

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08825

研究課題名(和文) 侵襲性肺炎球菌感染症におけるタイト結合とボトルネック効果の解明による新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel strategy against invasive pneumococcal diseases by regulating tight junction and bottleneck effect

研究代表者

河野 正充 (Kono, Masamitsu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20511570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鼻腔粘膜のバリア機構と自然免疫および神経ネットワークによる免疫応答が侵襲性感染症の発症制御における役割を明らかにすることを目的とした。上皮細胞株と肺炎球菌との共培養モデルにて、肺炎球菌が細胞間隙に侵入し、深層で増殖している様子を確認した。また肺炎球菌の鼻腔保菌による敗血症自然発症モデルを確立した。菌血症発症率は単独感染でTLR9 KOマウスで高値であったが、インフルエンザ重感染では、TLR3 KOマウスおよびTRPV4 KOマウスで高い菌血症発症率を認めた。肺炎球菌の侵襲性感染症発症において、自然免疫およびTRP機構が侵襲性感染症発症を制御していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、IPD発症を制御する鼻腔バリア機構の機序解明を目的とする。肺炎球菌による菌血症は肺感染を介さずに発症することも多く、突然の発熱と全身状態悪化をきたししばしば致命的となる重篤な感染症である。本研究では、気道上皮細胞株を用いたin vitroモデルと研究代表者がこれまでに確立した侵襲性肺炎球菌感染症自然発症モデルを用いたin vivoモデルを組み合わせた展開を行った。気道上皮細胞系の維持と恒常性維持における免疫機構に着目した治療戦略の樹立は世界的に大きなインパクトがあるものとする。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to clarify the roles of the barrier mechanism of the nasal cavity and immune responses by innate immunity and neural networks (transient receptor potential: TRP) in the control of invasive infections. In a co-culture model of epithelial cell lines and pneumococci, we confirmed that pneumococci invade intercellular spaces and proliferate in deeper layers. We also established a model of spontaneous arising sepsis caused by pneumococcal nasal carriage. The incidence of bacteremia was high in TLR9 KO mice with pneumococcal single infection, however, with influenza superinfection, TLR3 KO mice and TRPV4 KO mice showed high bacteremia incidence. In the development of invasive pneumococcal infections, innate immunity and TRP mechanisms were considered to control the development of invasive infections.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：侵襲性肺炎球菌感染症

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬の不適切な使用を背景とした薬剤耐性菌 (AMR) の増加に対して国際的な警鐘がなされており、薬剤耐性菌のさらなる増加を防ぐために抗菌薬の適正使用の推進とともに、新たな治療法・制御法の開発が強く望まれている。肺炎球菌感染症は、蛋白結合型ワクチンの世界的な普及により IPD の減少が報告されている反面、血清型置換による非ワクチン株による肺炎球菌感染症の増加が問題となっており、新たな戦略が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、IPD 発症の制御における鼻腔防御機構の解明を目的とする。肺炎球菌による菌血症は肺感染を介さずに発症することも多く、突然の発熱と全身状態悪化をきたししばしば致死的となる重篤な感染症である。本研究は、ヒト培養細胞-肺炎球菌共培養モデルを用いた肺炎球菌の細胞間隙侵入の機序、マウスモデルによる敗血症発症機序における自然免疫の関与についての解明、敗血症発症への神経ネットワークによる制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト培養細胞-肺炎球菌共培養モデルを用いた肺炎球菌の細胞間隙侵入

コラーゲンゲル上でヒト上皮細胞 Detroit562 株を MEM + 10% FBS および肺炎球菌: 1×10^4 CFU を共培養した。肺炎球菌の細胞間隙侵入過程を微速度観察し、24 時間培養後に 4% パラホルムアルデヒド固定し、細胞間隙に侵入した肺炎球菌を LIVE/DEAD 染色にて評価した。

(2) マウスモデルによる侵襲性肺炎球菌感染症発症機序の解明

肺炎球菌経鼻接種による敗血症自然発症マウスモデルを用いた。強病原性の肺炎球菌 6A 株を経鼻接種し、敗血症自然発症を引き起こしたのちに下記の検討を行った。

肺炎球菌性敗血症における Toll-like receptor (TLR) の影響

野生型マウス (WT)、TLR3 ノックアウトマウス (TLR3 KO)、TLR7 ノックアウトマウス (TLR7 KO)、TLR9 ノックアウトマウス (TLR9 KO) および Unc93b1 ノックアウトマウス (Unc93b1 KO) による敗血症発症率を評価した。

肺炎球菌鼻腔保菌における炎症誘導機序

WT、TLR3 KO、TLR7 KO、TLR9 KO、Unc93b1 KO にそれぞれ肺炎球菌を経鼻接種後、鼻腔洗浄液を採取し、鼻腔保菌量を評価するとともに、鼻腔洗浄液中の好中球数、マクロファージ数をフローサイトメトリーで計測した。

