年4月11日、東京

10. 榊原智博、菊地利明、井上 彰、五味和紀、渡辺 彰、貫和敏博、VNTR型別による*M. avium*菌の系統樹解析で、同一系統株と考えられた*M. avium*による過敏性肺臓炎の2例、日本呼吸器学会東北地方会、平成20年3月1日、仙台

11. 榊原智博、井上 彰、福原達朗、五味和紀、菊地利明、石本 修、西條康夫、貫和敏博、上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異を認めた肺癌の一家系、第48回日本肺癌学会総会、平成19年11月9日、名古屋

12. Fukuhara T, Suzuki T, Sakakibara T, Tahara M, Inoue A, Kikuchi T, Saijo Y, Nukiwa T, The role of Secretory Leukoprotease Inhibitor (SLPI) in lung tumor formation. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 平成19年10月3日、横浜

13. 久田 修、福原達朗、菊地利明、井上 彰、海老名雅仁、西條康夫、貫和敏博、渡辺みか、石田和之、無加療で縮小した多発肺結節・多発骨腫瘍・脳腫瘍の一例、東北胸部疾患ワークショップ、平成19年9月8日、仙台

14. Kikuchi T, NKT cells activation through OX40. OLS/NUS-Tohoku/ COE Joint Symposium, 平成19年9月5日、シンガポール

15. Hisata S, Fukuhara T, Suzuki T, Kikuchi T, Saijo Y, Secretory Leukoprotease inhibitor(SLPI)and cancer development. OLS/NUS-Tohoku/ COE Joint Symposium, 平成19年9月5日、シンガポール

16. 佐藤輝幸、久田 修、福原達朗、菊地利明、西條康夫、貫和敏博 1年の経過で悪性胸膜中皮腫と確定診断した1症例、第183回日本内科学会東北地方会、平成19年9月1日、青森

17. 榊原智博、菊地利明、西條康夫、貫和敏博、佐渡 哲、星川 康、近藤 丘、佐藤秀隆、背部痛を主訴に胸水を指摘され悪性リンパ腫と診断された一例、内科学会東北地方会、平成19年6月16日、仙台

18. 榊原智博、菊地利明、田澤立之、貫和敏博 *Mycobacterium avium* complexが原因抗

原と考えられた過敏性肺臓炎の一例、第289回しんばい会、平成19年6月6日、仙台

19. 藤村 茂、菊地利明、五味和紀、布施克浩、渡辺 彰 In vitro耐性獲得実験による*P. aeruginosa*の多剤耐性化の検討、第55回日本化学療法学会総会、平成19年6月1日、仙台

20. 山内崇弘、竹茂 求、那須潜思、小川廣幸、渡辺 彰、菊地利明 ディスク拡散法による薬剤感受性試験の迅速定量分析システムの開発(2)—迅速性評価—、第55回日本化学療法学会総会、平成19年6月1日、仙台

21. 五味和紀、渡辺 彰、菊地利明、藤村 茂、貫和敏博 2005~2006年度に東北地区で分離された緑膿菌の薬剤感受性疫学調査成績、第81回日本感染症学会総会、平成19年4月10日、京都

22. 榊原智博、菊地利明、田澤立之、貫和敏博 労作時呼吸困難を主訴に、胸部CTでスリガラス状陰影を認めた一例、第14回東北胸部疾患ワークショップ、平成19年3月3日、仙台

23. 榊原智博、菊地利明、田澤立之、貫和敏博 *Mycobacterium avium* complexが原因抗原と考えられた過敏性肺臓炎の一例、第181回日本内科学会東北地方会、平成19年2月17日、仙台

24. Zaini J, Kikuchi T, Saijo Y, Nukiwa T, Role of SLPI expression on tumor growth. 第127回東北大学加齢医学研究所集談会、平成19年1月26日、仙台

25. Kikuchi T, Nukiwa T, Involvement of Fractalkine/CX3CL1 expression by dendritic cells in host immunity against *Legionella pneumophila*. 11<sup>th</sup> Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 平成18年11月19日、京都

