

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791024

研究課題名(和文)肺炎病巣の形成過程および肺炎球菌ワクチン効果のライブイメージングによる解明

研究課題名(英文)Live-imaging of Pneumococci and immune-cells in lung.

研究代表者

荻野 英賢 (OGINO, Hidetaka)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80589325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌による感染症は我が国の死亡率第3位の「肺炎」の原因であるとともに、小児が多く罹患し重篤な後遺症が残る「細菌性髄膜炎」の原因でもある。

肺炎球菌の感染機構に関する研究は、培養免疫細胞の肺炎球菌に対する応答や肺炎球菌変異株を用いたマウス個体への感染実験などが報告されているが、生体内での複数の免疫細胞による複雑な相互作用は明らかにされていなかった。

本研究は、すでに構築している生体内の免疫細胞の動的挙動を観察するシステムを利用し、『生きているマウスの肺内部における肺炎球菌感染巣の形成過程および免疫細胞の挙動』を明らかにし、肺炎球菌ワクチンの効果をライブイメージングした。

研究成果の概要(英文)：Pneumonia is the leading cause of death in children worldwide.

In the causing agent of pneumonia, *Streptococcus pneumoniae* is the major pathogenic bacterium. Pneumonia caused by bacteria can be treated with antibiotics. However antibiotic-resistant *S. pneumoniae* is appeared recently, and the antibiotic treatment is becoming difficult. For preventive measures to pneumonia, the vaccination is important.

In this study, we tried to uncover the nature of pneumococci and immune-cells at lung in living body with or without pneumococcal-vaccine. For live imaging at lung, we developed the brighter fluorescent pneumococci. The fluorescent pneumococci were colonized at pulmonary alveoli, and some were flown in the blood vessel. The fluorescent immune-cells is going to be injection into the pneumococci infected mouse, and the phagocytosis of pneumococci by immune-cells is going to be observed. In future, the effect of vaccination to the immunological response will be uncovered.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は通性嫌気性のグラム陽性双球菌で、市中肺炎の主な原因菌として知られている。肺炎球菌は様々な病原性因子(溶血毒、IgA 分解酵素など)を持ち、特に莢膜による宿主免疫細胞(貪食細胞)からの回避および補体が形成する膜侵襲複合体からの防御が、病原性発揮に重要である。莢膜は単純構造のため抗原性が弱く濾胞 B 細胞による T 細胞依存性の抗体生産が行なわれず、親和性の高い IgG 抗体産生 B 細胞が発現しない。代わりに、漿膜腔に局在する B1 細胞や脾臓辺縁帯 B 細胞による T 細胞非依存性の抗体生産が行なわれ、親和性の低い IgM 抗体による応急的な免疫防御機構を誘導する。IgM 抗体が肺炎球菌莢膜に結合すると、補体系および細胞性免疫を賦活化して肺炎球菌を駆除することができるが、本抗体産生機構においてはメモリー B 細胞が作られないために長期の「免疫記憶」が起こらず、肺炎球菌による再感染の危険を常にはらんでいる。さらに、肺炎球菌の莢膜は判明しているだけでも 90 種類以上に及ぶため、一度肺炎球菌感染を起こしても、異なる血清型のものに感染する可能性がある。

このように肺炎球菌は巧みな免疫回避機構により感染を成立させるため、免疫機能の衰えた高齢者や免疫機能が未発達な乳幼児においては特に危険な細菌である。さらに近年、第一選択薬として用いられる β -lactam 系の抗生物質に耐性の肺炎球菌が報告されており、治療が難しくなっている。現在、易感染者における効果的な感染予防のために、肺炎球菌の莢膜多糖を主成分とするワクチンおよび莢膜多糖にアジュバントを付加したワクチンが開発されている。これらワクチンは海外での効果的な肺炎球菌感染予防実績を有し、我が国においても数年前に認可され、ワクチン接種が広まりつつある。

