

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591175

研究課題名(和文)肺炎マイコプラズマ感染と続発する合併症の発症に関与するTh17細胞の働き

研究課題名(英文) Role of Th17 cells in pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae infection and onset of its complications

研究代表者

蔵田 訓 (KURATA, Satoshi)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：00383670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイコプラズマ肺炎および続発する合併症の発症機構には、宿主免疫応答の関与が考えられている。今回我々はマウスに肺炎マイコプラズマ抗原を感作した実験的肺炎モデルおよび、マウスリンパ球を用いた実験系を用いてその宿主免疫応答について検討した。その結果、肺炎マイコプラズマ抗原感作はマウス肺内IL-17A mRNAおよびIL-10 mRNAの発現を上昇させた。また、肺炎マイコプラズマ抗原はマウスリンパ球の増殖を誘導し、IL-6およびTGF- β 1存在下において、その濃度依存的にIL17AおよびIL-10の産生を増加させた。肺炎マイコプラズマ抗原感作がTh17免疫応答を誘導、増幅する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mycoplasma pneumoniae is a common respiratory pathogen, and the participation of the excessive host immunoresponse is thought to be involved in M. pneumoniae pneumonia and the pathogenic mechanisms of the complications. Recent studies indicate that Th17 cell has been implicated in the onset of autoimmune diseases. In this report, we established an experimental pneumonia mouse model by the use of M. pneumoniae antigens and performed immunological analyses to examine the induction mechanisms. In addition, we have examined the specificity of Th 17 cell inducibility by mouse splenocytes. These analyses indicated that mRNA expression levels of IL-17A and IL-10 in the lung were increased by M. pneumoniae antigens sensitization in vivo. It was also shown that M. pneumoniae antigens induced IL-17A release from mouse splenocytes in a dose-dependent manner in vitro. These results suggest that murine Th17 response is initiated by M. pneumoniae antigen sensitization.

研究分野：感染症学

キーワード：肺炎マイコプラズマ 実験的肺炎モデル Th17

1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマは自己増殖可能な最小の微生物で、このうち *M. pneumoniae* は学童から青年年齢層に好発する市中肺炎の起病菌である。細胞壁を保有しないことから感染症治療に常用されている β -ラクタム系抗菌薬が無効である。CARDs 毒素や過酸化水素の産生など病原因子の存在についての報告はなされているが、本菌の生体へ及ぼす直接的作用は強いものではなく、マイコプラズマ肺炎および続発する多彩な肺外合併症の発症機序には宿主の免疫応答に伴う間接的な組織障害作用が深く関与していると報告されている。

2. 研究の目的

ヘルパーTリンパ球として、これまで細胞性免疫を担う Th1 細胞と、液性免疫を担う Th2 細胞が知られていたが、近年、従来の Th1、Th2 とは異なる新たな T 細胞サブセットとして IL-17 を多量に産生する Th17 細胞が発見されている。この Th17 細胞はコラーゲン誘導性関節炎など様々な自己免疫疾患において中心的な役割を果たしているとの報告がなされている。更に、エフェクター T 細胞の働きを抑制する制御性 T 細胞としては、古くから知られている CD4⁺CD25⁺T 細胞に加え、末梢で分化する Th3 細胞、Tr1 細胞の分化や機能についての研究も進められており、マイコプラズマ肺炎および合併症の病態形成にはこれまで唱えられてきた Th1、Th2 以外の T 細胞サブセットの関与も考えられる。

そこで今回我々は、SPF マウスを用いた実験的マイコプラズマ肺炎モデルに加え、マウス脾臓由来リンパ球を *M. pneumoniae* 可溶性菌体抗原で刺激した実験系を用いて *M. pneumoniae* 抗原刺激に対する Th17 免疫応答について検討した。

3. 研究の方法

実験動物として BALB/c 系 SPF マウスを使用し、*M. pneumoniae* M129 株を超音波破碎した菌体抗原を 7 日間隔で 5 回、麻酔下にて経鼻吸入させた (1mg protein/kg/5 回): [1mg × 5]。また、菌体抗原の蛋白濃度を変えて (0.1mg protein/kg、5 回目のみ 1mg protein/kg) 経鼻吸入を行った群 [0.1mg × 4 and 1mg × 1]、および 28 日間隔で 2 回 (1mg protein/kg/回) のみ経鼻吸入させた群 [1mg × 2] も同様に作成した。対照群には生理食塩水の経鼻吸入を 5 週連続して行った。