26. 菊地利明、遺伝子改変樹状細胞を用いた感染免疫応答の誘導、沖縄感染免疫シンポジウム、平成18年11月10日、沖縄

27. Zaini J, Kikuchi T, Andarini S, Nukiwa T, Antitumor immunity induced by intratumoral administration dendritic cells expressing OX40 ligand. The 21st century COE program The 3rd international symposium on novel perspectives in cancer research and translation to the clinic, 平成18年11月9日、仙台。

28. 五味和紀、渡辺 彰、菊地利明、藤村 茂、

布施克浩、貫和敏博、2005年度に東北地方で分離された緑膿菌の薬剤感受性疫学調査成績、第55回日本感染症学会東日本地方会総会・第53回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会、平成18年10月26日、東京

29. 五味和紀、渡辺 彰、菊地利明、藤村 茂、布施克浩、黒川いく、貫和敏博、2005～2006年分離の呼吸器病原細菌に対するカルバペネム4薬剤(MEPM, IPM, PAM, BIPM)の抗菌力。第55回日本感染症学会東日本地方会総会・第53回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会、平成18年10月26日、東京

30. ザイニジャマル、菊地利明、貫和敏博、樹状細胞の抗腫瘍免疫誘導におけるOX40リガンドの働き、第65回日本癌学会学術総会、平成18年9月28日、横浜

31. 福原達朗、鈴木拓児、榊原智博、田原 稔、菊地利明、西條康夫、貫和敏博、肺癌細胞と蛋白分解酵素阻害物質Secretory Leukoprotease inhibitor (SLPI)、第65回日本癌学会学術総会、平成18年9月28日、横浜

32. 佐々木ときわ、木村雄一郎、佐藤大希、菊地利明、海老名雅仁、貫和敏博、fibrotic NSIPの急性増悪にて急速に呼吸不全が進行し死亡した1例、第83回日本呼吸器学会東北地方会・第113回日本結核病学会東北地方会、平成18年9月16日、仙台

33. 佐藤大希、田澤立之、木村雄一郎、菊地利明、海老名雅仁、貫和敏博、三木 誠、両側末梢優位の陰影を呈し診断に苦渋した肺胞蛋白症の1例、第179回日本内科学会東北地方会、平成18年6月17日、仙台

34. 佐々木ときわ、五味和紀、菊地利明、貫和敏博、森 建文、星 史彦、野田雅史、渡辺みか、遠藤希之、中枢性尿崩症発4年後にPulmonary Langerhans Cell Histocytosis (LCH)が発見された1例、第179回日本内科学会東北地方会、平成18年6月17日、仙台

35. Zaini J, Andarini S, Kikuchi T, Nukiwa T, Antitumor immunity induced by intratumoral administration of dendritic cells transduced with adenovirus vector expressing OX40 ligand. 第46回日本呼吸器学会学術講演会、平成18年6月1日、東京

36. 高橋 洋、佐藤 忍、五味和紀、菊地利明、渡辺 彰、時間外受診・救急搬入を契機

に発見された結核症例に関する臨床的検討、第81回日本結核病学会総会、平成18年4月27日、仙台

37. 小山正平、木村雄一郎、菊地利明、田澤立之、海老名雅仁、渡辺 彰、貫和敏博、肺ランゲルハンス組織球症(LCH)5症例の臨床的検討、第103回日本内科学会総会、平成18年4月14日、横浜

[図書] (計2件)

1. 菊地利明、南江堂、『呼吸器疾患 最新の治療 2010-2012』VI-16. 非結核性抗酸菌症、2009年、印刷中

2. 菊地利明、メディカルサイエンス・インターナショナル、『疾患からまとめた病態生理 FIRST AID 呼吸器疾患 最新の治療 2007-2009』サルコイドーシス、2007年、116-118頁

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: VNTR型別による非結核性抗酸菌症の病勢の予測方法

発明者: 貫和敏博、渡辺彰、五味和紀、榊原智博、菊地利明

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 2008-321812号

出願年月日: 2008年12月18日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.kokyuu.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 利明 (Toshiaki Kikuchi)

東北大学・病院・講師

研究者番号: 10280926

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし