

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790488

研究課題名(和文)マイコプラズマによる新しい炎症誘導機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of novel pathway for inflammatory responses induced by Mycoplasma pneumonia

研究代表者

清水 隆 (Shimizu, Takashi)

山口大学・獣医学部・准教授

研究者番号：40320155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：Mycoplasma pneumoniaeはヒトに肺炎を起こす細菌で、これまでM. pneumoniaeのもとリポпротеインがToll-like Receptor (TLR) 2を介して炎症を誘導すると考えられてきた。しかしながら本研究ではM. pneumoniaeがTLR2非依存的な炎症誘導経路を活性化し、炎症を誘導することを明らかにした。また、その活性化にはTLR4およびオートファジーが関与していることが示唆された。さらにTLR2非依存的な炎症誘導を活性化できない変異体の解析からM. pneumoniaeの接着能が炎症誘導に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Mycoplasma pneumoniae induced pneumonia in human. Lipoproteins of M. pneumoniae and its receptor Toll-like Receptor (TLR) 2 were have been thought to be important to induce inflammation. However, in this study, we demonstrated that M. pneumoniae induced inflammatory responses through TLR2-independent pathway. TLR4 and autophagy played important roles in the induction of TLR2-independent pathway. Moreover, transposon mutagenesis revealed that cytoadherence of M. pneumoniae was important factor for the induction. Overall, these results suggest that cytoadherence of M. pneumoniae induces inflammatory responses through TLR4 and autophagy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：マイコプラズマ イン 細胞接着
マイコプラズマ肺炎 滑走運動
Toll-like Receptor オートファジー 自然免疫 リポプロテ

1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマ肺炎は *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) により惹起される肺炎であり、しばしば中枢神経障害、貧血、肝機能障害などの合併症をとめない、児童、若年成人を中心に発症する。現在までに、*M. pneumoniae* の菌体から肺に病変をもたらす毒素やタンパク質分解酵素のような明らかな病原因子は報告されておらず、宿主の免疫反応を介した炎症や自己抗体の産生が主な病態の原因であると考えられている。しかし、このような宿主の免疫反応を引き起こす菌由来の成分(因子)については、これまで不明であった。

Toll like receptor (TLR) と呼ばれる一連の受容体ファミリーは、細菌の様々な菌体成分を認識し、炎症反応を誘導することが知られている。我々は *M. pneumoniae* が TLR2 を介して炎症反応を誘導することを見出し、炎症を誘導する 3 種類のリポプロテインを分離・同定した。マイコプラズマは細胞壁や外膜を持たないことから、菌体の最外部は細胞膜に覆われており、そこに存在するリポプロテインが TLR2 を介して炎症を誘導すると考えられる。また細胞壁、外膜を欠くことから、NOD1、NOD2 を介して炎症を誘導するペプチドグリカンや TLR4 を介して炎症を誘導する LPS は存在しておらず、TLR5 を介して炎症を誘導する鞭毛もマイコプラズマには存在していない。これらのことからリポプロテインこそがマイコプラズマの炎症を誘導する因子であると考えられてきた。しかしながら非病原性のマイコプラズマにおいてもリポプロテインの存在が知られており、リポプロテイン以外の炎症誘導に重要な因子の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では *M. pneumoniae* のリポプロテインによる TLR2 を介した炎症誘導以外の新規の炎症誘導経路を同定し、そのメカニズムを菌、宿主の双方から詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌株

M. pneumoniae M129 株および GFP 発現株 TK165 株は 10% ウマ血清加 PPL0 培地で培養した。菌量は吸光度(OD595)で調整し、同 OD 値における菌量は菌の DNA を測定することにより確定した。

(2) 細胞と感染

WT、TLR2 KO、TLR4 KO 及び TLR2/4 KO マウスの腹腔マクロファージはチオグリコレート投与し、3 日後に収集した。腹腔マクロファージは無処理または各種阻害剤で 30 分間処理した後、*M. pneumoniae* M129 株、殺菌処理した M129 株、または TK165 株を感染

させ、6 時間後に誘導される炎症性サイトカインをリアルタイム PCR および ELISA で測定した。

(3) マウスモデル

WT、TLR2 KO、TLR4 KO 及び TLR2/4 KO に経鼻的に *M. pneumoniae* を 2 日間連続で 2 回感染させた後、24 時間後に気管洗浄液を得た。気管洗浄液中のサイトカイン量を ELISA で測定した。

(4) トランスポゾンによる変異株の取得

M. pneumoniae にトランスポゾンを含む PISM2062 ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、炎症誘導能に減弱が見られる株を取得した。トランスポゾン挿入部位の周辺部位を PCR で増幅し、シーケンシングすることにより変異遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1) TLR2 に非依存的な炎症誘導

まず、我々は TLR2 がマイコプラズマの炎症誘導に重要な役割を果たしているかどうかを検討するために TLR2 KO マウスの腹腔マクロファージに *M. pneumoniae* を感染させ、TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインの mRNA およびタンパク質の誘導を real-time PCR 及び ELISA で測定した (Fig. 1)。熱処理で不活化した *M. pneumoniae* は TLR2 KO マクロファージで炎症性のサイトカインの誘導が RNA レベル、タンパク質レベルで共に抑制されたが、驚くべきことに生菌では炎症性サイトカインの誘導は TLR2 KO マクロファージにおいてタンパク質レベルで増強した。また生菌の *M. pneumoniae* は TLR2 KO マウスの肺においても炎症性サイトカインを誘導した。これらのことは *M. pneumoniae* による炎症誘導には TLR2 非依存的な経路が存在していることが示唆された。TLR2 KO マクロファージにおける炎症誘導は熱処理、抗生物質処理、過培養、音波処理で不活化した *M. pneumoniae* 感染時には見られなかった。これらのことは TLR2 非依存的な炎症誘導には *M. pneumoniae* の何らかの生体反応が必須であることが明らかとなった。

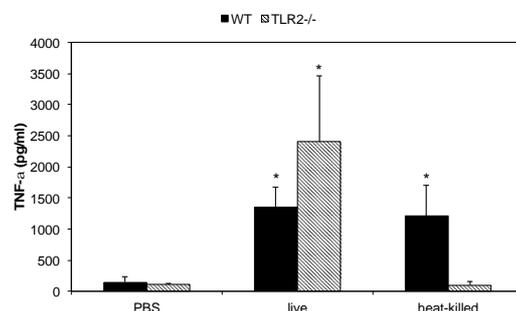


Fig. 1 *M. pneumoniae*によるマウス腹腔マクロファージからのTNF- α の誘導。生菌ではTLR2 KOマウスにおいてもTNF- α が誘導される。

(2) autophagy 依存的な炎症誘導

次に、この TLR2 非依存的な炎症誘導経路を調べるため、inflammasome、EGF Receptor、

protease-activated receptor (PAR)、sphingosine 1-phosphate receptor (S1PR)、autophagy などの炎症誘導に関わるシグナル伝達系の関与を阻害剤および KO マウスを用いて検討した。その結果 autophagy が *M. pneumoniae* による炎症誘導と関与することは明らかとなった (Fig. 2)。autophagy の形成阻害剤である 3-MA を処理した TLR2 KO マクロファージでは生菌の *M. pneumoniae* 感染において炎症性サイトカインの誘導が阻害された。または autophagy とリソソームの融合阻害剤である chloroquine の処理によっても炎症性サイトカインの誘導は阻害された。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により、マクロファージに感染した *M. pneumoniae* は細胞内で autophagy と共存することが明らかとなった。これらのことから TLR2 非依存的な炎症誘導には autophagy により、*M. pneumoniae* が分解されることが必須であることが示唆された。またエンドサイトーシスの阻害剤である cytochalasin D 処理によっても TLR2 非依存的な炎症誘導は阻害された。このことからエンドサイトーシスによって取り込まれた *M. pneumoniae* が autophagy によって分解されることが示唆された。

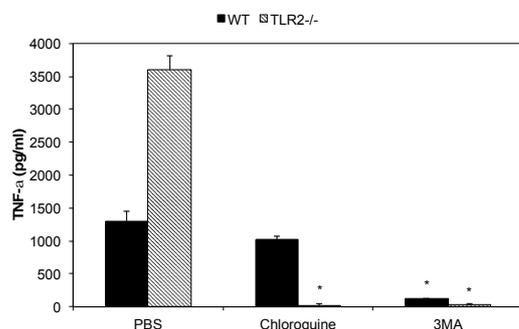


Fig. 2 Autophagy阻害剤による TNF- α の誘導阻害。TLR2非依存的な TNF- α の誘導は Autophagy阻害剤により阻害される。

(3) TLR4、MyD88 依存的な炎症誘導

TLR のシグナルは autophagy の誘導に重要であることが報告されている。そこで TLR4、TLR9、TLR のアダプタータンパク質である MyD88 の各 KO マウス、および TLR2/4 ダブル KO マウスにおける *M. pneumoniae* の炎症誘導能を検討した。その結果、MyD88 KO マウス由来マクロファージでは炎症誘導は完全に抑制されており、何れかの TLR が関与していることが明らかとなった。また、TLR2/4 ダブル KO の肺やマクロファージにおいて、TLR2 KO の肺やマクロファージと比較してそれぞれ炎症誘導が減弱した。このことから TLR2 非依存的な炎症誘導には TLR4 が関与していることが強く示唆された。

(4) MAPK 依存的な炎症誘導

MAP kinase (MAPK) は MyD88 経路の autophagy 誘導に関与していることが報告されている。そこで *M. pneumoniae* による TLR2 非依存的な炎症誘導における MAPK の関与を検討した。EARK、P38、JNK の阻害剤で処理した

TLR2 KO マクロファージにおいて炎症性サイトカインの誘導を検討したところの阻害剤で JNK 阻害剤のみが炎症誘導を阻害した。このことから JNK が援用誘導に重要な MAPK であることが示唆された。

(5) 接着に依存的な炎症誘導

TLR2 非依存的な炎症誘導に重要な菌側の因子を同定するために、*M. pneumoniae* の変異株をトランスポゾンを用いて作製し、TLR2 KO マクロファージにおいて炎症誘導能が減弱する株をスクリーニングした。トランスポゾン挿入領域の周辺をシーケンシングし、変異領域を決定した (Table 1)。その結果 ATP synthase F0F1 subunit ϵ である atpC と hypothetical protein の MPN333 に変異が挿入されていることが明らかとなった。これらの変異株を hemadsorption 解析により細胞接着能を検討した結果、双方の変異株で細胞接着性を欠いていることが明らかとなった。

Table 1. Transposon-inserted genes in *M. pneumoniae* mutants

Strains	Locus tag	Gene name	Inserted position	Function
K2	MPN597	atpC	31	ATP synthase F0F1 subunit ϵ
K3	MPN333	F10_orf750	768	ABC-2 family transporter protein ^a

ABC-2 family transporter protein^a. The N terminal sequence of MPN333 is similar to ABC-2 family transporter protein.

(5) 結語

以上の結果から *M. pneumoniae* はリポプロテインによる TLR2 を介した炎症誘導だけではなく、*M. pneumoniae* の接着が TLR4 及び MAP kinase の JNK 経路で autophagy を誘導し、炎症を誘導していると考えられた。TLR4 のリガンドや autophagy での *M. pneumoniae* の分解後どのような生体反応が TLR2 非依存的な炎症誘導に関与しているのかは現時点では不明であり、今後の課題としたい。

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 5 件)

(1) Shimizu T, Kimura Y, Kida Y, Kuwano K, Tachibana M, Hashino M, Watarai, M. Cytadherence of Mycoplasma pneumoniae Induces Inflammatory Responses through Autophagy and Toll-like Receptor 4. Infect. Immun. 2014 accepted. doi: 10.1128/IAI.01961-14. 査読有。

(2) Uchida K, Nakahira K, Mimura K, Shimizu T, De Seta F, Wakimoto T, Kawai Y, Nomiyama M, Kuwano K, Guaschino S, Yanagihara I. Effects of Ureaplasma parvum lipoprotein multiple-banded antigen on pregnancy outcome in mice.

J Reprod Immunol. 2013 100(2):118-27. doi: 10.1016/j.jri.2013.10.001. 査読有.

(3) Kurokawa K, Ryu KH, Ichikawa R, Masuda A, Kim MS, Lee H, Chae JH, Shimizu T, Saitoh T, Kuwano K, Akira S, Dohmae N, Nakayama H, Lee BL.

Novel bacterial lipoprotein structures conserved in low-GC content gram-positive bacteria are recognized by Toll-like receptor 2.

J. Biol. Chem. 2012 13;287(16):13170-81. doi: 10.1074/jbc.M111.292235. 査読有.

(4) Choi SY, Lim JW, Shimizu T, Kuwano K, Kim JM, Kim H.

Reactive oxygen species mediate Jak2/Stat3 activation and IL-8 expression in pulmonary epithelial cells stimulated with lipid-associated membrane proteins from Mycoplasma pneumoniae.

Inflam. Res. 2012 May;61(5):493-501. doi: 10.1007/s00011-012-0437-7. 査読有.

(5) Tani K, Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Mycoplasma pneumoniae infection induces a neutrophil-derived antimicrobial peptide, cathelin-related antimicrobial peptide. Microbiol. Immunol. 2011 55(8):582-8. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00353.x. 査読有.

〔学会発表〕(計 9件)

(1) 2014年03月26-28日

日本細菌学会

清水 隆、橘 理人、度会雅久

Mycoplasma pneumoniae の細胞接着による TLR4 を介した炎症誘導

タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

(2) 2013年11月30-12月02日

日本新生児未熟児学会

清水 隆

ウレアプラズマ及びマイコプラズマの炎症誘導機構

石川県立音楽堂 (金沢市)

(3) 2013年05月23-24日

日本マイコプラズマ学会

清水 隆、桑野剛一、木田 豊、橘 理人、度会雅久

Mycoplasma pneumoniae による新規炎症誘導機構の解析

秋葉原 UDX (東京都千代田区)

(4) 2013年03月18-20日

日本細菌学会

清水 隆、桑野剛一、木田 豊、橘 理人、度会雅久

Unique Pathway of Inflammatory Responses induced by Mycoplasma pneumoniae

幕張メッセ(千葉市)

(5) 2012年07月15-20日

国際マイコプラズマ学会

清水 隆、木田 豊、桑野剛一、度会雅久

TLR2 Independent Induction of Inflammatory Responses by Mycoplasma pneumoniae

Toulouse Business School (France)

(6) 2012年05月24-25日

日本マイコプラズマ学会

清水 隆、木田 豊、桑野剛一

Mycoplasma pneumoniae の TLR2 非依存的な炎症誘導

岩手県民情報センター (盛岡市)

(7) 2012年03月27-29日

日本細菌学会

清水 隆、木田 豊、桑野剛一

マイコプラズマの炎症誘導因子

長崎ブリックホール (長崎市)

(8) 2011年10月19-21日

アジアマイコプラズマ学会

清水 隆、木田 豊、桑野剛一

接着に依存的なマイコプラズマの炎症

長崎県医師会館 (長崎市)

(9) 2011年09月06-10日

IUMS

清水 隆、木田 豊、桑野剛一

Cytoadherence-dependent Induction of Inflammatory Responses by Mycoplasma pneumoniae

札幌コンベンションセンター (札幌市)

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 隆 (SHIMIZU, Takashi)
山口大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：40320155

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：