(3) 侵襲性肺炎球菌感染症発症における神経ネットワーク関与の解明

神経ネットワーク機構の重要な因子である transient receptor potential (TRP) のサブファミリーの TRPV1 (Vanilloid 1) および TRPV4 (Vanilloid 4) に着目した。TRPV1 ノックアウトマウス (TRPV1 KO) および TRPV4 ノックアウトマウス (TRPV4 KO) を用い、神経ネットワークによる細胞構築の維持の関与を調査した。(2) と同様に肺炎球菌 6A 株を経鼻接種し、敗血症自然発症モデルを作成した。

肺炎球菌性敗血症における TRP の影響

WT、TRPV1 KO、TRPV4 KO による敗血症発症率を評価する。

肺炎球菌鼻腔保菌における炎症誘導機序

WT、TRPV1 KO、TRPV4 KO にそれぞれ肺炎球菌を経鼻接種後、鼻腔洗浄液を採取し、鼻腔保菌量を評価するとともに、鼻腔洗浄液中の好中球数、マクロファージ数をフローサイトメトリーで計測した。

遠隔臓器における肺炎球菌播種

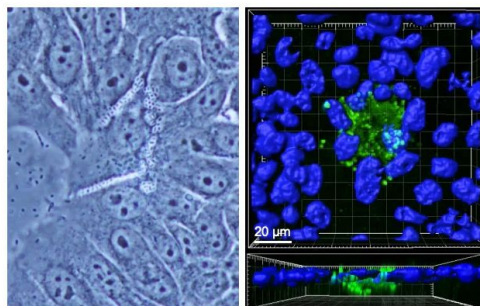
WT、TRPV1 KO、TRPV4 KO にそれぞれ肺炎球菌およびインフルエンザウイルスを経鼻接種後、肺、脾臓、大脳を採取し、菌量を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト培養細胞-肺炎球菌共培養モデルを用いた肺炎球菌の細胞間隙侵入

ヒト上気道細胞株である Detroit562 細胞と肺炎球菌との共培養モデルを確立した。肺炎球菌が細胞表面で増殖した後、細胞間隙に侵入し、上皮細胞層よりも深層で増殖している様子を微速度撮影および蛍光染色により確認した (図 1)。

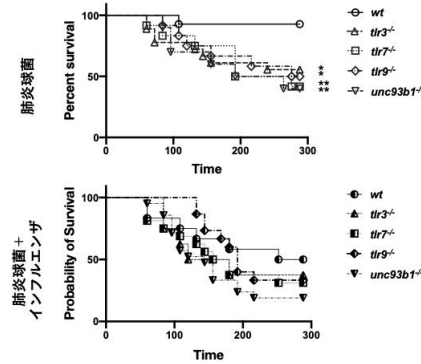
図 1



(2) マウスモデルによる侵襲性肺炎球菌感染症発症機序の解明

野生型マウス、各種 Toll-Like receptor (TLR3, TLR7, TLR9) ノックアウトマウスおよび Unc93b1 KO マウスにて敗血症自然発症の感染実験を行った。菌血症の発症率は野生型、TLR3 KO、TLR7 KO、Unc93b1 KO マウスが 20-40% であつたのに対し、TLR9 KO マウスでは 80% 前後であった。一方で、侵襲性肺炎球菌感染症の増悪因子であるインフルエンザウイルスを肺炎球菌感染後に重感染させると、TLR3 ノックアウトマウスで有意に高い菌血症発症率を認めた。一方で、インフルエンザウイルスを先行感染させると Unc93b1 KO マウスが最も生存率が低下した(図2)。

図2



鼻腔局所における免疫応答の評価として好中球とマクロファージの遊走数を計測すると、肺炎球菌単独感染では、野生型マウスと比較して、TLR7 KO、TLR9 KO マウスではマクロファージの遊走が著明に増加していた。インフルエンザウイルスの先行感染モデルでは TLR3 KO、Unc93b1 KO マウスにおいて好中球およびマクロファージの遊走が有意に減少した。肺炎球菌感染後のインフルエンザ重感染モデルでは、TLR3 KO、Unc93b1 KO マウスにおいて好中球の遊走が有意に減少した(図3)。

図3

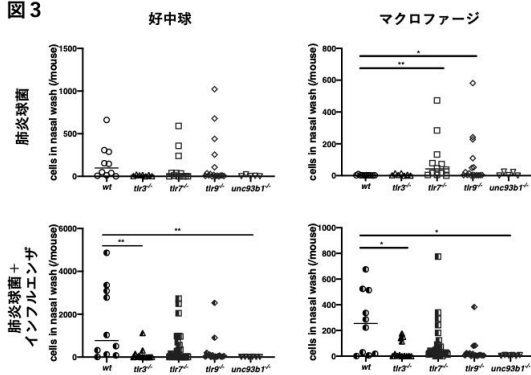
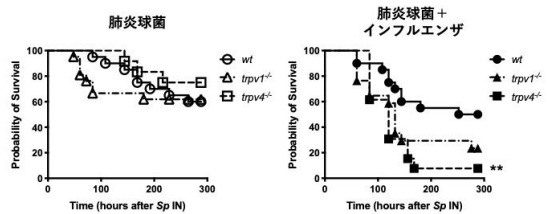


図4



(3) 侵襲性肺炎球菌感染症発症における神経ネットワーク関与の解明

WT、TRPV1 KO、TRPV4 KO による敗血症発症率を評価したところ、肺炎球菌単独感染ではいずれのマウスも同程度の発症率であった。一方で、インフルエンザウイルスとの重感染モデルでは、TRPV4 KO が有意に敗血症の発症率が高かった(図4)。

WT ではインフルエンザウイルス重感染では好中球、マクロファージの鼻腔への遊走が有意に増加したが、TRPV1 KO では好中球、マクロファージの遊走に変化はなく、TRPV4 KO では好中球の遊走に変化を認めなかった(図5)。

WT ではほとんどの個体で、遠隔臓器に肺炎球菌は検出されなかった。一方で、TRPV1 KO、TRPV4 KO では多くの個体で肺、脾臓、大脳からも肺炎球菌が検出された(図6)。

肺炎球菌は上皮細胞間隙に沿って深部組織に侵入し、侵襲性感染症を発症するが、鼻腔における自然免疫および神経ネットワークを介した免疫応答が侵襲性感染症発症を制御していると考えられた。

図5

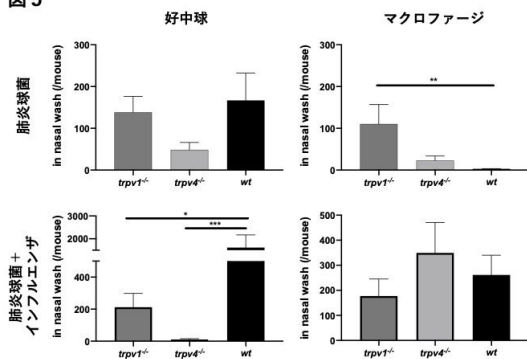
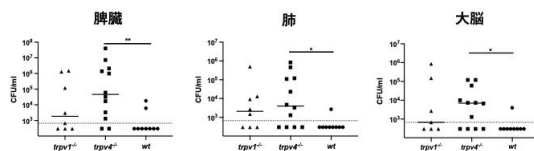


図6



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kono M, Nanushaj D, Sakatani H, Murakami D, Hijiya M, Kinoshita T, Shiga T, Kaneko F, Enomoto K, Sugita G, Miyajima M, Okada Y, Saika S, Hotomi M.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Roles of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and 4 in Pneumococcal Nasal Colonization and Subsequent Development of Invasive Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 732029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.732029.	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 Takeda S, Kono M, Sugita G, Arai J, Briles DE, Hotomi M.	4. 巻 153
2. 論文標題 Pneumococcal capsular phase shift is associated with invasion into cell-to-cell junctions and is inhibited by macrolides.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microb Pathog.	6. 最初と最後の頁 104787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micpath.2021.104787.	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河野正充
2. 発表標題 鼻バリア機構による感染症の重症化制御
3. 学会等名 第3回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河野正充
2. 発表標題 Spontaneous phase shift during the establishment of pneumococcal colonization
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masamitsu Kono, Denisa Nanushaj, Hideki Sakatani, Daichi Murakami, Gen Sugita, Muneki Hotomi
2. 発表標題 The Roles of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and 4 in Pneumococcal Nasal Colonization and Invasive Disease
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 河野正充
2. 発表標題 肺炎球菌の保菌・感染・伝播のメカニズム
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第64回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第69回日本化学療法学会西日本支部総会合同学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nanushaj Denisa, Masamitsu Kono, Hideki Sakatani, Daichi Murakami, Muneki Hotomi
2. 発表標題 Roles of Nucleic Acid Sensing TLRs for Pneumococcal Invasion
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第64回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第69回日本化学療法学会西日本支部総会合同学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野正充
2. 発表標題 感染症研究の新たな展開：肺炎球菌の保菌と感染における感覚受容体の関与
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野正充、村上大地、酒谷英樹、金子富美恵、保富宗城
2. 発表標題 肺炎球菌感染症における自然免疫の核酸認識機構の役割について
3. 学会等名 第122回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野正充、村上大地、酒谷英樹、金子富美恵、保富宗城
2. 発表標題 侵襲性肺炎球菌感染症発症過程におけるエンドソーム局在Toll様受容体の役割について
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会・第69回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野正充
2. 発表標題 侵襲性肺炎球菌感染症発症過程における核酸認識Toll様受容体の役割について
3. 学会等名 第95回日本感染症学会・第69回日本化学療法学会合同学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野正充
2. 発表標題 肺炎球菌感染症における自然免疫の核酸認識機構の役割について
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	杉田 玄 (Sugita Gen) (20407274)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	
研究分担者	武田 早織 (Takeda Saori) (20644090)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	
研究分担者	村上 大地 (Murakami Daichi) (30794218)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	

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