

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09589

研究課題名(和文) マイコプラズマ肺炎におけるEGFRシグナルの解析とその制御戦略の基盤的研究

研究課題名(英文) Analysis of EGFR-signaling pathway in Mycoplasma pneumoniae infection

研究代表者

桑野 剛一 (KUWANO, KOICHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60215118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Mycoplasma pneumoniae (Mp) 感染に伴う肺炎の病態には、宿主の過剰な免疫応答が関与する。MpはTLR2依存的に炎症応答を惹起するが、TLR2欠損マウスでは、なお炎症応答が観察される。本研究ではMpのTLR2非依存的な炎症誘導におけるEGFRの関与について検討した。MpタンパクであるMpn573がEGFRと結合したが、Mpn573はEGFRを活性化しなかった。また、Mpと感染細胞の相互作用に重要な接着因子もEGFRの活性化に必須ではなかった。一方、Mpは感染細胞の細胞死を抑制する機構を備えており、これによって持続的に感染することがEGFRの活性化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The excessive immune responses are thought to be responsible for the pathophysiology of Mycoplasma pneumoniae(Mp) pneumonia. Although TLR2 plays a predominant role in the inflammatory responses against Mp, the inflammatory responses still observed in TLR2-deficient mice. In this study, we investigated the involvement of EGFR in the TLR2-independent immune responses.

Since the membrane fraction of Mp induces EGFR activation, we first examined the mycoplasmal protein binding to EGFR. We found that Mpn573 binds to EGFR, but unfortunately the protein was unable to activate EGFR. Moreover, cytoadherence that is thought to be important for the progression of Mp pneumonia was not essential for the activation of EGFR. On the other hand, we found that Mp has an ability to regulate the infected cell death, and the ability may allow the EGFR activating factor of Mp to act on the infected cells for a long time.

研究分野：感染症

キーワード：マイコプラズマ肺炎 EGFR 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎マイコプラズマ (Mp) はヒトの呼吸器に感染する主要な病原細菌である。マイコプラズマ肺炎は本菌によって惹起される肺炎であるが、その病態に関わる決定的な病原因子は未だ同定されていない。一方、マイコプラズマ肺炎の病態には本菌に対する宿主過剰な免疫応答の関与が指摘されており、本菌による炎症応答誘導機構とその肺炎病態との関連が近年注目されている。

Mp 由来の免疫応答誘導因子としては菌体表面のリポプロテインが知られている。Mp のリポプロテインは本菌の病原性に重要であると考えられているが、同分子は類縁の非病原性のマイコプラズマの構造タンパク質でもあるため、これのみでマイコプラズマ肺炎の病態を説明することは困難である。このことから Mp はリポプロテイン以外の炎症応答誘導分子を保持しており、これが病原性マイコプラズマに特異的な病態形成能に関連すると予想される。実際、Mp はリポプロテインの受容体である TLR2 を欠損したマウスに対しても炎症応答を誘導することが報告されており、未知の炎症応答誘導分子・機構の存在が強く示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では上述の Mp の未知の炎症応答誘導分子・機構を解明することを目的として、その関連分子として上皮成長因子受容体 (EGFR) に着目して解析を行う。EGFR は、細胞の分化及び増殖等に関与する受容体タンパク質であるが、病原細菌の感染に伴う上皮細胞からの炎症性メディエーターの産生においても重要な役割を担っていることが知られている。Mp 菌体成分刺激に伴う上皮細胞の炎症応答には ERK が関与することが示されているが、ERK は EGFR 依存的な炎症応答においても重要な分子であることから、EGFR が Mp 感染における炎症応答に関与することが強く予想される。

## 3. 研究の方法

Mp は所属研究室で維持・保存している M129 株を使用した。また上皮細胞として、肺由来の扁平上皮癌細胞株である EBC-1 を使用した。これらを使用し、以下の方法にて実験を行った。

### (1) IL-8 産生における EGFR の関与の解析

EBC-1 に各種阻害薬等を作用させた後、Mp 及び各種リガンド等を作用させた。18 時間後に培養上清を回収し、ELISA にて培養上清中の IL-8 を定量した。

### (2) EGFR の活性化の解析

EBC-1 に Mp 及び各種リガンド等を作用させた後、SDS sample buffer にて細胞溶解液を調整した。これをサンプルとしてウエスタンブロット法にてリン酸化 EGFR を半定量的に解析した。

