

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17944

研究課題名(和文)上皮細胞の機能調節を介した肺炎マイコプラズマの持続感染機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of persistent infection of *Mycoplasma pneumoniae* through regulation of hydrogen peroxide-induced cell detachment of epithelial cells.

研究代表者

山本 武司 (YAMAMOTO, TAKESHI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20632566

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)：肺炎マイコプラズマはマイコプラズマ肺炎などの呼吸器感染症を引き起こす細菌である。本菌は感染症の治癒後も気道由来の検体から長期間検出されることが知られており、このような持続感染性が気管支喘息などの発症・増悪に関係していると考えられている。肺炎マイコプラズマは気道の細胞を足場にして感染するが、本菌が産生する過酸化水素は気道の細胞を剥離させる作用があるため、持続的に感染するにはこの剥離を抑制する必要がある。本研究では肺炎マイコプラズマが持つ細胞の剥離を抑制する機構について解析を行い、本菌がPARP1というタンパク質の機能を抑制することで過酸化水素による気道の細胞の剥離を低下させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎マイコプラズマは一般に急性感染症として気管支炎や肺炎を起こす細菌として知られているが、気管支喘息患者由来の検体の約45%から本菌が検出されるなど、同疾患をはじめとする慢性炎症性呼吸器疾患との関連も指摘されている。本研究ではこのような慢性炎症性呼吸器疾患の発症に肺炎マイコプラズマの持続感染性が関係しているという観点から、本菌の持続感染機構として感染上皮細胞の剥離抑制機構についての解析を行った。本研究の成果は肺炎マイコプラズマが関連する慢性炎症性呼吸器疾患を制御するための新しい治療法や予防法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)： *Mycoplasma pneumoniae* is a causative agent of respiratory tract infections such as mycoplasma pneumonia. It is known that this organism can be detected in airway-derived specimens long after the infection is cured, and this persistent infection is thought to be related to the onset and exacerbation of bronchial asthma and other diseases. *M. pneumoniae* employs airway cells as infectious foothold. Therefore, it is necessary to inhibit the detachment of airway cells induced by the hydrogen peroxide that is produced by the bacterium in order to sustain the infection. In this study, we analyzed the mechanism of inhibition of cell detachment by *Mycoplasma pneumoniae* and found that this bacterium suppresses the function of a protein called PARP1, thereby reducing the detachment of cells in the airways caused by hydrogen peroxide.

研究分野：細菌学

キーワード：肺炎マイコプラズマ

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎マイコプラズマはヒトの呼吸器に感染し、肺炎や気管支炎、咽頭炎といった急性の呼吸器感染症を引き起こす細菌である。本菌は一般的に気道の常在細菌叢に存在しないとされているが、上述の感染症発症後、適切な抗菌薬の投与により症状が軽快した後であっても、長期にわたり気道由来の検体から検出されることが報告されている。このような肺炎マイコプラズマの慢性持続的な感染は気道過敏性や気道閉塞、炎症病変の形成を惹起し、気管支ぜんそくや COPD をはじめとする慢性炎症性呼吸器疾患発症の基盤となる可能性が指摘されている。特に気管支喘息においては患者由来の検体の約 45%から肺炎マイコプラズマが検出されたという報告があり、その一定数に本菌の感染が関与していると考えられている。このことから肺炎マイコプラズマの持続的な感染を制御できれば本菌が関連する慢性炎症性呼吸器疾患の発症を一定数抑制できると考えられるが、肺炎マイコプラズマがいかにして感染を維持するかについてはほとんど解明されていない。

近年、病原細菌が感染の足場とする上皮細胞にも様々な感染防御機構が備わっており、なかでも上皮細胞の剥離とそれに続く細胞新生によって上皮組織表面の細胞が入れ替わる代謝回転が上皮細胞を足場とする病原細菌に対する感染防御機構として注目されている。肺炎マイコプラズマの足場となる気道上皮細胞については代謝回転が非常に遅いとされているが、過去の報告から呼吸器においても病原体の排除に感染上皮細胞の剥離が一定の関与を示すことが明らかになっている。

