

機関番号：32661
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2010
課題番号：20790577
研究課題名（和文） 肺炎球菌性肺炎の重症化に関わる新規疾患感受性遺伝子の探索と解析
研究課題名（英文） Analysis of the susceptibility gene for severe pneumonia with *S. pneumoniae*
研究代表者
木村 聡一郎（KIMURA SOICHIRO）
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：60408870

研究成果の概要（和文）：肺炎球菌性肺炎に関してマウス肺炎モデルを用いて重症化に関わる疾患感受性遺伝子の探索を行った。肺炎球菌に対する致死感受性の高い CBA/JN マウスと抵抗性である C57BL/6 マウスを用いて連鎖解析を実施したところ、第1染色体上の約 10 cM の範囲内に疾患感受性遺伝子が存在する可能性を見出した。その範囲内には肺炎に関わると考えられる複数の因子（免疫グロブリン関連、アポトーシス関連など）が含まれることが分かった。

研究成果の概要（英文）：I explored the disease-susceptible genes associated with severe pneumonia with *Streptococcus pneumoniae* in mouse model. I identified candidate region within 10 cM on chromosome 1 by using linkage analysis with CBA/J x C57B6/J F(2) intercross mouse. In this region, I confirmed possible disease-susceptibility-related genes such as immunoglobulin and apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：肺炎球菌、Genotype、肺炎、マウス

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は、市中肺炎の原因菌として国・地

域を問わず分離頻度が第一位であり、本菌に感染することによる死亡率も高い。よって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が構築したマウス肺炎モデルに対し、臨床より高頻度で分離される莢膜型 19 の肺炎球菌を用いることにより、肺炎球菌に対する致死感受性がマウス種によって異なるという新たな知見を見出している。そこで本研究では、1) 肺炎球菌およびその莢膜型に関わる疾患感受性遺伝子を特定し、2) 重症化機序に関わる責任遺伝子(群)の役割を解析する。本研究を遂行することにより得られる知見は、既存の肺炎球菌感染症治療およびワクチンの有効性に対して新しい方向性を示せるものと確信している。

2. 研究の目的

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で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 (Niederman *et al.*: *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 1730, 2001)、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*, 328: 21, 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*, 16: 308, 2003)。肺炎球菌は口腔・鼻腔に存在する常在菌であり、感受性宿主がこれを吸引することにより肺炎・気管支炎を発症する。肺胞腔に侵入した肺炎球菌は、肺胞マクロファージにより貪食殺菌されるが、莢膜が存在すると貪食殺菌に対して抵抗性に働く。このことから莢膜多糖は感染病態を左右する重要な病原因子と捉えられている。肺炎球菌は約 90 種類の莢膜型が存在し、臨床からは限られた莢膜型 (3、6、9、14、19、23 型) の肺炎球菌が分離されるが、その理由は不明である。本菌の莢膜型と疾患感受性との問題は、ワクチンの有効性とも直接的に関連するテーマであるため、莢膜型との関連性を示すことは非常に大きな医療効果をもたらすと考えられる。一方、肺炎球菌感染症に対する抗菌薬療法としては、ペニシリン系抗菌薬が第一選択薬として使用されていたが、1980 年代以降ペニシリン耐性株 (penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: PRSP)・低感受性株 (penicillin-insensitive *S. pneumoniae*: PISP) の分離頻度が増加傾向にある。近年で

は本邦で分離される肺炎球菌の約 50%が耐性あるいは低感受性を示すことが報告されている (Felmingham D: *J Antimicrob Chemother*, 50: 25, 2002)。また、ペニシリン低感受性株の多くがマクロライド、ミノサイクリンなどの薬剤に対しても耐性を獲得しており、いわゆる多剤耐性肺炎球菌が臨床上的大きな問題となっている。興味深い点としては、臨床分離株の薬剤耐性化パターンと莢膜型との間に相関が見られ、PRSPのうち約 40%が莢膜型 19 の肺炎球菌であるとの報告がなされている (肺炎球菌等による市中感染症研究会: <http://orl.wakayama-med.ac.jp/pneumo/>)。申請者らの研究グループでは、莢膜型 19 の肺炎球菌 (PRSP とペニシリン感受性株 (penicillin-susceptible *S. pneumoniae*: PSSP)) を用いてマウス肺炎モデルの作製に成功し、ある種のマウス (CBA/J) に対して、PRSP、PSSP との区別なく共に高感受性を示すことを報告している (Tateda *et al.*: *Antimicrob Agents Chemother*, 40: 1520, 1996)。このことから、肺炎球菌に対する感受性の違いを遺伝子レベルで調べることにより、新規な肺炎球菌性肺炎の発症・重症化因子を見出すことができるものと期待される。本研究では、上記マウス肺炎モデルを用いて、連鎖解析法とパイオインフォマティクスの両者を効率よく用いることにより、迅速に肺炎球菌性肺炎の疾患感受性に関わる遺伝子座を特定し、重症化機序に関わる遺伝子(群)の機能メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) CBA/J マウスと C57BL/6 マウスを用いた F2 マウスの繁殖と感染実験:
肺炎球菌に対する疾患感受性宿主である CBA/J マウスと、疾患抵抗性宿主である C57BL/6 マウスとを掛け合わせることにより F1 マウスを得た。さらに F1 マウス同士を掛け合わせることにより F2 マウスを 250 匹得た。これらに対して肺炎球菌を用いた経鼻的肺感染を実施した。感染実験としては、得られたマウス (6-7 週令) を用いて、生理食塩水に懸濁した肺炎球菌液を 10^6 CFU/mouse となるように経鼻接種し、肺に感染させた。感染後 5 日目にマウスの肺を回収し、肺内菌数を測定すると同時にマウスの尾を回収し、gDNA を抽出して連鎖解析に使用した。

