

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890111

研究課題名（和文） 免疫機能を賦活する細菌由来 RNA の探索

研究課題名（英文） Investigation of MicroRNA fragments derived from Streptococci

研究代表者

小川 泰治 (OGAWA TAIJI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10543481

研究成果の概要（和文）：はじめに、予備実験で得たレンサ球菌 non-coding RNA (ncRNA) クローン導入細胞では TGF- $\beta$ 1 の転写が減少した。さらに、ncRNA クローンの導入細胞に対する肺炎球菌ならびにレンサ球菌の細胞付着能を解析した結果、細胞付着能の亢進を認めた。次に、ncRNA クローン導入による Th17 免疫応答の解析を行ったところ、マウス MIP の産生が増加した。本研究から得られた結果は、肺炎球菌のみならず、種々の感染症を引き起こす数多くの病原性細菌の感染制御に幅広く応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs are single-stranded RNAs that regulate gene expression by forming imperfect base pairs, which have also been speculated to play regulatory roles in gene expression of *Streptococcus pyogenes* itself. We hypothesized that bacterial microRNAs cause molecular interference in host, when there is high homology to human microRNAs. Total RNA from cultured *S. pyogenes* strain SSI-1 was isolated and the cDNA fragments were then inserted into vector plasmid and transformed to competent cells, after which genomic sequence analyses were performed. Cell transfection, evaluation of mRNA transcription, measurement of inflammatory mediators, and assessment of surviving bacteria with murine splenocytes were also performed. Three microRNAs were selected from about 600 candidates according to their homology with human genome DNA. In the quantitative method, transcription of nasopharyngeal cells with microRNA was significantly lower in 2 of 11 targets, and greater in 10 of 11 targets. The ELISA findings revealed that transcription of MIP-2 was significantly greater with miR-SSI1-221 and miR-SSI1-281. Furthermore, strain SSI-1 had significantly higher survival in the supernatant of the control as compared to the miR-SSI1-221 and miR-SSI1-281 transfected cells. In conclusion, microRNA fragments derived from *S. pyogenes* have a high homology to the human genome and contribute to enhancement of the host immune system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：口腔微生物学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：肺炎, non-coding RNA, レンサ球菌, マウス脾細胞, Th-17, MIP, 細胞付着能, ELISA 法

## 1. 研究開始当初の背景

新型インフルエンザウイルス感染症や新型の多剤耐性菌による院内感染症が世界的に大流行し、感染症対策が再び注目を集めている。しかしながら、わが国の感染症対策は他の先進諸国からも大きく遅れをとり、感染症である肺炎が死亡疾患の第4位となっている。高齢者を中心としてわが国では年間約10万人が肺炎により命を落としており、諸外国からは「感染症後進国」などと揶揄される事態を招いている。今後、わが国では65歳以上の高齢者は増加の一途を辿り、2025年には約3300万人（全人口の27%）に達すると予測されている。これまでの報告によれば、高齢者の重症市中肺炎の約50%から肺炎レンサ球菌が分離され、このうち抗生物質耐性菌は30~50%にも及ぶ。肺炎レンサ球菌感染症に対しては、従来より抗生物質療法が採られてきた。しかし、抗生物質耐性株の分離率が上昇しており、類縁のレンサ球菌においても抗生物質耐性化が進んでいることが申請者らの研究で示された。高齢者の割合が増加する将来においては、他の疾病で入院した高齢者の抗生物質耐性菌による院内感染が一層懸念される。それにも関わらず、わが国の医学分野では、免疫、腫瘍や再生医療など特定の領域ばかりに研究対象が集中している。その結果、感染症対策は後手に回り、感染症が大流行してから初めて対策を講じるのであるが、治療方法の確立はおろか治療に結びつく基礎的な研究成果の蓄積も不十分であるというのが現状である。歯科領域では、口腔細菌叢に定着する肺炎起因細菌を口腔清掃で減少させると肺炎の発症率が低下することを以前より証明し、歯科領域から肺炎をコントロールできることを提唱してきた。本研究では、高齢者肺炎に対して抗生物質療法に代わる新規治療方法ならびに予防方法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、レンサ球菌由来の non-coding RNA (ncRNA) 群の中から、ヒト ncRNA と相同性を有する候補分子をデータベースより選出し、ヒト細胞株およびマウスに接種した際のサイトカイン産生能や免疫担当細胞の賦活化を検索することを目的とした。申請者らは、これまでにレンサ球菌の ncRNA ライブラリーを構築し、網羅的にヒトの ncRNA データベースと相同検索を行った。その結果、約600のレンサ球菌 ncRNA クローンから、3種類のヒト ncRNA 相同体を得た。そこで、当該の3種類のレンサ球菌の配列を RNA 転写ベクターにそれぞれ導入し、ncRNA 発現ベクターを構築した（クローン#221, #281, および#301）。続いて、ヒ