肺炎マイコプラズマの病原因子としては過酸化水素が知られているが、この過酸化水素は気道上皮細胞を傷害し、細胞を剥離させることで本菌感染症の症状の発現において中心的な役割を担っていると考えられている。しかしながら、この過酸化水素による細胞傷害作用には、感染の足場の減少を招き、結果として肺炎マイコプラズマの感染の成立と維持の妨げになるという側面があるのではないかと推測される。この仮説が正しかった場合、肺炎マイコプラズマは感染を成立・維持するために、自身の産生する過酸化水素によって惹起される細胞の剥離に対して反作用的に働く機構によって細胞の剥離を制御し足場を確保する必要があるのではないかと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺炎マイコプラズマがその感染を維持するための戦略として、感染の足場となる気道上皮細胞の過酸化水素誘導性の剥離を抑制する機構を備えているか、また、それにはどのような分子による、どのような機構が関与するのかについて解析を行った。

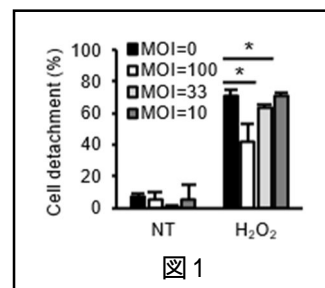
## 3. 研究の方法

気道上皮細胞株として BEAS-2B 細胞を用い、過酸化水素刺激に伴う同細胞の剥離の程度をクリスタルバイオレット法により測定した。細胞傷害性の評価には DCFH-DA を用いた ROS 測定法、8-OHdG ELISA およびアルカリコメットアッセイを利用した。さらに過酸化水素誘導性の細胞死について調べるため、各種阻害薬による細胞剥離抑制効果の評価、ウエスタンブロット法、基質分解アッセイおよび LDH リリースアッセイを行った。

## 4. 研究成果

### 4 - 1. 肺炎マイコプラズマは過酸化水素刺激に伴う BEAS-2B 細胞の剥離を抑制する

肺炎マイコプラズマは以前より過酸化水素の産生依存的に上皮細胞を傷害することが報告されている。そこでまず本菌の感染によって BEAS-2B 細胞の剥離が起きるか観察したところ、少なくとも感染 24 時間後までは明確な細胞の剥離が観察されなかった。さらに肺炎マイコプラズマ感染細胞に過酸化水素を作用させたところ、非感染細胞では細胞の剥離が起きるのに対して、本菌感染細胞では感染菌数依存的に剥離の程度の低下が認められた(図 1)。このことから肺炎マイコプラズマは過酸化水素刺激に伴う感染細胞の剥離を抑制する性質があることが分かった。



### 4 - 2. 肺炎マイコプラズマは過酸化水素刺激に伴う DNA の傷害を抑制しない

過酸化水素による刺激は細胞内での活性酸素種の生成を促し、核酸を酸化・切断することで細胞傷害性を示す。そこで肺炎マイコプラズマがこれらの現象を抑制するか検討した。その結果、肺炎マイコプラズマは感染細胞内の ROS 産生を促し、核酸を酸化・切断することが分かった。さらに本菌は過酸化水素刺激に伴う ROS 産生、DNA 酸化および切断に対して相加的な作用を有して

おり、これらの現象を抑制する作用を持たないことが明らかとなった。

#### 4 - 3 . 肺炎マイコプラズマは過酸化水素刺激に伴う細胞死を抑制する

過酸化水素はアポトーシス、ネクローシス、パータナトスといった様々な細胞死を誘導するとされているが、BEAS-2B 細胞においては主にパータナトスを誘導する傾向が見られた。そこで肺炎マイコプラズマが過酸化水素刺激に伴うパータナトスを抑制するかどうかを poly(ADP-ribose) 形成と LDH release を指標に評価した。その結果、肺炎マイコプラズマは菌数依存的に過酸化水素刺激に伴う poly(ADP-ribose) 形成と LDH release を低下させることが分かった ( 図 2 )。

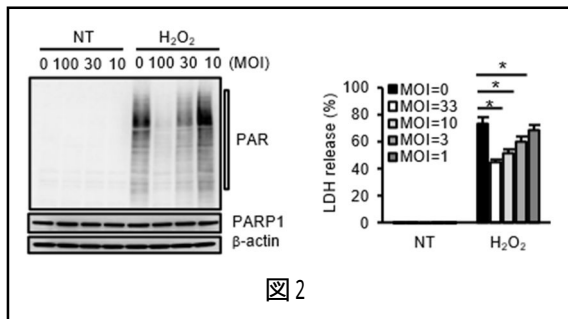


図 2

#### 4 - 4 . 肺炎マイコプラズマは PARP1 活性を低下させない

パータナトスにおける poly(ADP-ribose) 形成は PARP1 と呼ばれる酵素によって触媒される。そこで過酸化水素刺激に伴う PARP1 の活性化が肺炎マイコプラズマ感染によって抑制されるか調べるため、感染細胞より細胞溶解液を調整し、この細胞溶解液中でのビオチン化 NAD を基質とした poly(ADP-ribose) の形成を調べた。その結果、肺炎マイコプラズマは過酸化水素刺激に伴う PARP1 の活性化を抑制せず、肺炎マイコプラズマ単独でも PARP1 を強く活性化することが分かった ( 図 3 )。

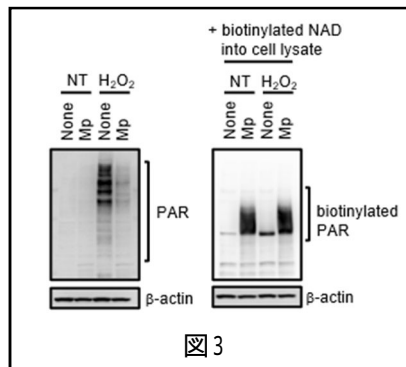


図 3

#### 4 - 5 . 肺炎マイコプラズマ感染細胞では NAD の枯渇が起きる

肺炎マイコプラズマ感染細胞では poly(ADP-ribose) の材料となる NAD が減少していることが予測されたため、細胞内 NAD 量の定量を行った。その結果、肺炎マイコプラズマ感染細胞では菌数依存的に NAD 量が減少していることが分かった ( 図 4 )。

以上の結果から肺炎マイコプラズマは自身が産生する過酸化水素によって上皮細胞が細胞死に至るのを抑制するため、パータナトスを抑制する機構を有していることが明らかとなった。生体内における同現象の役割については不明であるが、本菌の持続感染において一定の役割を果たしていると考えられる。

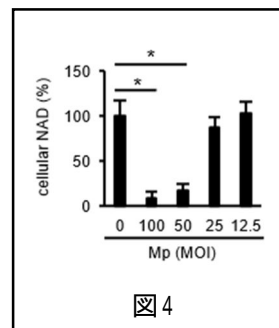


図 4

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yutaka Kida, Takeshi Yamamoto, Koichi Kuwano	4. 巻 64
2. 論文標題 SdsA1, a secreted sulfatase, contributes to the in vivo virulence of Pseudomonas aeruginosa in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 280-295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12772.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本武司、木田豊、桑野剛一
2. 発表標題 Mycoplasma pneumoniae regulates hydrogen peroxide-induced cell detachment by interfering PARP1-mediated cell death, parthanatos
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本武司、木田豊、桑野剛一
2. 発表標題 過酸化水素の産生は肺炎マイコプラズマの持続感染の妨げとなるか？
3. 学会等名 第46回日本マイコプラズマ学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------