

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593149

研究課題名(和文) インフルエンザ重症化における誤嚥性肺炎の作用機序の解明とその予防法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the functional mechanism underlying aspiration pneumonia in lethal influenza and its prevention

研究代表者

関根 伸一 (Sekine, Shinichi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70506344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎の原因菌である肺炎球菌の感染防御法を探索した。肺炎球菌の莢膜タンパクであるrPspAを抗原に、プラスミドRANTESをマウス(C57BL/6)に舌下から投与したところ、抗原特異的な抗体価の誘導が血液、鼻腔洗浄液及び肺洗浄液で認められた。また脾臓、鼻腔粘膜などでは抗原特異的な抗体産生細胞の増加も認められた。免疫されたマウスに対して肺炎球菌(50%致死量)を投与したところ、そのどれも生存した。リンパ組織のFACS像から、PGLNにおいてCCR5+樹上細胞が有意に増加しており、これらの免疫反応に重要な役割を果たしていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Sublingual (SL) antigen delivery is a non-invasive method-as opposed to invasive ones such as nasal or oral immunization-that avoids possible entry into the olfactory region and the central nervous system, and prevents the need for degradative enzymes that lower the stomach pH. In this study, we showed that SL delivery of pneumococcal surface protein A (PspA) and a cDNA vector expressing RANTES (pCCL5) in mice resulted in increased levels of PspA-specific SIgA antibody (Ab) responses in external secretions, and significantly lowered bacterial density in the lung, nasal washes, and blood. Additionally, SL delivery of pCCL5 cDNA as a mucosal adjuvant significantly increased the number of CCR5+ dendritic cells (DCs) in the periglandular lymph nodes (PGLNs), but not in cervical lymph nodes. These results showed that SL immunization activates CCR5+ SL DCs, which facilitate the induction of PspA-specific SIgA Ab responses and reduce pneumococcal infection.

研究分野：予防歯科学

キーワード：肺炎球菌 r PspA 舌下免疫

1. 研究開始当初の背景

肺炎は年間 8 万人以上の命を奪っており、70 才以上の高齢者に限ると直接の死因で上位を占める感染症である。起因菌として肺炎球菌、マイコプラズマ、口腔細菌フローラなどが知られている。この肺炎の発生機序において、不顕性誤嚥(silent aspiration)が大きな役割を果たすことが報告されている。実際、入院肺炎の約 7 割が誤嚥性肺炎であること、その予防に「口腔ケア」が有効であること、歯周病原性細菌を中心としたデンタルプラーク細菌の混合感染が多いことが報告されている。申請者のグループは、主要な歯周病原性細菌の一つである *P. gingivalis*(Amano A *et al.*, J Dent Res, 1997)や *F. nucleatum*(Sekine S *et al.*, Microbiology, 2004)の定着機構が口腔内における病的バイオフィルム成熟の一因となること、また口腔内バイオフィルムの構成員である *F. nucleatum*(Nakagaki H, Sekine S *et al.*, Infect Immun., 2010)および市中肺炎の起因菌である肺炎球菌(Kataoka K, Sekine S *et al.*, Infect Immun., 2011)に対するワクチンの効果について報告している。

2009 年に発生した新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)は季節性化への道をたどったが、人間にとってより重症と考えられる H5N1 のような高病原性ウイルス感染であれば死亡率は 60%前後となり大惨禍を招いたと推察される。スペインかぜの流行時においてもその死亡の多くは二次性細菌性肺炎が原因とされている。マウスを用いた感染実験において、インフルエンザウイルスを接種したあとに肺炎球菌を感染させた場合、各々の単独感染群と比較してきわめて重篤化することが確認されている。これら重症化マウスにおいて、有意な生存率の低下、肺胞出血を伴う病理学的変化、サイトカインや Toll-like receptors の強

い発現がみられた。免疫機構の過剰もしくは破綻がインフルエンザウイルスの重複感染によって惹起されたといえるが、この特徴をより解析することで過剰な免疫反応の抑制を誘導することが可能となる。申請者のグループは、抗原特異的な免疫寛容の誘導とその作用機序(Suzuki H, Sekine S, *et al.*, Gastroenterology 2008)について報告を行っている。