ト咽頭上皮細胞 Detroit562 株へ3種類のレンサ球菌 ncRNA 発現ベクターをそれぞれ導入した。そこで今後、ncRNA 導入細胞におけるヒトサイトカイン転写量を RT-PCR 法を用いたスクリーニングによりそれぞれ検索する。その結果、コントロールの Detroit 562 細胞に比べ、転写の増減が認められるサイトカインに関しては、real-time PCR 法により更に詳細な検討を行う。スクリーニングを予定しているヒトサイトカインのうち、TGF-β1 はヒト細胞表層のフィブロネクチンの発現を制御している。多くの細菌はヒト細胞表層のフィブロネクチンを介してヒト細胞に付着・侵入することから、TGF-β1 の転写量の増減が認められる ncRNA クローン発現細胞では細菌のヒト細胞付着能が変化する可能性が考えられる。そこで、レンサ球菌ならびに肺炎球菌の細胞付着能を *in vitro* レベルで明らかにする。また、当該クローンの感染防御効果について、ヒトの各種免疫細胞株ならびにマウスを用いた動物実験で明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)ncRNA クローン#281 導入細胞に対する細胞付着能解析

ヒト咽頭上皮細胞 Detroit 562 株に ncRNA クローン#281 発現ベクターを導入後、導入細胞をポリスチレンプレートに生育させ、肺炎球菌またはレンサ球菌を共培養させた後、液体培地で洗浄し、純水で細胞を破碎し、破碎液を寒天培地に播種し生育菌数を算定した。これにより、細胞付着能を *in vitro* レベルで明らかにした。前述の real-time PCR を用いた予備実験において、ncRNA クローン#281 導入細胞では、TGF-β1 の転写が減少した。TGF-β1 はヒト細胞表層のフィブロネクチンの発現を正に制御する。多くの細菌はヒト細胞表層のフィブロネクチンを介してヒト細胞に付着・侵入することから、ncRNA クローン#281 導入細胞では細菌のヒト細胞付着が減少することが予測された。

### (2)ncRNA クローン#221 の抗菌ペプチド誘導能解析

ヒト咽頭上皮細胞 Detroit 562 株に ncRNA クローン#221 発現ベクターを導入後、経時的に上清を採取し、細胞外へ遊離する抗菌ペプチド LL-37 のタンパク量を ELISA キットにて定量した。LL-37 はヒトの上皮細胞や好中球から分泌され、特に炎症巣において高濃度に存在することが知られている。前述の real-time PCR を用いた予備実験において、ncRNA クローン#221 導入細胞では、LL-37 の転写が増加した。そこで、抗菌ペプチドの産生が最も高くなる時間、および ncRNA クローン#221 発現ベクター導

入量を決定した。続いて、抗菌ペプチドの濃度が最も高まる条件下で、MRSA等の様々な病原性細菌を ncRNA クローン#221 導入細胞に感染させ、経時的に上清を寒天培地に播種し生育菌数を算定し、殺菌効率を算出した。野生型の Detroit 562 に比べ、LL-37 の産生能が高い ncRNA クローン#221 導入細胞では、抗菌ペプチドの作用により殺菌効率が上昇することが予測された。

### (3)ncRNA クローン#221 導入による Th17 免疫応答の解析

マウス脾臓からリンパ球画分を調整し、ncRNA クローン#221 発現ベクターを導入した。その後、IL-17 および MIP (=ヒト IL-8 のマウスホモログで好中球遊走活性を有する) 産生量を ELISA キットにて定量した。前述の real-time PCR を用いた予備実験において、ncRNA クローン#221 では、IL-17 の転写が増加した。そこで、MIP 誘導の条件を至適化し、マウス脾臓の全細胞画分に ncRNA クローン#221 を導入した。次に、肺炎レンサ球菌や MRSA 等の細菌を感染させ、反応液を寒天培地に播種し生育菌数を算定した。これにより、好中球依存性の貪食効率の変化を算出した。Th17 免疫応答が上昇した ncRNA クローン#221 導入細胞の上清では IL-17 および MIP の産生量が上昇し、菌の貪食効率が高まると予測された。

### (4)ncRNA クローン#281 導入による肺炎球菌の細胞付着阻害実験

ヒト咽頭上皮細胞 Detroit 562 株に ncRNA クローン#281 発現ベクターを導入後、蛍光免疫染色法により、細胞表層のフィブロネクチン発現量を可視化し、画像解析ソフトウェアにより半定量を行った。また、最もフィブロネクチン発現量が低下する条件下で肺炎球菌を感染させ、菌の細胞付着率の変化を算定した。フィブロネクチン発現が低下した ncRNA クローン#281 導入細胞では、菌の付着率が低下することが予測された。