### (3) Mp と EGFR の相互作用の解析

EBC-1 を IP lysis buffer にて溶解した後、限外ろ過カラムにて遊離の界面活性剤を除去した。これに Mp 菌体を添加し、氷上で 1 時間静置後、遠心・洗浄操作にて Mp 菌体に付着した EBC-1 由来のタンパク質を回収した。これをサンプルとしてウエスタンブロット法にて Mp 菌体に付着した EGFR を半定量的に解析した。

### (4) Mp 由来の EGFR 結合タンパク質の解析

EBC-1 より EGFR を抽出・精製し、これを固定化したカラムを作製した。同カラムを用いて、Mp 菌体溶解液より、EGFR 結合タンパク質をアフィニティ精製し、MALDI-TOF/MS にてタンパク質を同定した。

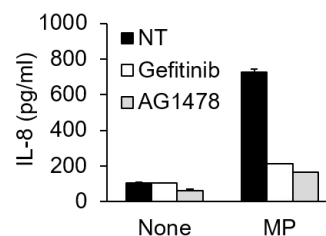
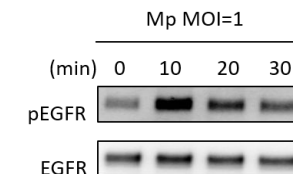
### (5) Mp の細胞死抑制活性の解析

細胞に Mp を感染させた後、各種細胞死誘導剤にて細胞を刺激し、LDH リリースおよび DEVDase アッセイにて細胞死の程度を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) Mp は EGFR を活性化する。

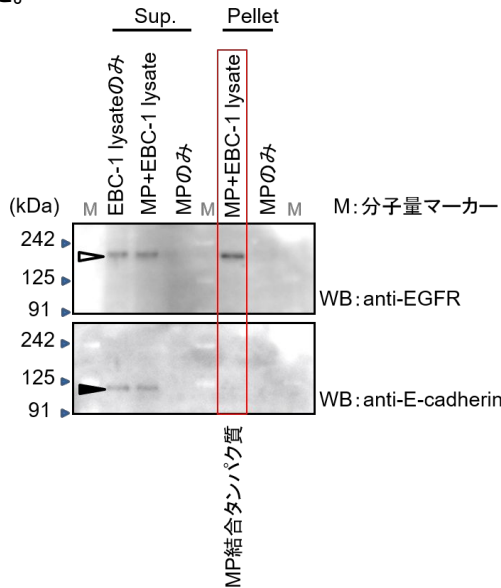
まず、Mp は EGFR を活性化するか調べるために、Mp 感染細胞における EGFR のリン酸化をウエスタンブロット法にて解析した。その結果、Mp 感染細胞において EGFR のリン酸化が認められた。この Mp 感染に伴う EGFR のリン酸化が炎症応答に関与するか調べるため、Mp 感染に伴う IL-8 産生が EGFR の阻害薬である AG1478 処理によって低下するか調べたところ、AG1478 処理にとって Mp 感染に伴う IL-8 産生は顕著に低下した。



以上の結果から、EGFR は Mp 感染に伴う炎症応答において一定の役割を果たしていると推測される。

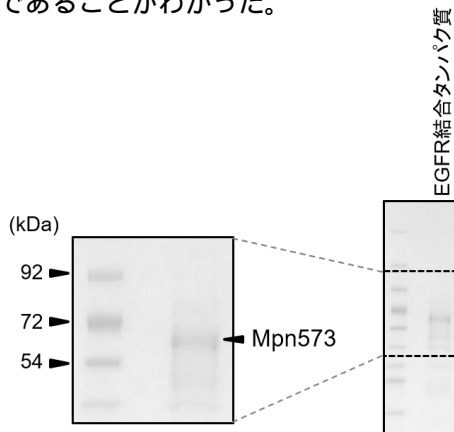
(2) Mp は EGFR と結合する。

過去の報告から Mp の膜画分に含まれる SPA2 結合性の分子が EGFR を活性化することが明らかとなっている。このことから Mp の EGFR 活性化分子もまた、EGFR と一定の相互作用を示すことが予想される。そこで Mp が EGFR に対して結合性を示すかどうかについて調べるため、Mp 菌体と結合する EBC-1 由来のタンパク質を解析した。下図に示すように、コントロールとして用いた E-cadherin が Mp 菌体によって遠心沈降しないのに対して、EGFR は Mp と特異的に結合することがわかった。