2. 研究の目的

わが国において、死亡原因疾患の第 4 位である肺炎は 65 才を超える高齢者の罹患率が高い。「高齢者肺炎」の多くは反復する微量誤嚥が原因とされている。その特徴から対策には、肺炎を治療するだけでなく予防することが重要である。一方、2009 年に新型インフルエンザのパンデミックが現実のものとなった。通常の季節性インフルエンザも高齢者や基礎疾患を有する患者にとって極めて重要な疾患であるが、インフルエンザそのものによる死亡は少なく肺炎を中心とした合併症によるものが主である。本研究ではインフルエンザ重症化における誤嚥性肺炎の作用機序を解明し、その予防法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではインフルエンザ重症化における誤嚥性肺炎の作用機序の解明とその予防法を開発を目的とする。混合感染を特徴とする誤嚥性肺炎のモデルを作成するために、歯周病原性菌と各種肺炎起因菌を共に投与する。また病原性が異なるインフルエンザウイルスを複数の誤嚥性肺炎モデルに感染させる。インフルエンザ重症化群の宿主にみられる、特定の遺伝子およびタンパク質の変化を解析し、重症化に強く関与する因子の同定を試み

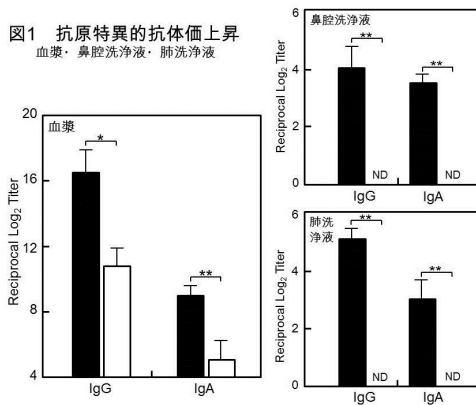
る。得られた因子を重症化マーカーと捉えることが出来た場合、開発した予防法の効果を判定することも可能である。インフルエンザ重症化を予防する免疫誘導の効果は、主に「致死率」と「体重減少の改善」で評価する。また「病理組織検査」および「肺組織中における肺炎起因菌のCFU」などで確認を取る。

4. 研究成果

1) 抗原特異的抗体価上昇

抗原に肺炎球菌の rPspA、アジュバントに pRANTES(コントロールは pORF)を用いて舌下免疫を C57BL/6 マウスに対して1週間毎に4回行ったところ、血漿、鼻腔洗浄液、肺洗浄液中の抗原特異的抗体価の上昇を確認することが出来た(図1)。

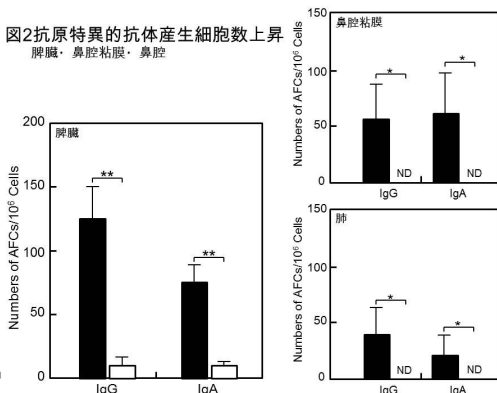
図1 抗原特異的抗体価上昇
血漿・鼻腔洗浄液・肺洗浄液



2) 抗原特異的抗体産生細胞数上昇

抗原に肺炎球菌の rPspA、アジュバントに pRANTES(コントロールは pORF)を用いて舌下免疫を C57BL/6 マウスに対して1週間毎に4回行ったところ、脾臓、鼻腔粘膜、肺の抗原特異的抗体産生細胞数の上昇を確認することが出来た(図2)。

図2 抗原特異的抗体産生細胞数上昇
脾臓・鼻腔粘膜・鼻腔



3) CCR5+樹上細胞数の上昇

抗原に肺炎球菌の rPspA、アジュバントに pRANTES(コントロールは pORF)を用いて舌下免疫を C57BL/6 マウスに対して1週間毎に4回行った1週間後、脾臓、NALT、肺、鼻腔粘膜、CLN、PGLNの単核球細胞に対してFACS解析を行ったところ、PGLNにおいてCCR5+樹上細胞の増加が確認できた。

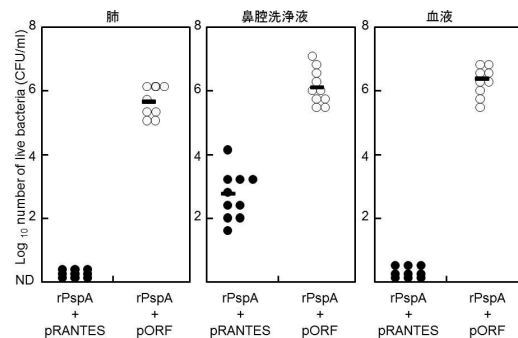
表 CCR5+樹上細胞割合

Tissue Source	Sublingual Adjuvant	% of Total Lymphocyte CD11c ⁺	% of CD11c ⁺ DCs		
			CD8 ⁺	CD11b ⁺	B220 ⁺
CLNs	pORF	0.7 (±0.2)	21.1 (±3.6)	24.3 (±2.1)	21.1 (±3.6)
	pCCL5	1.4 (±0.1) *	27.2 (±5.5) *	22.1 (±1.4)	27.2 (±5.5) *
PGLNs	pORF	1.2 (±0.1)	12.8 (±0.5)	33.7 (±1.9)	41.6 (±2.2)
	pCCL5	3.8 (±0.1) **	24.0 (±1.0) *	63.5 (±0.9) **	45.3 (±3.5)

