

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16847

研究課題名(和文)ホスホリルコリンによる細菌感染とアレルギー性炎症の制御に関する研究

研究課題名(英文) Study on control of bacterial infection and allergic inflammation by phosphorylcholine.

研究代表者

川畠 雅樹 (KAWABATA, Masaki)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：30585112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：無莢膜型インフルエンザ菌(NTHi)のバイオフィルムの産生促進にはNTHiの菌体外膜に存在するホスホリルコリン(PC)が関与すると考えられている。そこで、PC特異的IgAおよびPCを用いて、それらのNTHiのバイオフィルム形成抑制効果について検討を行った。その結果、バイオフィルム形成能が高い菌株ではPC発現量が高い傾向にあった。さらに、これらのバイオフィルム形成能の高い菌株を抗PC-IgAで前処理すると、バイオフィルム形成が有意に抑制された。また、PAF-Rを発現する上皮細胞でNTHiを培養したところ、上皮細胞をPCで前処理するとバイオフィルムの形成が著明に抑制されることが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、NTHiのPCを抗PC抗体で処理することでNTHiのバイオフィルム形成を抑制することが示された。また、上皮細胞のPlatelet activating factor receptor (PAF-R)をPCで阻害することでもNTHiのバイオフィルム形成を抑制することが示された。これらのことから、PCを粘膜ワクチンとして投与した場合に、粘膜免疫応答を介してだけでなく、PCの直接的作用によっても細菌の接着を阻止しバイオフィルムの形成を抑制することが示唆された。PCをターゲットとする戦略が細菌性上気道感染の遷延化を制御する新たな治療開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：It is considered that phosphorylcholine (PC), which exists in the extracellular membrane of non-typeable Haemophilus influenza (NTHi), is involved in promoting biofilm formation of NTHi. In this study, the impact of PC-specific IgA and PC on the biofilm production by NTHi was investigated. As a result, strains with high PC expression tended to have high biofilm-producing ability. The biofilm production was suppressed, when the bacteria were treated with anti-PC IgA. In addition, biofilm production by NTHi was also suppressed, when the epithelial cells were treated with PC.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：Phosphorylcholine 無莢膜型インフルエンザ菌 バイオフィルム 上気道感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎や急性鼻副鼻腔炎などの上気道感染症は発症頻度の高い疾患であり、多数の抗菌薬が使用されている。抗菌薬の不適切な投与に起因するさまざまな多剤耐性菌が急増し、難治性や反復性の上気道感染症が臨床上的大きな問題となっている。また、そのため、抗菌薬とは異なる方法を用いた上気道感染症治療法の確立が急務である。中耳炎や副鼻腔炎の起炎菌の大部分は肺炎球菌とインフルエンザ菌 (NTHi) である。感染成立のためには、細菌の上皮細胞への接着が最初のステップとなる。ホスホリルコリン (PC) は、多くのグラム陽性菌およびグラム陰性菌の細菌表面に存在する。肺炎球菌表面上の PC が宿主細胞の Platelet activating factor 受容体 (PAFR) に結合することで、宿主細胞への付着・定着が起こる。NTHi についても、細胞外膜上の PC が PAFR を介して宿主細胞へ付着し、病原性の強い細菌ほど外膜表層により強く発現する¹⁾。更に、PC を高発現する NTHi は感染症の遷延化や難治化に関与するバイオフィルムの産生能が強いことが知られている²⁾。

ウイルス性上気道感染症後に細菌性上気道感染症が引き起こされることを临床上よく経験する。ライノウイルス、RS ウイルスなどの上気道感染症を引き起こす主なウイルスは RNA ウイルスである。Platelet activating factor (PAF) はアレルギー性鼻炎患者における鼻閉⁴⁾に関与する。また、PAF はヒスタミン過敏性亢進にも関わり⁵⁾、ヒスタミン 1 受容体 (H1R) および PAFR の発現を更新する⁶⁾⁷⁾ことも報告されている。更に、PC が寄生虫などにも含まれ、主として好塩基球から遊離される PAF による好酸球浸潤や血管透過性の亢進の抑制にも関与する⁸⁾ことが報告されている。このことから、PAF が PAFR に結合することを PC で阻害することで、アレルギー性炎症の悪循環を断ち切ることができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は PC をターゲットとした上気道細菌感染症およびアレルギー性鼻炎の新規治療法開発の為に必要なそれらの制御機構の解明を目的とする。上気道感染症の制御については、感染症の遷延化の原因となる NTHi のバイオフィルム形成における PC の影響を評価する。アレルギー性炎症の制御については、PC がヒト鼻粘膜上皮細胞に与える影響を評価する。

3. 研究の方法

PC による NTHi バイオフィルム形成抑制

(1) NTHi における PC 発現量の定量

滲出性中耳炎患者の上咽頭から分離された 10 菌株の NTHi を用いた。これらの細菌を Brain heart infusion (BHI : Difco Laboratories, Detroit, MI) 培養液で 6 時間培養し log phase に達した時点で 10^6 CFU/ml に調整し、96 穴の ELISA プレートに $100\mu\text{l}$ ずつ注入し、 37°C で 2 時間かけてコーティングした。Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後に 1% Bovine serum albumin (BSA)-PBS $200\mu\text{l}$ でブロッキングした後、PC 特異的 IgA である TEPC-15(1:1000) で 37°C 、1 時間かけて処理した。洗浄後に、抗マウス IgA-HRP(1:5000) で 37°C 、1 時間かけて処理した。暗所にて 15 分間 TMB で発色させ、 0.5N HCl で反応を止め、ELISA プレートのリーダーで吸光度 450nm を測定した。

(2) バイオフィルムの定量

NTHi を BHI 培養液で 37°C、5% CO₂ 下で一晩培養した。これを遠心したのちに 1.0×10^6 cfu/ml (吸光度 590nm) の菌数に調整し、96 穴マイクロプレートに 200 μ l ずつ注入した。37°C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した後に洗浄し、0.5% クリスタルバイオレット (CV) 100 μ l で 15 分間染色し、蒸留水で洗浄し風乾した。その後、95% エタノールで溶解し、ELISA プレートリーダーで吸光度 (595nm) を測定した。なお、OD₅₉₀0.2 以上をバイオフィルム形成株とした。

(3) PC によるバイオフィルム形成の抑制

PAFR を発現するヒト類粘膜細胞浮遊液を 96 穴マイクロプレートに分注し、これに PC を 200 μ g 添加し、37°C で 1 時間処理した。NTHi は最もバイオフィルム形成能が高かった菌株を用い、BHI 培養液で 37°C、5% CO₂ 下で一晩培養した後に、 1.0×10^8 cfu/ml (吸光度 590nm) に調整した。これを 10 μ l ずつプレートに注入し、37°C、5% CO₂ 下で 1 時間培養して細菌を上皮に接着させ、接着していない細胞を洗浄除去した後さらに 24 時間培養した。培養液を除去後、バイオフィルムを Alexa 488 で標識された concanavalin A および lectin PNA (Thermo Fisher SCIENTIFIC) で 30 分間染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(4) TEPC-15 によるバイオフィルム形成の抑制

BHI 培養液中で一晩培養した NTHi を 1.0×10^6 cfu/ml (吸光度 590nm) に調整し、これを TEPC-15 (1:1000) で 4°C、1 時間前処理した。その後、これを 96 穴マイクロプレート内の BHI 培養液中で更に 24 時間培養し、バイオフィルム形成量を前述の方法で測定した。

4. 研究成果

(1) NTHi の PC 発現量とバイオフィルム形成能

10 菌株中 4 菌株が OD0.2 以上で、バイオフィルム形成株であった。バイオフィルム形成株は PC 発現量が多い傾向にあったが、両者間に有意な相関は認められなかった。但し、バイオフィルム産生株はいずれも PC 発現量が高かった。(図 1)

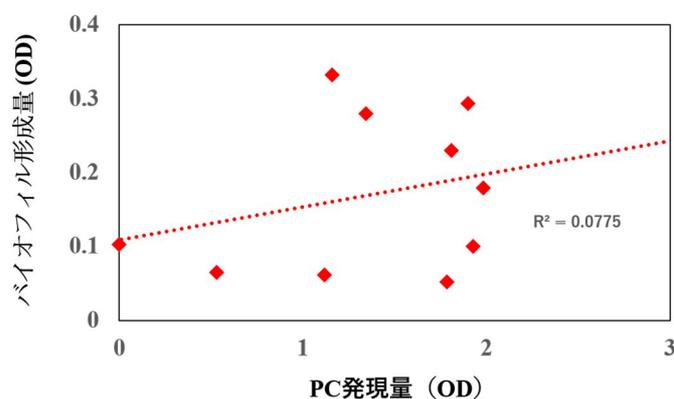


図 1 : PC 発現とバイオフィルム形成の相関

バイオフィルム形成株は PC 発現量が多い傾向にあったが、有意な相関は認められなかった。しかし、バイオフィルム形成株はいずれも PC 発現量が高かった。

(2) PCによるバイオフィーム形成の抑制

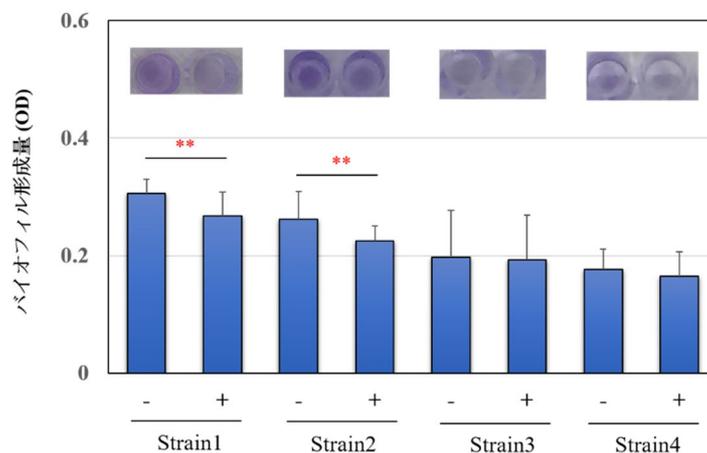
類粘膜上皮細胞上で NTHi を培養したところ、バイオフィームの形成を認めた。そこで、この類粘膜上皮細胞を PC で前処理するとその形成が著明に抑制されることを蛍光顕微鏡下に確認された。

(3) TEPC-15 によるバイオフィーム形成の抑制

バイオフィーム形成能が比較的高い 2 菌株において、TEPC-15 で前処理することでバイオフィーム形成が有意に抑制された。しかし、残りの 2 菌株については、TEPC-15 によるバイオフィーム形成の有意な抑制効果は認められなかった。(図 2)

図 2: TEPC-15 によるバイオフィーム形成の抑制

バイオフィーム形成能が高い 2 菌株では、TEPC-15 によるバイオフィーム形成の抑制が認



められた。** $p < 0.01$ 。

本研究では、類粘膜上皮細胞の PC 前処理によって、PC 高発現の NTHi のバイオフィーム形成も抑制された。したがって、PC 前処理によって NTHi の接着因子である PC と上皮細胞の PAF-R との結合が阻害され、上皮細胞に接着する細菌量が減少し、その結果バイオフィームの形成が抑えられたと考えられる。また、NTHi を PC 特異的 IgA である TEPC-15 で処理することでもバイオフィーム形成が抑制されたが、その NTHi はバイオフィーム産生能が強かつ PC の発現も強いことから、TEPC-15 が PC と結合し PC 前処理と同様に細菌の接着を阻害したためと考えられる。これらのことから、PC 粘膜ワクチンによる PC 特異的分泌型 IgA の誘導や、PC の鼻副鼻腔や咽頭への局所投与によって、細菌の接着そしてバイオフィーム形成を阻止することが可能であり、PC をターゲットとするこれらの治療が上気道の難治性感染症の新たな治療戦略になり得ると期待される。

引用文献

- 1) Swords WE, et al: Non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* 37: 13-27, 2000.
- 2) West-Barnette S, Rockel A, Swords WE. *Infect Immun*. 2006; 74:1823-36.
- 3) Kawabata M, et al: Polyinosine-polycytidylic acid enhances cellular adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Laryngoscope* 121: 2443-2448, 2011.
- 4) Munoz-Cano R, et al: Platelet-activating factor nasal challenge induces nasal congestion and reduces nasal volume in both healthy volunteers and allergic rhinitis patients. *Am J Rhinol Allergy* 27: e48-52, 2013.
- 5) Narita S, et al: The role of platelet-activating factor on histamine hypersensitivity in nasal allergy in guinea pig models. *Int Arch Allergy Immunol* 100: 373-377, 1993.
- 6) Agrawal V, et al: Platelet-activating factor: a role in preterm delivery and an essential interaction with toll-like receptor signaling in mice. *Biol Reprod* 91: 119-111, 2014.
- 7) Nakasaki T, et al: Effects of PAF on histamine H1 receptor mRNA expression in rat trigeminal ganglia. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 58: 29-41, 1999.
- 8) Clark SE, Weiser JN: Microbial modulation of host immunity with the small molecule phosphorycholine. *Infect Immun* 81: 392-401, 2013.
- 9) Tikhomirova A & Kidd SP: *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*: living together in a biofilm. *Pathog Dis* 19: 114-126, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 川島雅樹
2. 発表標題 ホスホリルコリン（PC）とPC重合体（リピジュア）によるバイオフィルム形成の抑制
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
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
--	---------------------------	-----------------------	----