(3) Mpn573 は EGFR と結合する。

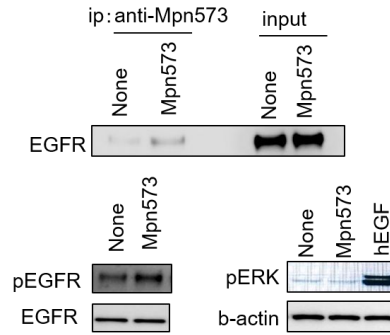
EGFR が Mp 由来のどのような分子を介して Mp 菌体と結合するのか調べるため、EBC-1 から EGFR を抽出し、これを固定化したカラムを作製し、Mp 溶解液から EGFR と結合するタンパク質をアフィニティ精製した。精製したタンパク質を MALDI-TOF/MS にて解析した結果、Mp 由来の EGFR 結合タンパク質は Mpn573 であることがわかった。



(4) Mpn573 は EGFR を活性化しない。

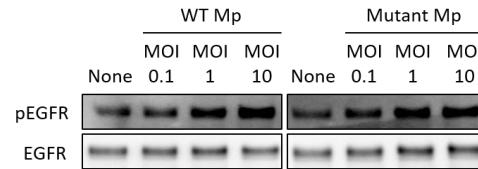
前項で精製した Mpn573 が EGFR を活性化するか調べるため、同分子を作用させた細胞において EGFR のリン酸化が起きるか解析した。その結果、Mpn573 はあきらかな EGFR 活性化

能を有さないことがわかった。



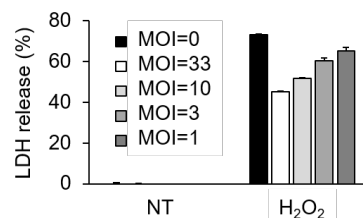
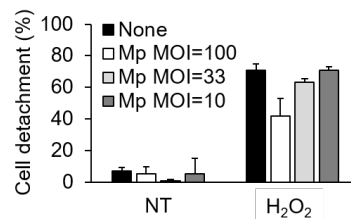
(5) Mp の接着因子は EGFR の活性化に関与しない。

私どもは最近 Mp 感染における TLR2 非依存的な炎症応答には本菌の接着因子が関与することを見出した。そこで、Mp の接着因子が EGFR の活性化に関与するか検討を行った。その結果、接着能を欠いた Mp 変異株と野生株では EGFR 活性化能に大きな違いは見られなかった。このことから Mp 感染による EGFR の活性化には直接的な Mp と細胞との相互作用は重要ではなく、液性の因子が重要である可能性が示唆された。



(6) Mp は感染細胞の細胞死を抑制する。

Mp 由来の液性の EGFR 活性化因子としては過酸化水素が知られている。そこで、Mp がこの過酸化水素を感染細胞に対して長期持続的に作用させる機構を備えているかどうか検討を行った。その結果、一定以上の濃度の過酸化水素は細胞の剥離を惹起するのに対して、Mp 感染細胞においては過酸化水素処理に伴う細胞の剥離が低下することがわかった。またこの細胞の剥離は細胞死(ネクロシス)に伴って起きており、Mp はこの細胞死を抑制することが明らかとなった。



以上の結果から、Mp 由来の新規の EGFR 活性化分子を同定することはできなかったものの、EGFR の活性化を効率的に惹起する機構を Mp が備えている可能性があることが明らかとなった。

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30309752

#### 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)

Yamamoto T, Kida Y, Sakamoto Y, Kuwano K.  
Mpn491, a secreted nuclease of Mycoplasma pneumoniae, plays a critical role in evading killing by neutrophil extracellular traps. Cell Microbiol. 2016 Sep 7. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

山本武司、桑野剛一 肺炎マイコプラズマの分泌型ヌクレアーゼは好中球の NETs による殺菌の回避に重要である 日本マイコプラズマ学会 第 43 回学術集会 長崎 2016 年 6 月 24-25 日

Kuwano K. Mpn491, a secreted nuclease of Mycoplasma pneumoniae, plays a critical role in evading killing by neutrophil extracellular traps. CSHAC Bacterial infection & host defense 2017 年 4 月 17-21 日

〔図書〕(計 1 件)

標準微生物学 神谷茂編 医学書院 マイコプラズマ p256-261 分担者 桑野剛一  
2018 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/micro/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

桑野 剛一 (KUWANO KOICHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60215118

##### (2)研究分担者

山本武司 (YAMAMOTO TAKESHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20632566

木田 豊 (KIDA YUTAKA)