肺炎球菌の感染機構に関する研究は、培養

免疫細胞の肺炎球菌に対する応答や肺炎球菌変異株を用いたマウス個体への感染実験などが報告されている。これらの研究成果により、肺炎球菌と免疫系との攻防が明らかにされつつあるが、実際の生体内での動的挙動の理解は、その実験手技の難しさから進んでいない。申請者の研究グループは、すでに生体内における免疫細胞の動的挙動を観察するシステムを構築しており、肺炎球菌感染巣形成過程の解析においても速やかに応用できる¹⁾。本研究では世界で初めてとなる『生きているマウスの肺内部における肺炎球菌感染巣の形成過程および免疫細胞の挙動』を明らかにする。これにより培養細胞を用いた実験では見えなかった、複数の免疫細胞による複雑な相互作用をリアルタイムに解析することが可能となる。

1) Hasegawa A et al., *J Allergy Clin Immunol.* 125(2):461-468. 2010

2. 研究の目的

- (1) マウス生体内における肺炎球菌のコロニー形成過程や局在変化を経時的に解析し、病巣の形成過程を明らかにする。
- (2) 免疫細胞が肺炎球菌を認識し浸潤および貪食する過程を経時的に解析し、莢膜を持つ細菌に対する生体内での免疫機序を細胞レベルで明らかにする。
- (3) 肺炎球菌ワクチン投与後の免疫細胞の挙動変化および肺炎球菌の生存率や局在変化を解析しワクチンがもたらす効果について評価する。

3. 研究の方法

本研究は大きく分けて可視化モニタリング系の構築および細胞動態解析から成る。

可視化モニタリング系の構築：

- (1) 肺炎球菌染色体上への赤色蛍光タン

パク質遺伝子導入による肺炎球菌可視化。

- (2) GFP 遺伝子を導入した免疫細胞のマウスへの移入条件および観察至適条件の検討。
- (3) マウスへの肺炎球菌感染条件の検討。
細胞動態解析：
 - (1) 肺炎球菌のマウス生体内（肺）でのコロニー形成過程や局在部位の解析。
 - (2) 免疫細胞の肺炎球菌に対する挙動の解析。
 - (3) 肺炎球菌ワクチン投与後の肺炎球菌および免疫細胞の動態変化の解析。

4. 研究成果

可視化モニタリング系の構築；

当初課題であった共焦点顕微鏡観察に耐える蛍光強度を持つ肺炎球菌の作製も、肺炎球菌ゲノムを基にしたランダムスクリーニングによって強度な発現をしているプロモーターを複数取得することができたため、順調に目的を達成することができた。

免疫細胞の分離取得および移入条件の検討も、T 細胞を初めとして好中球などの免疫細胞に関して実験を行ない良好な結果を得た。マウスへの肺炎球菌感染条件の検討を行ない、文献値よりやや量を必要とするが適切に肺炎を誘発することができる条件を得ることができた。

細胞動態解析；

経鼻投与した蛍光肺炎球菌が感染巣を形成する様子が観察された。また貪食されたような球状の細菌塊が観察された。

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 1 件)

- 1) Hasegawa A, Iwamura C, Kitajima M,

Hashimoto K, Otsuyama K, Ogino H, Nakayama T and Shirai M.

Crucial role for CD69 in the pathogenesis of dextran sulphate sodium-induced colitis.

PLoS ONE. 査読有り 2013 8 巻 e65494
10.1371/journal.pone.0065494

[学会発表](計 3 件)

- 1) 長谷川 明洋、荻野 英賢、大津山 賢一郎、中山 俊憲
アレルギー性炎症反応におけるリンパ球浸潤に関与する分子の探索
第 22 回 日本バイオイメージング学会
学術集会 2013 年 9 月 15 日-2013 年 9 月 16 日 東京大学(東京)
- 2) 荻野 英賢、長谷川 明洋、大津山 賢一郎、白井 睦訓
肺炎球菌高発現プロモーターの探索
第 66 回 日本細菌学会中国・四国支部
総会 2013 年 10 月 12 日-2013 年 10 月 13 日 広島国際大学呉キャンパス(呉)
- 3) 長谷川 明洋、荻野 英賢、大津山 賢一郎、中山 俊憲、白井 睦訓
腸炎の誘導における CD69 の役割
第 87 回 日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26 日-2014 年 3 月 28 日 タワーホール船堀(東京)

[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〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

荻野 英賢 (OGINO, Hidetaka)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80589325

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし