

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09878

研究課題名（和文）新規ワクチン開発と誤嚥性肺炎予防に繋げる肺炎球菌ノイラミニダーゼAの役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of Streptococcus pneumoniae neuraminidase A in the development of new vaccines and prevention of aspiration pneumonia

研究代表者

金子 富美恵（Kaneko, Fumie）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40328414

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）：本研究より、LPxTGモチーフを持たない遊離型NanAを欠損した肺炎球菌は、野生型と比較して鼻粘膜でのコロニー形成、非血行性中枢神経系への浸潤が抑制される一方、LPxTGモチーフを持つ膜アンカー型NanAを欠損した肺炎球菌は、誤嚥による肺への吸引後に生じた菌血症にて、野生型に比して菌量が増加することが明らかとなった。この結果は、NanAが膜アンカー型として残ることで他の病原性因子を負に制御している可能性があり、肺炎球菌のNanAを阻害するだけでは血管内に侵入した肺炎球菌の排除に有利ではないことを示唆している。ワクチン戦略への組み込みには、他の病原性因子の影響も含めてさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、誤嚥性肺炎の予防と再発・重症化回避のため、起因菌である肺炎球菌の次世代ワクチンの開発を目的とし、肺炎球菌に共通する酵素であるノイラミニダーゼA（NanA）に着目してNanAによる肺炎球菌の感染動態をマウスモデルにて評価した。結果、遊離型NanAを欠損した肺炎球菌は、鼻粘膜での定着、中枢神経系への直接浸潤が抑制される一方、膜アンカー型NanAを欠損した肺炎球菌は、誤嚥により野生型よりも早期に敗血症を発症することが明らかとなった。この結果は、NanAが他の病原性因子を負に制御している可能性を示唆し、肺炎球菌NanAのワクチン戦略への組み込みには、さらなる検討が必要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that Streptococcus pneumoniae lacking free NanA without the LPxTG motif showed reduced colony formation in the nasal mucosa and non-hemorrhagic CNS invasion compared to wild type, while Streptococcus pneumoniae lacking membrane-anchored NanA with the LPxTG motif showed increased blood bacterial levels compared to wild type in bacteremia that occurred after aspiration into the lungs due to aspiration. The results suggest that NanA may negatively regulate other virulence factors by remaining as a membrane-anchored form and that inhibition of Streptococcus pneumoniae NanA alone is not advantageous for the elimination of pneumococci that have invaded the blood vessels. into the vaccine strategy would require further investigation, including the influence of other virulence factors.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：ノイラミニダーゼ 肺炎球菌 肺炎球菌ワクチン 誤嚥性肺炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会である本邦では、嚥下機能低下に伴う誤嚥性肺炎に対する予防と再発・重症化回避は健康寿命延伸に向けて急務の課題である。肺炎球菌 (*Streptococcus Pneumoniae*) は誤嚥性肺炎においても重要な起因菌であり、現時点では抗菌薬の適正使用に基づく治療戦略に加え、日本では 2014 年より 65 歳以上で定期接種化された、菌体表面の莢膜多糖体 (capsular polysaccharide) を抗原とする 23 価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン (PPSV23) による予防戦略が一定の効果を示している。肺炎球菌は現在 97 種の血清型変異株が確認されており、莢膜多糖体に依存しない次世代ワクチン開発を、現在の感染対策に並行して進めていく必要がある。

2. 研究の目的

肺炎球菌に共通する産生酵素蛋白で、シアル酸切断によって宿主細胞への菌付着に関与する酵素 (シアリダーゼ) であるノ肺炎球菌イラミニダーゼ A (neuraminidase A: NanA) に着目し、誤嚥性肺炎の発症・重症化への関与と NanA 阻害型ワクチンの予防効果を明らかにすることを目標とした。

さらに、睡眠中の不顕性誤嚥にて鼻腔由来の肺炎球菌感染が肺炎に至る経過を模した高齢マウス誤嚥性肺炎モデル/慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 合併誤嚥性肺炎モデルを確立し、高齢者における誤嚥性肺炎の予防・重症化機序を解明、現行の莢膜多糖体ワクチンの弱点を克服した新規ワクチン戦略への展開を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肺炎球菌 NanA ノックアウト株 (NanA Sp) 薬剤耐性遺伝子導入株の作成

全ゲノムが解析されている血清型 4 型野生株 (TIGR4WT) と同株より作成した NanA 欠損株 (TIGR4 NanA) の譲渡を受けている。野生株は莢膜血清型 TIGR4 カナマイシン耐性ストレプトマイシン感受性肺炎球菌臨床分離株からカナマイシン耐性遺伝子を含んだ Janus cassette を作成、ストレプトマイシン耐性肺炎球菌 (莢膜血清型 TIGR4) における NanA を規定する領域の前後を規定したプラスミド DNA をそれぞれ作成、同 TIGR4 にオーバーラッピング PCR にて導入し、ストレプトマイシン耐性を規定する領域と同時に nanA 領域をノックアウト、カナマイシン耐性獲得をカナマイシン含有 Tryptic Soy Broth 寒天培地でのコロニー形成をみて確認されている。莢膜血清型によりマウスの鼻腔における保菌率が異なるため、6A 型野生株 (6AWT) をストレプトマイシン耐性とし、TIGR4 NanA より分離した Janus Cassette を用いての in frame recombination にてカナマイシン耐性 NanA ノックアウト株 (6A NanA) を作成し、併せて感染実験に使用する。

(2) 成体マウスにおける NanA Sp 鼻腔保菌・感染モデルの作成と中枢神経系への浸潤

近交系マウス (C57BL6) 雌 6 週齢に対し、覚醒下で、血清型 4 型、6 型 (TIGR4WT, 6AWT) と、それぞれの株より作成した NanA 欠損株 (TIGR4 NanA, 6A NanA) より作成した肺炎球菌液を経鼻接種する。接種後 1, 3, 5 日目にマウスを安楽死させ、血液、鼻腔洗浄液、鼻粘膜組織 (嗅上皮を含む) 嗅球、大脳組織を採取する。鼻粘膜組織、嗅球、大脳組織は破碎し、組織懸濁液を作成する。それぞれのサンプルを希釈培養し、肺炎球菌コロニー数を計数する。

(3) 成体マウス誤嚥性肺炎モデルにおける肺炎球菌 NanA の関与

近交系マウス (C57BL6) 雌 6 週齢に対し、セボフルラン過吸入にて深麻酔し睡眠中不顕性誤嚥を模したモデルを作成、血清型 4 型、6 型 (TIGR4WT, 6AWT) と、それぞれの株より作成した NanA 欠損株 (TIGR4 NanA, 6A NanA) より作成した肺炎球菌液を、経鼻的に肺炎球菌を過量接種し誤嚥性肺炎感染を誘発する。接種後 1, 3, 5, 14 日目にマウスを安楽死させ、血液、気管洗浄液、肺組織を採取する。肺組織は破碎し、組織懸濁液を作成する。それぞれのサンプルを希釈培養し、肺炎球菌コロニー数を計数する。また、接種後 14 日までのマウス生存率を評価する。

(4) 肺炎球菌 NanA を規定する NanA 領域ゲノム解析

TIGR4 は全ゲノム解析がなされており、LPxTG 領域を欠く分泌型 NanA を持つことが既知である。6A の NanA については報告がなされていなかったため、6AWT の NanA 領域のゲノム配列を NGS

にて解析する。

(5) 成体マウスにおける WT Sp と NanA Sp の共感染による鼻腔保菌・感染

近交系マウス (C57BL6) 雌 6 週齢に対し、覚醒下で、血清型 4 型野生株 (TIGR4WT) と、NanA 欠損株 (TIGR4 NanA) を各々同量ずつ混和し作成した肺炎球菌液を経鼻接種する。接種後 1, 3, 5 日目にマウスを安楽死させ、血液、鼻腔洗浄液、鼻粘膜組織 (嗅上皮を含む) を採取する。鼻粘膜組織は破碎し、組織懸濁液を作成する。それぞれのサンプルを希釈培養し、肺炎球菌コロニー数を計数する。

(6) 分泌型 NanA を用いた NanA Sp の鼻腔保菌・感染の補完

rNanA を用いた粘膜ワクチンの効果を評価する予備実験として、分泌型 NanA が肺炎球菌の鼻腔粘膜への定着を促進する因子であると仮定し、前処置として TIGR4WT の培養時に使用した液体培地の上清をマウス鼻腔に点鼻したのちに TIGR4 NanA を覚醒下で経鼻接種する。接種後 1, 3, 5 日目にマウスを安楽死させ、血液、鼻腔洗浄液、鼻粘膜組織 (嗅上皮を含む) 嗅球、大脳組織を採取する。鼻粘膜組織、嗅球、大脳組織は破碎し、組織懸濁液を作成する。それぞれのサンプルを希釈培養し、肺炎球菌コロニー数を計数し、分泌型 NanA が TIGR4 NanA の鼻腔粘膜、鼻粘膜組織への定着が補完されるかを、同様の手順で行われた TIGR4 NanA の培養上清を TIGR4WT の経鼻接種前に前処置した対照群との比較にて評価する。

(7) rNanA を用いた粘膜ワクチンによる高齢マウス誤嚥性肺炎の予防

近交系マウス (C57BL6) 雌 70 週齢に対し、rNanA571aa と rNanA186aa を粘膜免疫アジュバント (Flt3 Ligand と CpG oligodeoxynucleotide (ODN)) を併用し週 1 回 3 週間経鼻免疫。免疫終了 3 週間後に採血、NanA 特異的抗体の誘導を確認。その後 3) と同様のセボフルラン過吸入深麻酔下での TIGR4WT あるいは 6AWT の多量経鼻接種により誤嚥性肺炎を誘発する。接種後 1, 3, 5, 14 日目にマウスを安楽死させ、血液、気管洗浄液、肺組織を採取する。肺組織は破碎し、組織懸濁液を作成する。それぞれのサンプルを希釈培養し、肺炎球菌コロニー数を計数する。また、接種後 14 日までのマウス生存率を評価する。以上により、誤嚥性肺炎経鼻免疫の高齢マウス誤嚥性肺炎重症化予防効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 肺炎球菌 NanA ノックアウト株 (NanA Sp) 薬剤耐性遺伝子導入株の作成

本研究は当初、ニューヨーク大学微生物学教室にて荚膜血清型 TIGR4、6A、23F より作成され、譲渡を受けた NanA 肺炎球菌株を用いて行う予定であったが、TIGR4 株の他は生育が不安定であったため、当教室で TIGR4 NanA より抽出した Janus cassette を導入し NanA 領域をポップアウトすることで 6A NanA を作成し得た。

(2) 成体マウスにおける NanA Sp 鼻腔保菌・感染モデルの作成と中枢神経系への浸潤

当初使用した C57BL6 (雌 6 週齢) マウスでは、肺炎球菌菌液の経鼻的接種では感染に至らなかった。このため、B 細胞機能低下マウス (CBA/Ns1c、雌 6 週齢) に変更、以下の感染実験でも同系統のマウスを使用した。鼻腔組織破碎懸濁液における肺炎球菌の検出コロニー数は、接種後 3, 5 日目の時点で TIGR4WT に比して TIGR4 NanA では有意に減少した。鼻腔洗浄液では 5 日目で TIGR4 NanA の検出数が有意に減少した。鼻腔組織と嗅球の破碎懸濁液よりの肺炎球菌検出コロニー数は TIGR4WT に比して TIGR4 NanA では有意に減少した。菌血症を生じた個体は少なかった。また大脳からは肺炎球菌がほぼ検出されなかった。6AWT と 6A NanA でも同様の経鼻的投与による感染実験を行ったが、同様に血中よりの肺炎球菌検出個体はわずかであった。鼻汁、鼻腔組織の破碎懸濁液では NanA の欠損による有意差は見られず、嗅球、大脳からは肺炎球菌がほぼ検出されなかった。