4) 肺炎球菌感染防御

抗原に肺炎球菌の rPspA、アジュバントに pRANTES(コントロールは pORF)を用いて舌下免疫を1週間毎に4回行った1週間後、肺炎球菌 WU 2株 (1.8x10⁷ CFU/20μL) を経鼻で C57BL/6 マウスに投与した。48時間後に肺、鼻腔洗浄液、肺を用いてCFUアッセイを行った。rPspA + pRANTES 投与群はコントロール群と比較して著しく肺炎球菌のCFU数を抑制することが出来た。

図3 肺炎球菌感染実験



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 2 件)

1 Fukuyama Y, Tokuhara D, Sekine S, Aso K, Kataoka K, Davydova J, Yamamoto M, Gilbert RS, Tokuhara Y, Fujihashi K, Kunisawa J, Yuki Y, Kiyono H, McGhee JR,

Fujihashi K: Potential roles of CCR5(+) CCR6(+) dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses. PLoS One, 8:e60453. 2013.

2 Kosaka T, Kokubo Y, Ono T*, Sekine S, Kida M, Kikui M, Yamamoto M, Watanabe M, Amano A, Maeda Y, Miyamoto Y : Salivary inflammatory cytokines may be novel markers of carotid atherosclerosis in a Japanese general population: The Suita Study. Atherosclerosis, 237:123-128, 2014.

〔学会発表〕(計 8 件)

1 関根伸一、橋野恵衣、永田英樹、天野敦雄 : 歯肉由来 iPS 細胞を利用した樹状細胞は抗原特異的な抗体産生を誘導する 第 61 回 日本口腔衛生学会、2012 年 5 月 27 日、神奈川

2 S Sekine, K Aso, D Tokuhara, Y Fukuyama, K Fujihashi and K Fujihashi : Novel Sublingual Inductive And Effector Tissues For Antigen-Specific IgA Antibody Responses 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5 日、兵庫

3 Sekine S, Aso K, Fukuyama Y, Fujihashi K, Piao Z, Akeda Y, Oishi T, Briles DE, McGhee JR, Amano A, Fujihashi K: Sublingual plasmid cDNA expressing RANTES induces CCR5-positive dendritic cells for the induction of pneumococcal specific SIgA antibody responses. 16th International Congress of Mucosal Immunology, 2013/7/19, Vancouver.

4 関根伸一、橋野恵衣、久保庭雅恵、永田英樹、天野敦雄 : 小型印刷電極を用いた *P. gingivalis* II 型線毛株検出システムの臨床応用 第 62 回口腔衛生学会、2013 年 5 月 17 日、松本

5 泉井秀介、関根伸一、前田和彦、永田英樹、天野敦雄 : クルクミンが歯周病菌の増殖

とプロテアーゼ活性に及ぼす影響 第 24 回 口腔衛生学会近畿地方会 2013 年 10 月 6 日、岡山市

5 Kosaka T, Kokubo Y, Ono T, Sekine S, Kida M, Kikui M, Yamamoto M, Watanabe M, Amano A, Maeda Y, Miyamoto Y: Tumor necrosis factor α in saliva may be a novel marker of carotid atherosclerosis: The Suita Study, European Stroke Conference, 2014/5/8, Nice, France.

6 Izui S, Sekine S, Nagata H, Amano A : Inhibitory effect of curcumin on *Porphyromonas gingivalis* infection 11th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2014/9/18, Beijing, China.

7 泉井秀介、関根伸一、高田明比古、前田和彦、久保庭雅恵、永田英樹、天野敦雄 クルクミンが歯周病菌の生育およびバイオフィルム形成に及ぼす影響 第 63 回口腔衛生学会、2014 年 5 月 30 日、熊本

8 Izui S, Sekine S, Nagata H, Amano A Inhibitory effects of curcumin on inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles 第 62 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会、2014 年 12 月 5 日、大阪

〔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：
出願年月日：
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

関根 伸一 (SEKINE SHINICHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70506344

(2) 研究分担者

永田 英樹 (NAGATA HIDEKI)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：50260641

久保庭 雅恵 (KUBONIWA MASAE)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00303983

前田 和彦 (MAEDA KAZUHIKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00346165

(3) 連携研究者

浅沼 秀樹 (ASANUMA HIDEKI)

国立感染研究所・インフルエンザウイルス研
究センター・研究員

研究者番号：40333570