(2) 連鎖解析の実施:

60 匹の肺炎球菌感受性であった F2 マウスの尾よりゲノム DNA を抽出し連鎖解析 (PCR 法) を実施した。使用する DNA マーカーは、1 染色体あたり複数個となるように設計し、候補

染色体の確定を試みた。次に、候補となる染色体について詳細な解析を行うため DNA マーカーを作製し、できる限り候補範囲が狭くなるように責任遺伝子座の絞り込みを実施した。さらに絞り込みを実施するために、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) をマーカーとして PCR 法を実施し、遺伝子座の絞り込みを行った。検出に用いたマーカーは第 1 染色体上の特定の位置に約 20 種となるように設計した。

(3) DNA マイクロアレイを用いた発現解析：肺炎球菌感染および非感染マウス (CBA/JN) の肺より得られた RNA を用いて cDNA を合成し、DNA マイクロアレイを用いた発現解析を実施した。

4. 研究成果

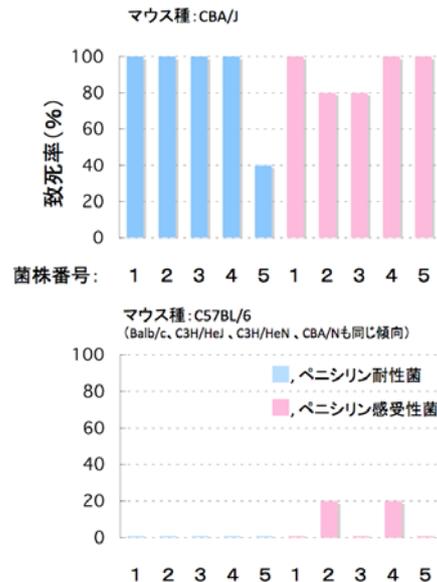
(1) 連鎖解析に使用するマウス種を選択
連鎖解析を実施するために、肺炎球菌に対する致死感受性が高い CBA/JN マウスに対して、a) 表現型が大きく異なるマウス種、b) 遺伝型が大きく異なるマウス種、c) 測定マーカーができる限り多いマウス種を選択することとした。各種マウス (C57BL/6, Balb/c, C3H/HeN, C3H/HeJ) を用いて検討した結果、C57BL/6 が最も適当なマウスであることが分かった。

(2) F1 および F2 マウスに対する感染実験
連鎖解析を実施する際に、CBA/JN と C57BL/6 マウスを用いて F1 マウスおよび F2 マウスの作成を行った。18 匹の F1 マウスを用いて肺炎球菌を感染させたところ、全ての F1 マウスにおいて肺炎球菌に抵抗性であることがわかった。次に 250 匹の F2 マウスを用いて感染実験を行ったところ、感染感受性：抵抗性=60：190 (およそ 1：3) であることが分かった。これらはメンデル遺伝に従っており、単一遺伝子疾患の可能性が強く推察された。

(3) 連鎖解析の実施

上記肺炎球菌に対する感染感受性であった 60 匹のマウスを用いて、尾より gDNA を抽出し、PCR 法による連鎖解析を実施した。はじめに大まかなマッピングを行うために、各染色体上に約 60 種類のプライマーを作成し、連鎖解析を実施したところ、第 1 染色体上に責任遺伝子が存在する可能性を見出した。次に第 1 染色体に 15 種類のプライマーセットを用いて連鎖解析を実施したところ、特定の位置 (約 10 cM 程度) に責任遺伝子が存在することを見出した。さらなる絞り込みを行うため、マウスの SNP を利用した責任遺伝子座の特定を試みた。具体的には、上記 10cM 程度の範囲およびその前後にマーカーとなる SNP を約 20 個選別し、PCR 法による連鎖解析を実施した。しかし責任遺伝子の特定には至

