

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19466

研究課題名(和文)肺炎球菌性肺炎における気道上皮由来の新規サイトカインの生体防御への寄与

研究課題名(英文)The contribution of a novel epithelial-derived cytokine to the host defense against pneumococcal pneumonia

研究代表者

鎌田 浩史(Kamata, Hirofumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60528545

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):研究代表者らは本研究課題期間中にUniversity California, Davis(UC Davis)よりSectm1aノックアウトマウス凍結精子を購入し、理化学研究所筑波で個体を行った。同施設でSectm1aヘテロノックアウトマウスが生まれ、それらを当施設に搬入し、交配を継続し、ノックアウトマウスを安定し繁殖させることに成功した。これにより、現時点では世界初となるSectm1aノックアウトマウスを用いた実験を行うことが可能となった。本研究の成果であるSectm1aノックアウトマウスを用いることにより、肺炎球菌肺炎における生体の免疫機構のさなる解明につながりうると考えられる。

研究成果の概要(英文):We purchased Sectm1a KO sperm from University California, Davis(UC Davis) and created Sectm1a hetero KO mice in RIKEN TSUKUBA Campus followed by crossing them in our facility. We succeeded in breeding Sectm1a KO mice stably in our facility. To the best of our knowledge, there has been no report in which Sectm1a KO mice were used and thus our present study could provide novel insights to further elucidate the mechanisms through which host immune system works during pneumococcal pneumonia.

研究分野：呼吸器感染症

キーワード：肺炎球菌肺炎 Sectm1a

1. 研究開始当初の背景

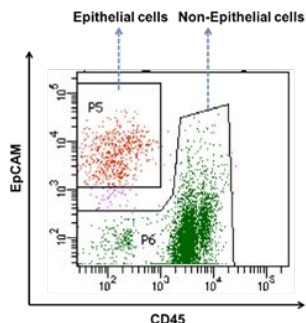
肺炎球菌性肺炎は市中肺炎の原因菌として最も頻度が高く、高齢者や糖尿病、慢性閉塞性肺疾患などの基礎疾患を有する患者ではしばしば重症化する。気道を覆う気道上皮細胞は、その線毛や表面を覆う粘液により細菌に対して一次防御としてのバリア機能を担うことが広く知られているが、最近になり、気道上皮には Toll 様受容体や NOD 様受容体が豊富に存在し、自然免疫機構に大きく関与することが明らかになってきた(Mizgerd JP, N Engl J Med 2008;358:716-27)。

研究代表者はこれまでに、単離した肺気道上皮の遺伝子発現の網羅的解析を行い、肺炎球菌感染時に気道上皮が特異的に産生するサイトカインを複数同定した(Am J Respir Cell Mol Biol 2016; 55: 407-418)。さらに、それらのサイトカインのなかでも、Secreted and Transmembrane 1a (Sectm1a)が肺炎球菌感染時に気道上皮においてきわめて強く誘導されることを証明した。以下にその成果につき簡潔に記載する。

肺炎球菌性肺炎において気道上皮で特異的に誘導される遺伝子の同定：

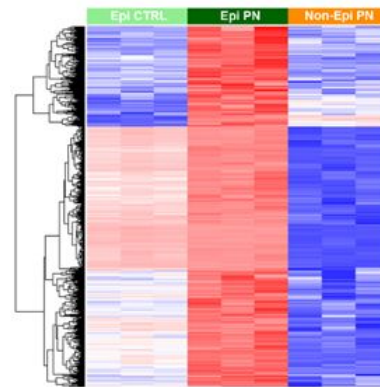
マウス肺単細胞懸濁液からフローサイトメトリーを用いて、CD45 と CD326(EpCAM)の発現に基づき、気道上皮細胞 (Epithelial cells;CD45+EpCAM+)と、上皮細胞以外の細胞種をすべて含む、非気道上皮細胞 (Non-Epithelial cells)を分離する方法を用いて(図1)、以下3群の細胞集団を単離、回収しマイクロアレイによる遺伝子網羅的解析を行った。

- (1)非感染のマウス肺の気道上皮細胞 (Epi CTRL)
- (2)肺炎球菌感染後(15時間)のマウスの肺の気道上皮細胞 (Epi PN)
- (3)肺炎球菌感染後(15時間)のマウスの非気道上皮細胞 (Non-Epi PN)。



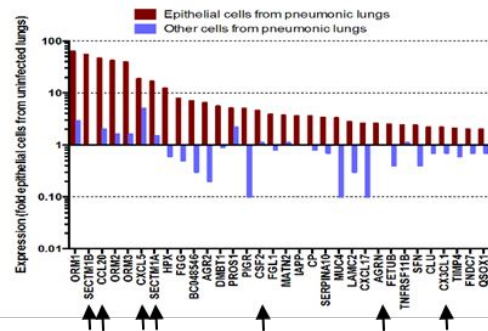
[図1] フローサイトメトリーによる気道上皮細胞の単離

そして、肺炎球菌感染マウスの気道上皮 (Epi PN)において、他の2群(Epi CTRL および Non-Epi PN)と比較して有意に発現が亢進していた1166 遺伝子を同定した(図2)。



[図2] 肺炎球菌に感染したマウスの気道上皮で他の2群より有意に発現が亢進した1166 遺伝子 (FDR-q < 0.05)

続いて、肺気道上皮が肺炎球菌感染時に特異的に発現するサイカインを同定するために、肺炎球菌感染マウスの気道上皮 (Epi PN)において他の2群より2倍以上発現が誘導されている遺伝子に候補を絞り(197 遺伝子)、さらに Database for Annotation, and Visualization and Integrated Discovery (<http://david.ncifcrf.gov>)を用いて、‘Secreted Proteins’ (SP_PIR_Secretion)に分類される32 遺伝子(うち矢印の7 遺伝子がサイトカイン)を特定した(図3)。



[図3] 肺炎球菌感染によって気道上皮で特異的に発現する「Secreted Proteins」に分類される32 遺伝子。

この解析方法によって、Sectm1a が肺炎球菌感染によって気道上皮できわめて強く誘導され、かつ、非気道上皮細胞との比較において、気道上皮で選択的に誘導されることが判明した。本研究では筆者らは、これまで肺および感染に関連した研究報告が存在していなかった Sectm1a に着目した。そして、これまでの研究代表者らの研究成果より、気道上皮に由来する Sectm1a は、細菌感染に対して中心的役割を担う好中球の肺内への集

積に大きく関与する可能性が示唆されている。Sectm1a の機能に関する研究報告、Pubmed 上、現在まで数報しか存在しておらず、肺内での機能についての報告は上記の我々の研究報告のみであり、本研究はきわめて新規性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では肺の気道上皮が産生する Secreted and Transmembrane1a という非常に新規性の高いサイトカインに着目し、Sectm1a の機能の解明、証明を通して、気道上皮が肺炎球菌に対する生体防御にどの程度、またどのように寄与するかを明らかにすることを目的とした。

また、筆者らは世界で初めて Sectm1a ノックアウトマウスを用いた実験を行う計画をし、本研究を通じて、いかに生体が肺炎球菌を排除し、その身を守っているかについて新たな知見を報告し、肺炎球菌性肺炎に対する新たな治療戦略の構築に貢献することを目指した。

3. 研究の方法

研究代表者らの知る限りにおいて、これまで Sectm1a ノックアウトマウスを用いた研究報告は未だ存在しておらず、Sectm1a の生体での機能をより詳細に解明するために、筆者らは本研究課題期間中に Sectm1a のノックアウトマウスの作成を行うこととした。

Sectm1a ノックアウトマウスが安定して繁殖した後は、Sectm1a ノックアウトマウスを用いて、肺炎球菌感染モデルマウスにおいて、生存率、感染後の肺内の菌量の推移を明らかにし、Sectm1a の生体防御への寄与の程度を明らかにする。そして、これまでの研究成果より、Sectm1a は肺炎球菌感染後の急性期に気道上皮から産生され、活性化レベルのより高い好中球に選択的に結合し、好中球ケモカインである CXCL2 の産生を促進させ、上述の通り、肺への好中球集積を促進させるという positive feedback loop を形成させ、感染制御に寄与している可能性が示されていることから (Am J Respir Cell Mol Biol 2016; 55: 407-418)、Sectm1a ノックアウトマウスにおける好中球の肺内への集積、そしてその好中球の機能の変化も明らかにしていく。また、研究代表者はマウス気道上皮細胞株 (E10 および MLE15) を用いた *in vitro* の実験系においても豊富な経験を有し、上記 *in vivo* 実験と並行し、siRNA による Sectm1a の気道上皮細胞からのノックダウンによる Sectm1a の下流シグナルの検討等も行う。

4. 研究成果

研究代表者らは本研究課題期間中に University California, Davis (UC Davis)

より Sectm1a ノックアウトマウス凍結精子を購入し、理化学研究所筑波で個体化する手続きを開始した。同施設で Sectm1a ヘテロノックアウトマウスが生まれ、それらを当施設に搬入し、交配を継続し、ノックアウトマウスを安定し繁殖させることに成功した。これにより、現時点では世界初となる Sectm1a ノックアウトマウスを用いた実験を行うことが可能となり、前述の肺炎球菌感染時における Sectm1a の機能の解明を目的とした研究を継続している。

肺炎球菌性肺炎は近年の抗菌薬やワクチンの普及にも関わらず、依然としてしばしば致死性となる呼吸器感染症であり、さらなる病態の解明および、新たな治療戦略の開発が望まれている。本研究を通じて、いかに生体が肺炎球菌を排除し、その身を守っているかについて新たな知見を報告し、肺炎球菌性肺炎に対する新たな治療戦略の構築に貢献しようと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

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〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

研究代表者

鎌田 浩史 (KAMATA, Hirofumi)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教

研究者番号 : 60528545