### (5)ncRNA 投与マウスにおける感染防御能の解析

さらに、上記の項目(1)~(3)より得られた ncRNA の機能について、脂質試薬で ncRNA 相同体を投与したマウス実験モデルにおいて解析を行った。最終的には、ncRNA 相同体を投与したマウスに細菌を感染させた際の感染防御能の変化を検証した。申請者らはこれまでに、サイトカイン発現量の多いマウス脾臓リンパ球細胞を用いた *in vitro* での感染実験において、ncRNA クローン#301 を導入したマウス脾臓細胞に対する感染菌数が、他の ncRNA クローン導入細胞に比べ少ないという結果を

得ていた。このことから、ncRNA#301 投与マウスにおいてはレンサ球菌に対する感染防御効果が高まることが予測された。また、ncRNA#301 はレンサ球菌のみならず、様々な感染症に対する防御剤候補として発展的な解析対象となる可能性があると思われる。また、この仮説が肺炎レンサ球菌をモデルとして証明できれば、数多くの病原性細菌の病原性解明に幅広く応用できる可能性も秘めていた。

## 4. 研究成果

はじめに、予備実験で得たレンサ球菌の ncRNA クローン#221, #281 および#301 の感染防御効果について *in vitro* ならびに *in vivo* での解析を進めた。real-time PCR を用いた予備実験において、ncRNA クローン#281 導入細胞では、TGF- $\beta$ 1 の転写が減少した。TGF- $\beta$ 1 はヒト細胞表層のフィブロネクチンの発現を正に制御する。多くの細菌はヒト細胞表層のフィブロネクチンを介してヒト細胞に付着・侵入することから、ncRNA クローン#281 導入細胞では細菌のヒト細胞付着が減少することが予測された。そこで ncRNA クローン#281 の導入細胞に対する肺炎球菌ならびにレンサ球菌の細胞付着能を *in vitro* レベルで解析した結果、#301 クローンにおいて細胞付着能の亢進を認めた。

次に、ncRNA クローン導入による Th17 免疫応答の解析を行った。マウス脾臓からリンパ球画分を調整し、ncRNA クローン発現ベクターを導入し、IL-17 および MIP (=ヒト IL-8 のマウスホモログで好中球遊走活性を有する) 産生量を ELISA 法にて定量したところ、ncRNA クローン#221 では、MIP の産生が増加した。

本研究から得られた結果は、肺炎球菌のみならず、種々の感染症を引き起こす数多くの病原性細菌の感染制御に幅広く応用できる可能性がある。

## 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 4 件)

① Ogawa T, Terao Y, Honda-Ogawa M, Hashimoto S, Ikebe K, Maeda Y, Kawabata S. MicroRNA fragments derived from *Streptococcus pyogenes* enable activation of neutrophil phagocytosis: *in vitro* study. *Microbes and Infection* 15(3): 212–218; 2013.

② Ogawa T, Yamasaki S, Honda M, Terao Y, Kawabata S, Maeda Y. Long-term survival of salivary streptococci on dental devices made of EVA. *International Journal of Oral Science* 4(1): 14–18; 2012.

③ Ogawa T, Terao Y, Okuni H, Ninomiya K,

Sakata H, Ikebe K, Maeda Y, Kawabata S. Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microbial Pathogenesis* 51(1-2): 58-68; 2011.

④ Ogawa T, Terao Y, Sakata H, Okuni H, Ninomiya K, Ikebe K, Maeda Y, Kawabata S. Epidemiological characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with multiple onsets of pharyngitis. *FEMS Microbiology Letter* 318(2): 143-151; 2011.

[学会発表] (計 2 件)

① Ogawa T, Kagawa R, Ikebe K, Honda M, Terao Y, Kawabata S, Maeda Y. Poor oral condition promotes harboring salivary pneumococcus in elderly. 90th General Session of the International Association for Dental Research. Iguacu Falls, Brazil. 20-23. Jun. 2012.

② Ogawa T, Ikebe K, Okada T, Enoki K, Honda M, Terao Y, Kawabata S, Maeda Y. Routine dental checks reduce pneumogenic microbes in oral cavity. American Association for Dental Research 2012 Annual Meeting and Exhibition. 17.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 泰治 (OGAWA TAIJI)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：10543481

### (2) 研究協力者

川端 重忠 (KAWABATA SHIGETADA)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：50273694

前田 芳信 (MAEDA YOSHINOBU)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：10144510

寺尾 豊 (TERAO YUTAKA)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：50397717

池邊 一典 (IKEBE KAZUNORI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：70273696

本多 真理子 (HONDA MARIKO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生

橋本 栄 (HASHIMOTO SAKAE)  
大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生