ペニシリン耐性および感受性肺炎球菌
に対する各種マウスの致死感受性



らなかつた。

(4) 責任遺伝子の周辺構造

絞られた領域の候補遺伝子について、DNA microarray を用いた網羅的遺伝子解析、および既存の情報 (GEO より抽出) を基に、責任遺伝子の特定を検討した。感染後 1 日目および 3 日目の肺から RNA を抽出して cDNA を合成し、DNA microarray による網羅的遺伝子発現解析を実施した。候補領域およびその周囲に肺炎球菌による肺炎と関連性のあると予測される遺伝子 (免疫グロブリン関連、アポトーシス関連、自然免疫関連、など) の選抜に成功した。これらに関してはリアルタイム RT-PCR 法を用いて肺炎球菌感染との関連性を解析している。

発現に変化のあった遺伝子数

	Down regulation		Up regulation	
	<x0.5	<x0.75	>x1.5	>x2.0
Day1	32 (0.7%)	352 (8.2%)	529 (12%)	169 (4.0%)
Day3	25 (0.6%)	142 (3.3%)	85 (2.0%)	17 (0.4%)

() 4277 遺伝子に対する割合

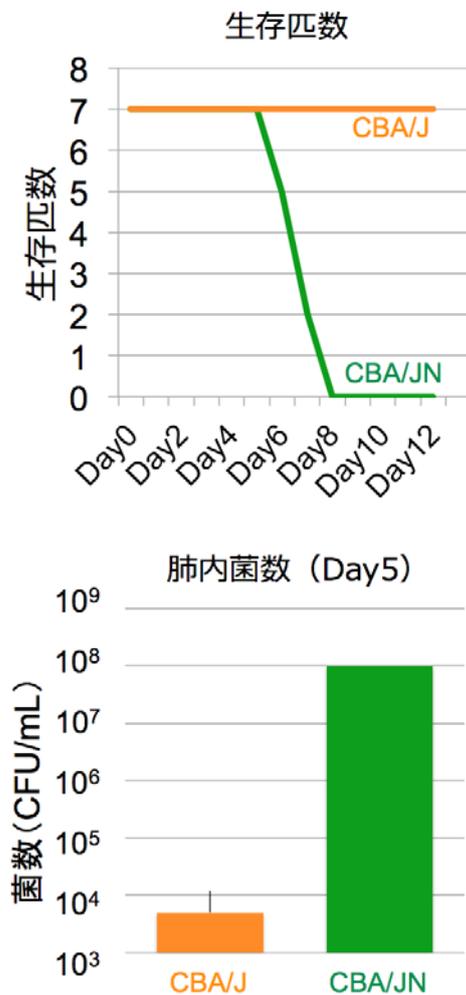
(5) microRNA による網羅的解析

責任遺伝子自体による制御メカニズムではなく、microRNA を介して責任遺伝子を制御している可能性も考慮し、肺炎球菌感染マウスの肺より RNA を抽出し、microRNA の網羅的解析を実施した。候補となる microRNA が複数得られたため、既報告の情報などとも併せて、得られたデータを現在解析中である。

以上の結果から、本研究期間中には責任遺伝

子の特定にはいたらなかった。しかし、第1染色体上の特定領域に責任遺伝子が存在する可能性を見出しており、さらなる解析により責任遺伝子の特定が可能となるものと考えている。

肺炎球菌に対する感受性の高いマウス種として CBA/JN、疾患感受性の低いマウス種として C57BL/6 を用いて検討を行ったが、ジャクソン社が保有する CBA/J と日本チャールズリバーが保有している CBA/JN とは遺伝的背景が非常に近い。これらを用いて肺炎球菌に対する疾患感受性を調べたところ、遺伝背景が近いにもかかわらず、疾患感受性と抵抗性が明瞭に区別される結果となった。このことから、これらのマウス種を用いることにより、効率的に責任遺伝子の特定を行うことができるものと期待している。



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)

[学会発表] (計 1 件)

木村聡一郎、舘田一博、山口恵三：肺炎球菌性肺炎の重症化に関わる新規疾患感受性因子の探索. 第 58 回日本化学療法学会総会. 2010 年 6 月 3 日 (長崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 聡一郎 (KIMURA SOICHIRO)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：60408870

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし