

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10042

研究課題名(和文)肺炎球菌感染症の宿主防御に關与するオートファジーの分子基盤の解明と治療への応用

研究課題名(英文) The molecular basis of autophagy involved in host defense against pneumococcal infection and its application to therapy

研究代表者

中村 茂樹 (Nakamura, Shigeki)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：20399752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージをオートファジー阻害剤で前処理したところ、肺炎球菌MOI 100暴露群においてCcl2 mRNA発現量が有意に低下した。次にJ774細胞を肺炎球菌で刺激しWesternblotを行なった結果、ATG5とLC3が検出され、wortmanninの前処理によってその検出強度が減弱した。抗LC3抗体による蛍光染色では肺炎球菌接種によってLC3発現量の増加し、wortmanninの前処理によってLC3発現量が減少した。透過電子顕微鏡での観察では、肺炎球菌菌体を取り込んだオートファゴソームと考えられる二重膜構造物の形成が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌感染、特に鼻咽頭クリアランスにおける宿主免疫応答が十分解明されておらず、また鼻咽頭クリアランスに着目した予防戦略もこれまでに認められていない。今回の研究成果は肺炎球菌に対するマクロファージ依存性防御機構、いわゆる自然免疫活性化による感染症防御法の新知見をオートファジーとの関連から明らかにしたものである。鼻粘膜局所におけるマクロファージのオートファジー活性化に基づくクリアランス機構の亢進による新たな肺炎球菌予防法を提案するものであり、将来的な臨床応用と社会福祉への貢献も可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pretreatment of macrophages with an autophagy inhibitor significantly reduced Ccl2 mRNA expression in the pneumococcal MOI 100-exposed group. Next, when Western blot was performed by stimulating J774 cells with Streptococcus pneumoniae, ATG5 and LC3 were detected, and the detection intensity was weakened by pretreatment with wortmannin. In fluorescent staining with anti-LC3 antibody, LC3 expression level increased by pneumococcal inoculation, and LC3 expression level decreased by wortmannin pretreatment. Observation with a transmission electron microscope confirmed the formation of a bilayer membrane structure that is considered to be an autophagosome that incorporated pneumococcal cells.

This study suggests that autophagy may be involved in the immune response to pneumococci by macrophages in terms of both phagocytosis and inflammatory response.

研究分野：感染症内科学

キーワード：肺炎球菌 マクロファージ オートファジー CCL2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌感染症発症への第一段階として、鼻咽頭への定着は極めて重要である。一般的に無菌とされる下気道の免疫と比較し、上気道には常在細菌叢が存在するためその免疫機構は異なり、依然として十分解明されていない。これまでの研究により、肺炎球菌の鼻咽頭定着によって局所の常在マクロファージがマクロファージ遊走性ケモカイン CCL2 を産生し、感染局所へのマクロファージ集積が促進することで鼻咽頭クリアランスが亢進することを突き止めた (Davis KM, Nakamura S, et al. J Clin Invest 2011)。さらにこの研究ではマクロファージ内に取り込まれた肺炎球菌はファゴソーム内で分解され、その菌体成分の一部であるペプチドグリカン断片が NOD2 受容体によって認識され、マクロファージ遊走性ケモカイン CCL2 が産生されることを明らかにした。また別の研究では、マクロライド系抗菌薬がマウス鼻咽頭へのマクロファージ集積を促進し莢膜血清型に依存することなく肺炎球菌の定着を抑制することを明らかにしている (Iwanaga N, Nakamura S, et al. J Infect Dis 2015)。このように鼻咽頭におけるクリアランス機構の解明することで肺炎球菌感染症に対する新たな予防法が確立できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

マクロファージはサイトカイン産生細胞であると同時に貪食細胞として機能し病原細菌の除去にも重要な役割を担う。これまで我々は肺炎球菌を取り囲むファゴソームの形成機転をエンドサイトーシスによるものと考えていたが、菌体内毒素ニューモリシンの存在下でファゴソーム膜に孔形成が起こった結果菌体成分が細胞質内へ移動することから、ファゴソーム内の pH の酸性化が起きているとは考えにくく、このファゴソームがオートファゴソームではないかという仮説を立てた。本研究では、マクロファージによるオートファジー誘導機構と肺炎球菌クリアランスとの関連性を明らかにする目的で研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### 1) マクロファージを介した免疫応答とオートファジーの関連性の解析

主にマウス腹腔内マクロファージを抽出し研究材料として用いる。野生型マウスよりマクロファージを抽出し、オートファジー阻害剤/誘導剤で前処理した後に肺炎球菌と共培養を行い、サイトカイン/ケモカイン産生能 (ELISA) について評価を行う。

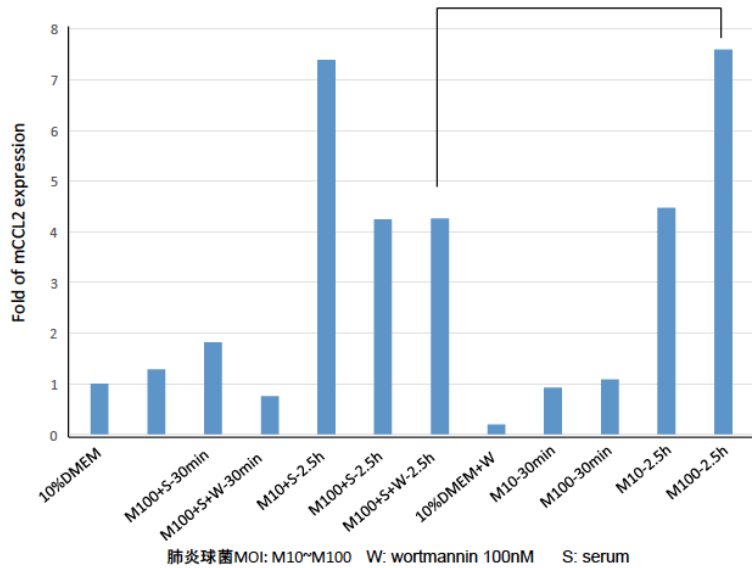
### 2) Nod2 による肺炎球菌の認識とオートファジー誘導性の検討

野生型マウス、Nod2 欠損マウスよりマクロファージを抽出し、それぞれの肺炎球菌に対するオートファジー誘導性の相違について、Western blotting (LC3-I、LC3-II の検出)、蛍光顕微鏡 (GFP-LC3 プラスミド導入後の LC3 の肉眼的評価)、電子顕微鏡 (オートファゴソームの評価) を用いて解析する。

## 4. 研究成果

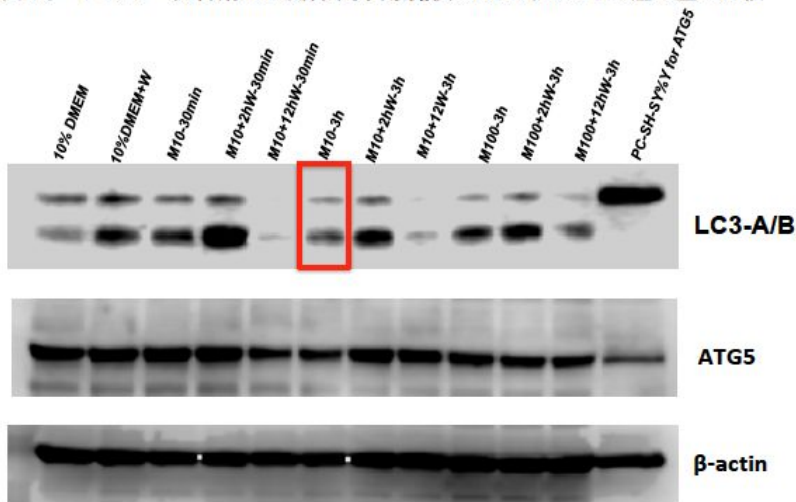
まずマウスマクロファージ J774 細胞 ( $5 \times 10^5$ /well) をオートファジー阻害剤 wortmannin 100nM で前処理し、肺炎球菌血清型 23F による刺激 (MOI 10-100) を加え、マクロファージより RNA を抽出し、Ccl2 mRNA 発現量の比較を行なった。

図1.オートファジー阻害剤による肺炎球菌暴露後のCCL2 mRNA発現量の比較



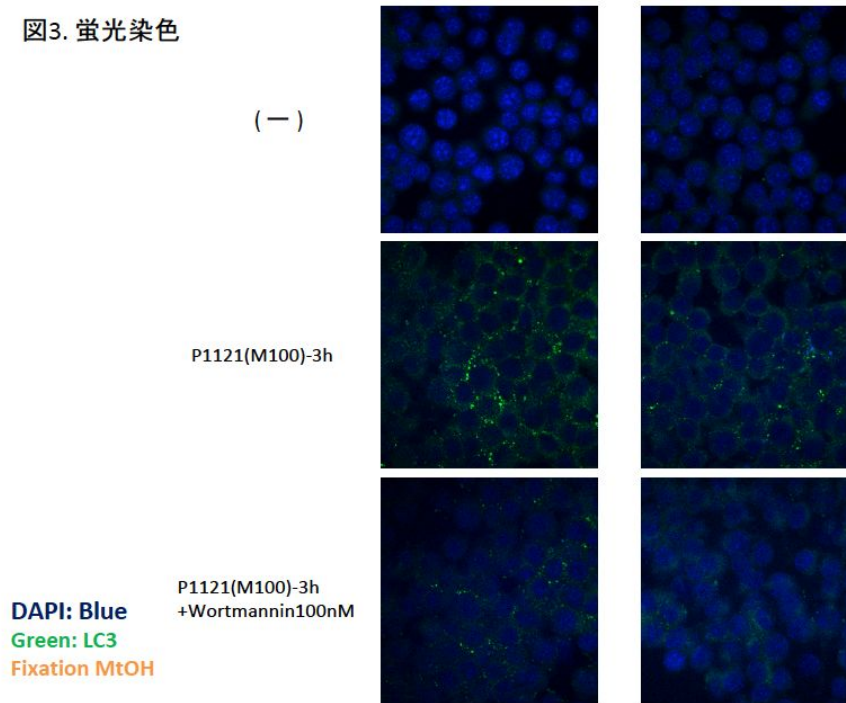
その結果、wortmannin投与によってMOI 100暴露群においてCcl2 mRNA発現量が有意に低下した(図1)。一方、オートファジー誘導剤Rapamycinの前処理においては、Ccl2 mRNA発現量の亢進は認められなかった (data not shown)。この結果は、マクロファージからのマクロファージ遊走性ケモカインCCL2産生がオートファジーによる肺炎球菌処理が関わっている可能性を示唆している。次にマクロファージ内でのオートファジー関連タンパクの発現を確認するため、J774細胞を肺炎球菌血清型23Fで刺激した後、タンパクを抽出し、抗ATG5抗体および抗LC3抗体によるWestern blotを行なったところ、ATG5とLC3が検出された(図2)。

図2.オートファジー阻害剤による肺炎球菌暴露後のATG5およびLC3産生量の比較



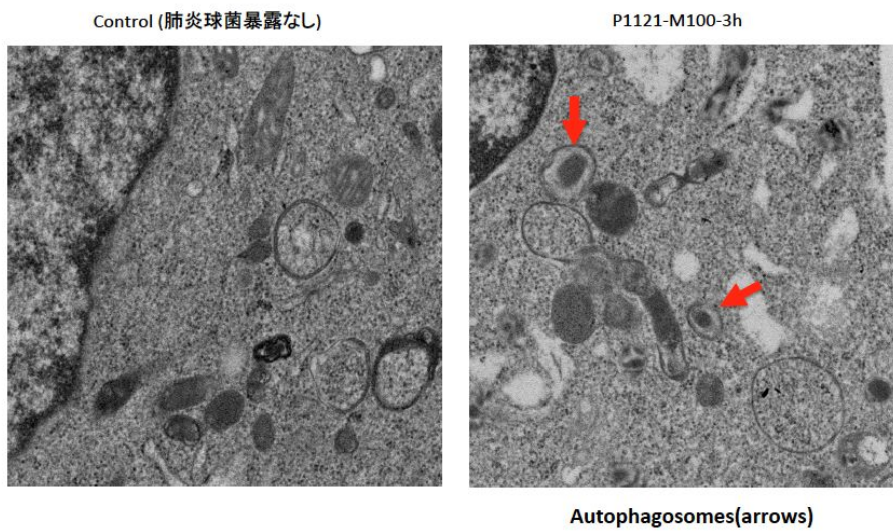
さらに、wortmanninの前処理によってATG5およびLC3の検出強度が減弱していることが分かった。これまでの結果から、肺炎球菌暴露によってマクロファージ遊走性ケモカインCCL2の産生がオートファジー依存性であること、肺炎球菌暴露によってATG5が誘導されることが明らかとなった。

図3. 蛍光染色



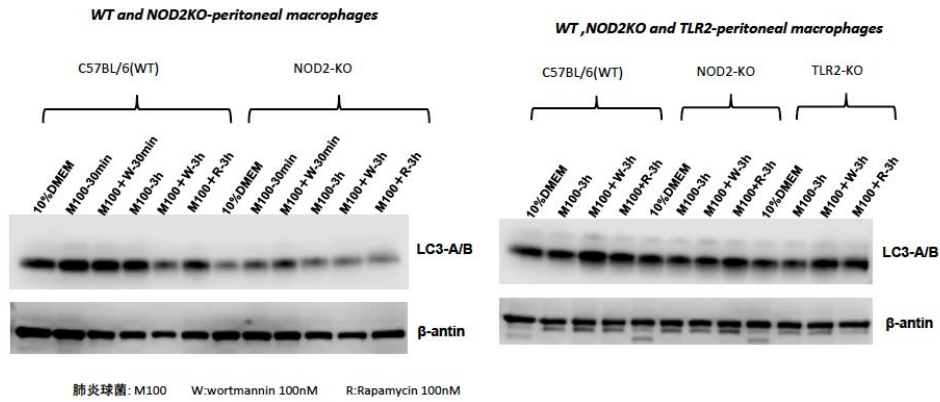
次に、肺炎球菌接種後のJ774細胞を抗LC3抗体で蛍光染色し蛍光顕微鏡で確認したところ、肺炎球菌接種によってLC3発現量の増加し、wortmanninの前処理によってLC3発現量が減少することが分かった (図3)。

図4. 透過型電子顕微鏡



さらに、肺炎球菌接種後の J774 細胞を透過電子顕微鏡で観察したところ、肺炎球菌菌体を取り込んだオートファゴソームと考えられる二重膜構造物の形成が確認できた (図 4)。

図5. NOD2欠損およびTLR2欠損マウスの腹腔マクロファージを用いた解析



マクロファージ内のオートファジー形成に關与する菌体成分認識受容体を明らかにするため、Nod2欠損、およびTLR2欠損マウスより常在腹腔マクロファージを分離し、肺炎球菌接種後、タンパクを抽出し抗LC3-1/II抗体によるWestern blottingで確認したところ、LC3-1/IIともに発現量が低下していたことから、タンパク抽出不十分である可能性が考えられた (図5)。今後は骨髓由来マクロファージを分離し同様の実験を行なう予定である。

今回の検討によってマクロファージによる肺炎球菌に対する免疫応答は、貪食作用および炎症反応惹起の両面でオートファジーが關与している可能性が考えられた。本研究結果を基盤として、今後とも研究を繼續していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sunagawa K, Uchino Y, Ishimoto S, Nakamura S, Honma T, Nakanishi Y, Hatta Y, Miyazaki Y, Sakurai H, Hao H, Sugitani M.	4. 巻 68
2. 論文標題 Mycotic pseudoaneurysm of a pulmonary artery branch caused by Cladosporium.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 47-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1111/pin.12615.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura S, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Saisho Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mukae H, Kohno S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Efficacy and Safety of Intravenous Peramivir Compared With Oseltamivir in High-Risk Patients Infected With Influenza A and B Viruses: A Multicenter Randomized Controlled Study.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Open Forum Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 ofx129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ofid/ofx129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura M, Araoka H, Yamamoto H, Asano-Mori Y, Nakamura S, Yamagoe S, Ohno H, Miyazaki Y, Abe M, Yuasa M, Kaji D, Kageyama K, Nishida A, Ishiwata K, Takagi S, Yamamoto G, Uchida N, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A.	4. 巻 61
2. 論文標題 Clinical and Microbiological Characteristics of Breakthrough Candidemia in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in a Japanese Hospital.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 e01791-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.01791-16.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kajihara T, Nakamura S, Iwanaga N, Oshima K, Hirano K, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Miyazaki Y, Hattori N, Kohno N, Kohno S, Mukae H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Comparative efficacies of daptomycin, vancomycin, and linezolid in experimental enterococcal peritonitis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 498-501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2016.12.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagayoshi Y, Miyazaki T, Shimamura S, Nakayama H, Minematsu A, Yamauchi S, Takazono T, Nakamura S, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H, Izumikawa K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Unexpected effects of azole transporter inhibitors on antifungal susceptibility in <i>Candida glabrata</i> and other pathogenic <i>Candida</i> species.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0180990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0180990.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirayama T, Takazono T, Iwata K, Senju H, Shimazaki T, Tashiro M, Saijo T, Tanaka T, Nakamura S, Imamura Y, Kojiro M, Miyazaki T, Tsukamoto M, Furumoto A, Morimoto K, Muraosa Y, Matsubara Y, Yanagihara K, Mukae H, Kamei K, Kohno S, Izumikawa K.	4. 巻 23
2. 論文標題 A case series of histoplasmosis patients with elevated serum soluble interleukin-2 receptor levels.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 642-647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2017.03.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa H, Fukuda Y, Mitsuyama J, Tashiro M, Tanaka A, Takazono T, Saijo T, Yamamoto K, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mukae H, Kohno S, Izumikawa K.	4. 巻 72
2. 論文標題 In vitro and in vivo antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine, against <i>Cryptococcus gattii</i> : an emerging fungal pathogen.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Antimicrob Chemother.	6. 最初と最後の頁 1709-1713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jac/dkx020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida T, Okamoto M, Fujikawa K, Yoshikawa D, Mizokami A, Mihara T, Kondo A, Ohba K, Kurohama K, Nakashima M, Sekine I, Nakamura S, Miyazaki Y, Kawakami A.	4. 巻 98
2. 論文標題 Gastric mucormycosis complicated by a gastropleural fistula: A case report and review of the literature.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e18142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000018142.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sadamoto S, Shinozaki M, Nagi M, Nihonyanagi Y, Ejima K, Mitsuda A, Wakayama M, Tochigi N, Murakami Y, Hishima T, Nemoto T, Nakamura S, Miyazaki Y, Shibuya K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Histopathological study on the prevalence of trichosporonosis in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue autopsy sections by in situ hybridization with peptide nucleic acid probe.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Med Mycol.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mmy/myz096.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura S, Ikeda-Dantsuji Y, Jin L, Higashi Y, Abe M, Inukai T, Nagi M, Urai M, Miyazaki Y.	4. 巻 63
2. 論文標題 Macrolides Inhibit Capsule Formation of Highly Virulent <i>Cryptococcus gattii</i> and Promote Innate Immune Susceptibility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 e02364-18.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.02364-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Y, Tanigawa M, Takemura T, Iwamoto K, Nigi A, Sasano H, Itani H, Kondo S, Tokui T, Nakamura S, Miyazaki Y.	4. 巻 58
2. 論文標題 Chronic Nodular Pulmonary Aspergillosis in a Patient with Rheumatoid Arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 979-984.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1918-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura S, Iwanaga N, Hara S, Shimada S, Kashima Y, Hayasaka D, Abe K, Izumikawa K, Yanagihara K, Miyazaki Y, Morita K, Kohno S, Mukae H.	4. 巻 25
2. 論文標題 Viral load and inflammatory cytokine dynamics associated with the prognosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection: An autopsy case.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 480-484.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.01.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Abe M, Nakamura S, Kinjo Y, Masuyama Y, Mitsuyama J, Kaku M, Miyazaki Y.	4. 巻 74
2. 論文標題 Efficacy of T-2307, a novel arylamide, against ocular complications of disseminated candidiasis in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Antimicrob Chemother.	6. 最初と最後の頁 1327-1332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jac/dkz020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamairi K, Ido K, Nakamura S, Niki M, Imoto W, Shibata W, Namikawa H, Fujimoto H, Yamada K, Nakamae H, Hino M, Kaneko Y, Miyazaki Y, Kakeya H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Successful treatment of invasive pulmonary aspergillosis caused by <i>Aspergillus felis</i> , a cryptic species within the <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> : A case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 307-310.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.10.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe M, Kinjo Y, Ueno K, Takatsuka S, Nakamura S, Ogura S, Kimura M, Araoka H, Sadamoto S, Shinozaki M, Shibuya K, Yoneyama A, Kaku M, Miyazaki Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Differences in Ocular Complications Between <i>Candida albicans</i> and Non- <i>albicans</i> <i>Candida</i> Infection Analyzed by Epidemiology and a Mouse Ocular Candidiasis Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 2477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.02477.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuki T, Kimura M, Araoka H, Kageyama K, Takagi S, Yamamoto G, Nakamura S, Miyazaki Y, Uchida N, Yoneyama A, Taniguchi S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Cryptococcal meningitis following umbilical cord blood transplantation, association between the occurrence of cryptococcal infection and tacrolimus discontinuation among allogeneic hematopoietic stem cell recipients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 289-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.09.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umeyama T, Hayashi Y, Shimosaka H, Inukai T, Yamagoe S, Takatsuka S, Hoshino Y, Nagi M, Nakamura S, Kamei K, Ogawa K, Miyazaki Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 Genome Editing To Demonstrate the Contribution of Cyp51A Gly138Ser to Azole Resistance in Aspergillus fumigatus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 e00894-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00894-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村茂樹
2. 発表標題 肺炎球菌に対する宿主免疫
3. 学会等名 第91回日本細菌学会ワークショップ11
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考