最終吸入の翌日に解析を行った。病理組織学的解析として、右肺中葉、下葉のヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製、観察することで、抗原感作条件の変化が肺の炎症に及ぼす影響について検討した。また、免疫学的解析として、右肺上葉から抽出した RNA を対象として、肺内サイトカイン mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。

in vitro の実験系には BALB/c 系 SPF マウスのリンパ球を使用した。マウス脾臓よりリンパ球を密度勾配法にて分離し、IL-6、TGF-1 の存在下、および非存在下にて *M. pneumoniae* 菌体抗原刺激を加えて培養を行い、培養上清中に産生された IL-17A および IL-10 の定量を ELISA 法にて行った。またミトコンドリア内酵素活性を指標として、生存リンパ球数を算定した。抗原として *M. pneumoniae* M129 株の超音波破碎可溶性菌体抗原をそれぞれ 1、5、10、50 μ g protein/ml の割合で、また *Escherichia coli* 由来 lipopolysaccharide (LPS) および *Saccharomyces cerevisiae* 由来 zymosan A をそれぞれ 1、5、10、50 μ g/ml の割合で添加した。

4. 研究成果

マウスの肺病理像については、*M. pneumoniae* 抗原 [1mg × 5] 感作を行った群で、好中球に加えて、マクロファージを含む多数の炎症細胞の浸潤が認められた。また気管支壁の肥厚も観察され強い炎症像を呈した。[0.1mg × 4 and 1mg × 1] 感作を行った群では多数の好中球の浸潤が観察されたが、[1mg × 5] 感作を行った群と比較して、炎症の程度は穏やかであった。[1mg × 2] 感作を行った群でも好中球の浸潤を中心とする炎症像が観察されたが、気管支の部位により、炎症の程度が異なっており、局所的に強い炎症反応が起っていた。マウスの肺内 IL-17A mRNA については *M. pneumoniae* 抗原を反復感作した群で対照群と比較して上昇が観察され、特に [1mg × 5] 感作を行った群でより高い傾向が認められた。

M. pneumoniae 抗原の頻回の感作がマウスの肺内 IL-17A mRNA 発現を上昇させ、更に高濃度の抗原を感作した場合に肺内 IL-17A mRNA 発現が上昇する傾向が観察された。また、マウスの肺内 IL-10 mRNA についても、IL-17A mRNA と同様に、*M. pneumoniae* 感作回数が増加および、抗原濃度が高い群で高値を示す傾向が観察された。

マウスリンパ球に *M. pneumoniae* 抗原を 50 μ g protein/ml の割合で添加し、IL-6 および TGF-1 存在下で培養したところ、培養上清中の IL-17A および IL-10 の産生の増加が観察された。*M. pneumoniae* 抗原の濃度を変えて (1、5、10、50 μ g protein/ml) 添加し、培養 4 日目にマウスリンパ球数の算定および上清の IL-17A、IL-10 測定を行ったところ、*M. pneumoniae* 抗原の刺激により、脾臓由来リンパ球の増殖が促進され、さらに IL-6、TGF-1 存在下では *M. pneumoniae* 抗原濃度に依存した IL-17A および IL-10 産生の増加が認められた。

また LPS については、IL-6 および TGF-1 非存在下では高濃度の刺激によってもリンパ球の増殖を抑制しなかったが、IL-6 および TGF-1 存在下では増殖を抑制する傾向が観

察された。また IL-17A および IL-10 産生量も *M. pneumoniae* 抗原を用いた場合と比較して低値を示した。

一方、zymosan による刺激は IL-6、TGF- β 1 存在下および非存在下においても *M. pneumoniae* 抗原による刺激と同様にリンパ球数を増加させる傾向が観察された。また *M. pneumoniae* 抗原刺激と比較して少ない産生量ではあるものの、抗原濃度に依存した IL-10 産生量の増加傾向が観察された。しかしながら抗原濃度やリンパ球数の増加に依存した IL-17A 産生の増加傾向は認められなかった。

(結論)

M. pneumoniae 抗原感作はマウスの肺に強い炎症を引き起こす事が示された。頻回の抗原感作がマウス肺内 IL-17A mRNA の上昇を引き起こし、更に抗原濃度に依存して肺内 IL-17A mRNA 発現を上昇させる傾向が認められた。頻回かつ高濃度の *M. pneumoniae* 抗原感作が Th17 偏位を誘導する可能性が示唆された。

また、肺内 IL-17A mRNA 発現の上昇に伴ない IL-10 mRNA の上昇傾向が観察されたことから、*M. pneumoniae* 抗原により誘導される Th17 細胞分化の抑制には、IL-10 を産生する制御性 T 細胞である Tr1 細胞の関与が考えられた。

M. pneumoniae 抗原刺激はマウス脾臓由来リンパ球の増殖を促進するとともに、IL-6、TGF- β 1 存在下においてはその抗原濃度に依存して IL-17A および IL-10 産生を増加させたことから、高濃度の *M. pneumoniae* 抗原が Th17 および Tr1 細胞の増殖に関与する可能性が、*in vitro* の系からも示された。

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 11 件)

Kurata S, Nakashima T, Osaki T, Uematsu N, Shibamori M, Sakurai K, Kamiya S : Rebamipide protects small intestinal mucosal injuries caused by indomethacin by modulating intestinal microbiota and the gene expression in intestinal mucosa in a rat model. J Clin Biochem Nutr 56, 20-27, 2015. 査読あり doi: 10.3164/jcbn.14-67.

Kurata S, Osaki T, Yonezawa H, Arae K, Taguchi H, Kamiya S : Role of IL-17A and IL-10 in the antigen induced inflammation model by *Mycoplasma pneumoniae*. BMC Microbiol. 14 : 156, 2014. 査読あり doi: 10.1186/1471-2180-14-156.

神谷 茂、蔵田 訓、田口晴彦：医学領域における肺炎マイコプラズマ感染症の基礎と臨床．家畜診療 (Journal of Livestock

Medicine) P331-338、61 巻 6 号 2014 年

{ 学会発表 } (計 40 件)

蔵田 訓，大崎敬子，米澤英雄，花輪智子，田口晴彦，神谷 茂：マウス脾臓細胞を用いた肺炎マイコプラズマ菌体抗原による喘息関連ケモカインの誘導．第 88 回日本細菌学会総会，岐阜，2015 年平成 27 年 03 月 26-28 日．

蔵田 訓，大崎敬子，米澤英雄，花輪智子，田口晴彦，神谷 茂：Mycoplasma pneumoniae 菌体抗原感作が T 細胞サブセットに及ぼす影響．第 48 回日本無菌生物学会総会，広島，2015 (H27) .01.30-31．

Kurata S, Osaki T, Nakashima T, Uematsu N, Shibamori M, Sakurai K, Kamiya S: Effect of rebamipide on indomethacin-induced small intestinal injury physiological role of intestinal microbiota. The Joint Meeting The XVIII International Symposium on Gnotobiology (XVIII-ISG) III International Ecologic Forum "Environment and human health". St-Petersburg, Russian Federation September 21-24, 2014.

Kamiya S, Kurata S, Arae K, Taguchi H: Virulence factors and pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Joint Conference of The 6th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology (AOM) & The 7th Meeting of the Chinese Society for Mycoplasmaology (CSM) August 22-25, 2014 Zhangjiajie, Hunan, China.

Taguchi H, Arae K, Kurata S, Kamiya S: *Mycoplasma pneumoniae* antigens induce IL-8 production via epidermal growth factor receptor pathway. Joint Conference of The 6th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology & The 7th Meeting of the Chinese Society for Mycoplasmaology (CSM) August 22-25, 2014 Zhangjiajie, Hunan, China.

Kurata S, Arae K, Taguchi H, Kamiya S: *In vitro* and *in vivo* analyses of Th17 response stimulated by *Mycoplasma pneumoniae* antigens. Joint Conference of The 6th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology (AOM) & The 7th Meeting of the Chinese Society for Mycoplasmaology (CSM) August 22 - 25, 2014. Zhangjiajie, Hunan, China.

蔵田 訓，大崎敬子，神谷 茂：Rebamipide は小腸細菌叢に作用し、NSAIDs 誘導小腸潰瘍を予防する．第 88 回日本感染

症学会総会 ,福岡 ,平成 26 年 6 月 18-20 日 .

蔵田 訓 ,大崎敬子 ,神谷 茂 : Effect of rebamipide on indomethacin induced intestinal injury - role of intestinal microbiota インドメタシン誘導小腸潰瘍へのレバミピドの効果 - 腸内細菌叢との関連性 . 第 87 回日本細菌学会総会 ,東京 ,平成 26 年 3 月 26-28 日 .

蔵田 訓 ,大崎敬子 ,田口晴彦 ,神谷 茂 : *Mycoplasma pneumoniae* 抗原感作が CD4⁺CD62L⁺T 細胞分化に及ぼす影響 . 第 87 回日本感染症学会学術講演会・第 61 回日本化学療法学会総会 合同学会 ,横浜 ,平成 25 年 6 月 5-6 日 .

蔵田 訓 ,大崎敬子 ,米澤英雄 ,花輪智子 ,Cynthia Zaman ,新江賢 ,田口晴彦 ,神谷 茂 : CD4⁺CD62L⁺T 細胞分化に及ぼす *Mycoplasma pneumoniae* 抗原感作の影響 . 第 86 回日本細菌学会総会 ,千葉 ,平成 25 年 3 月 18-20 日 .

蔵田 訓 ,大崎敬子 ,田口晴彦 ,神谷 茂 : *Mycoplasma pneumoniae* 菌体抗原を用いた Th17 免疫応答についての解析 . 第 86 回日本感染症学会総会 ,長崎 ,平成 24 年 4 月 25-26 日 .

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

蔵田 訓 (KURATA Satoshi)

杏林大学医学部 助教

研究者番号 : 00383670

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

神谷 茂 (KAMIYA Shigeru)

杏林大学医学部 教授

研究者番号 : 10177587

田口 晴彦 (TAGUCHI Haruhiko)

杏林大学保健学部 教授

研究者番号 : 20146541