(3) 成体マウス誤嚥性肺炎モデルにおける肺炎球菌 NanA の関与

(2) と同様の理由にて、CBA/Ns1c (雌 6 週齢) に変更して実験を行った。接種 1 日後から TIGR4、6A の野生株、それぞれの NanA 欠損株を接種されたマウスに高度の菌血症が生じた。TIGR4 NanA 接種マウスの血液よりの肺炎球菌の検出コロニー数は、接種後 3 日目の時点で、TIGR4WT 接種マウスに比して有意に増加した。肺胞洗浄液には TIGR4/WT、TIGR4 NanA 肺炎球菌いずれもほぼ検出しなかった。14 日後の生存率は、TIGR4WT 接種マウスと TIGR4 NanA 接種マウスとで有意差はなかった。一方、6AWT あるいは 6A NanA 接種マウスでは、いずれもほぼ全頭が感染早期

に死亡した。

(4) 肺炎球菌 NanA を規定する NanA 領域ゲノム解析

TIGR4 と 6A とで NanA の欠損による鼻腔保菌、誤嚥性肺炎、菌血症への影響が異なることから、6AWT の NanA 領域のゲノム配列を NGS にて解析した。結果、LPxTG 領域を持つ膜アンカー型 NanA であることが示された。TIGR4 は LPxTG 領域を欠く分泌型 NanA を持っており、TIGR4 と 6A での結果の差異には LPxTG 領域の有無により細胞膜に NanA がアンカーされているかが関係していると考えられた。

(5) 成体マウスにおける WT Sp、 NanA Sp の共感染による鼻腔保菌・感染

CBA/NsIc (雌 6 週齢) に変更して実験を行った。鼻汁・鼻腔組織破碎懸濁液での NanA 欠損株の検出は、単独感染実験と同様、接種 3 日後以後で同時に接種した野生株に比し減少した。

(6) 分泌型 NanA を用いた NanA Sp の鼻腔保菌・感染の補完

CBA/NsIc (雌 6 週齢) に変更して実験を行った。上清に遊離した分泌型 NanA によっては NanA 欠損株のコロニー形成能は補完されなかった。

(7) rNanA を用いた粘膜ワクチンによる高齢マウス誤嚥性肺炎の予防

セボフルラン過吸入深麻酔下においての TIGR4 NanA、あるいは 6A NanA の経鼻的多量接種による誤嚥性肺炎誘発と同時に経鼻的に遺伝子組み換え NanA (recombinant NanA: rNanA) を補完する実験を予定していたが、研究期間中に作成していた rNanA の収量が不十分なため未施行となっている。

本研究より、LPxTG モチーフを持たない遊離型 NanA を欠損した肺炎球菌は、野生型と比較して鼻粘膜でのコロニー形成、非血行性中枢神経系への浸潤が抑制される一方、LPxTG モチーフを持つ膜アンカー型 NanA を欠損した肺炎球菌は、誤嚥による肺への吸引後に生じた菌血症にて、野生型に比して菌量が増加することが明らかとなった。この結果は、NanA が膜アンカー型として残ることで他の病原性因子を負に制御している可能性があり、肺炎球菌の NanA を阻害するだけでは血管内に侵入した肺炎球菌の排除に有利ではないことを示唆している。ワクチン戦略への組み込みには、他の病原性因子の影響も含めてさらなる検討が必要である。

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 金子 富美恵, 河野 正充, 須納瀬 弘, 保富 宗城
2. 発表標題 マウス鼻腔での肺炎球菌定着におけるneuraminidase Aの影響
3. 学会等名 第8回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会
4. 発表年 2020年～2021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
研究分担者	河野 正充 (Kono Masamitsu) (20511570)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701)	
研究分担者	須納瀬 弘 (Sunose Hiroshi) (50261631)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	
研究分担者	保富 宗城 (Hotomi Muneki) (90336892)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------