

機関番号：37104
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：20590938
研究課題名（和文）マイコプラズマ由来リポプロテインの肺炎病態形成における機能解析と治療戦略
研究課題名（英文）Functional analysis of *Mycoplasma pneumoniae*-derived lipoproteins in pneumonia onset
研究代表者
桑野 剛一（KUWANO KOICHI）
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：60215118

研究成果の概要（和文）：

ヒトに発症するマイコプラズマ肺炎はマイコプラズマ・ニューモニアという細菌によって引き起こされます。しかし、どうして肺炎が発症するかはまだ不明です。本研究室ではマイコプラズマから分離したリポプロテインが炎症を誘導することを発見しました。そこで、本研究で私たちはこのリポプロテインが肺炎の発症においてどんな働きをしているかを調べました。その結果、このリポプロテインが動物（マウス）の肺炎発症に重要な働きをする物質であることを明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：

Mycoplasma pneumoniae is known to cause pneumonia in humans. It is, however, unclear how pneumonia occurs. Our laboratory previously reported that *Mycoplasma pneumoniae*-derived lipoproteins induce inflammatory responses. We then examined the interaction between the lipoproteins and host in order to elucidate the onset mechanisms. We found that the lipoproteins are extremely important in the onset of mycoplasma-pneumonia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸内科学

キーワード：感染症、肺炎、マイコプラズマ、炎症、リポプロテイン、TLR

1. 研究開始当初の背景

本研究室では、既にマイコプラズマがマクロファージから TNF- α の産生を誘導することを報告した (*Microbiol Immunol* 1990)。最近、当教室でマイコプラズマの膜タンパク質がマクロファージの Toll-like receptor (TLR) 2 を介して、抗菌タンパク

質を産生することを見出した (*Immunology* 2001)。さらに、マイコプラズマ由来の粗精製分画のリポタンパク質が TLR1、2、6 等を介したシグナルにより HIV の転写を増強することを発見した (*Immunology* 2004)。これらの知見から、マイコプラズマの菌体成分が宿主と深い関わりを持ち、宿主の病態形成に強く関わっていることが示唆された。

ところで、マイコプラズマ肺炎は *Mycoplasma pneumoniae* により惹起される肺炎であり、児童、若年成人を中心に発症する。*M. pneumoniae* 由来の病原因子はまだ特定されておらず、マイコプラズマ肺炎の病態は宿主の過剰な免疫反応が一因であると考えられている。ところが、このような宿主の免疫反応を引き起こす菌由来の成分については、最近まで同定されていなかった。一昨年、私どもの教室は炎症反応を引き起こす *M. pneumoniae* 由来のジアシルリポプロテインを同定し世界で初めて報告した (*J. Immunol.* 2005)。このリポプロテイン (FAM20) は TLR1、2、6 を介してシグナルを伝達した。その後、さらに *M. pneumoniae* 由来の炎症を誘導する新規のトリアシルリポプロテインを発見した。また、これらのリポペプチドを合成して、マウスの肺内に投与したところ、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の滲出細胞の増加、TNF- α 、ケモカイン等の増加の炎症反応を観察した。このように、私たちが発見したリポプロテインは強い急性期の炎症反応を誘導することができた。しかし、感染の場で、この FAM20 が、ヒトで観察されるような細胞性免疫を亢進し、気管支血管周囲間質の炎症、すなわち間質性肺炎を誘導するかは明らかでない。

本研究では、FAM20 の肺の炎症病態形成における機能、役割を明らかにするため、肺、血清中等において FAM20 を検出する。次に、FAM20 が急性炎症、および細胞性免疫を誘導して、間質性肺炎を誘導するか検証したい。また、FAM20 は、TLR のリガンドである pathogen associated molecular patterns (PAMPs) の一つであり、その活性は LPS にほぼ匹敵する。従って、マイコプラズマ由来のリポプロテインは LPS と同様に、*in vivo* においてはエンドトキシン様活性を有するか検討したい。

2. 研究の目的

本研究は申請者らが発見した *Mycoplasma pneumoniae* 由来の炎症を誘導可能なリポプロテイン (FAM20) について、おもに肺の炎症病態形成における機能、役割を解析して、さらに抗炎症 (肺炎) 治療法の開発のための基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

平成 20 年度

初年度は、申請者が発見した *M. pneumoniae* 由来の炎症を誘導可能なリポ

プロテイン FAM20 が、マイコプラズマ感染において、肺炎病態を誘導しているかを検証する。下に示す項目毎に解析する。

【*in vivo*における FAM20 の検出】

① 抗体の作製と FAM の検出：

M. pneumoniae 感染マウスにおける FAM20 の検出は ELISA あるいはウエスタンブロットで行う。ELISA を構築するために、マウスモノクローナル抗 FAM20 抗体、およびウサギポリクローナル抗 FAM20 抗体を作製する。なお、抗体作製に使用した抗原は、FAM20 ジアシルリポプロテイン (*J. Immunol.* 2005) の N 末より 20 残基のアミノ酸をもつ合成リポペプチドに KLH を結合させたものを使った。これらの抗体を使った ELISA により FAM20 を定量する。

もし、FAM20 の存在が明らかになれば、研究対象を拡げてマイコプラズマ肺炎患者の血清中に抗 FAM20 抗体が存在するか検討したい。さらに、急性期の肺炎患者で血清中に FAM20 が存在するかも大きな興味の一つである。

② 組織中の FAM20 の検出：

肺などの組織中の FAM20 の検出には上記の抗体を使用して、免疫染色 (間接法) によって検出する。使用する動物は抗体由来動物種を考慮して、マウス、ハムスター等を予定している。また、肺組織のホモジネート中の FAM20 を検出するためウエスタンブロットで行う。

マイコプラズマは組織侵入性を有しないとされるが、組織中で FAM20 がフリーの状態、あるいはマイコプラズマ菌体中存在するか確認するため、抗マイコプラズマ抗体で二重染色をして確認する。

【FAM20 の機能解析】

① FAM20 による細胞性免疫誘導：

M. pneumoniae 感染マウスにおける間質性肺炎の病態は IL-18 が誘導する Th1 サイトカインの優位性によって惹起されると報告されている (*Chest* 121: 1493, 2002)。そこで、FAM20 (上記の合成リポペプチド) をマウス (BALB/c または C57BL/6) に経鼻的に単回、あるいは複数回投与して、BALF、血清中、組織ホモジネート液中の IL-18, IL-12, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-6 等のサイトカインを ELISA、RT-PCR 等で調べて、Th1 サイトカインの優位性を検証する。

平成 21 年度以降

前年度に引き続き FAM20 の機能解析、および病態解析、およびマイコプラズマ肺炎の抗炎症治療の基盤的研究を行う。

【FAM20 の機能解析】

① FAM20 による肺炎の誘導：

上記のように、FAM20 をマウスに経鼻的に投与後（単回～複数回）、間質性肺炎（気管支血管周囲間質への炎症細胞の浸潤等）が誘導されているか、肺を摘出してその病理組織学的検討を行う。

② FAM20 の諸臓器への影響：

M. pneumoniae 感染において、肺炎以外に、中耳炎、無菌性髄膜炎、脳炎、肝炎、等の合併症があり、特に一過性の肝機能障害は 30-40% の頻度で認められる。そこで今回、肝臓に焦点を絞り、FAM20 の肝機能への影響を検討する。肝機能のマーカーである AST、ALT を定量する。

③ FAM で誘導される抗菌ペプチド CRAMP の病態における役割の解析：

Mp 感染時、気管支肺胞洗浄液（BALF）中へ高濃度の抗菌ペプチド CRAMP が分泌される。抗菌ペプチドは、抗菌活性を発現することにより感染防御に貢献することが知られている。一方、CRAMP にはケモカイン活性を有することが報告されている。感染初期には、CRAMP のケモカイン活性により好中球等の浸潤による肺炎病態の形成が誘導されると予想される。ここでは、CRAMP ノックアウトマウスを入手してその病態形成における役割を解析する。

4. 研究成果

(1) Mp 由来リポプロテイン (FAM, N-ALP-1, N-ALP-2) に対する抗体作製

①ウサギポリクローナル抗体の作製：

①FAM 抗体：FAM の 180 アミノ酸配列から 2 箇所、抗体エピトープ（aa123-140、aa162-180）を選択してその配列のペプチドを合成して、それぞれウサギ、モルモットへ免疫して、抗血清を得た。抗体価は、抗原ペプチドを固相化した直接 ELISA 法により数千倍であった。また、血清はウエスタンブロット（WB）で抗原（21kDa）を検出することを確認した（図 1）。②N-ALP1 抗体：FAM と同様に、ウサギ抗血清（aa68-84）、モルモット抗血清（aa312-328）を得た。WB で抗原（37kDa）検出を確認した。③N-ALP2 抗体：同様に、ウサギ抗血清（aa64-80）、モルモット抗血清（aa49-63）を得た。ウサギ抗血清は WB で抗

原（35kDa）を検出したが、モルモット抗血清は明確なバンド（35kDa）を検出しなかった。

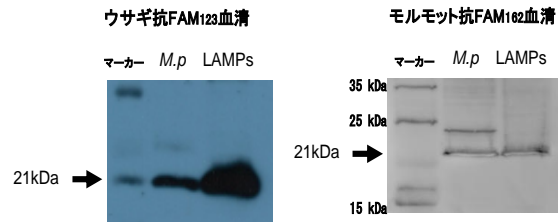


図1ウエスタンブロットによるFAM抗原の検出

②マウスモノクローナル抗体（MAB）の作製：

FAM に対しては、その配列から 2 箇所、抗体エピトープ（aa123-140、aa162-180）を選択して、これらに対するマウスモノクローナル（MAB）抗体の製作に成功した。前者エピトープに対しては、13 株（IgG アイソタイプ：12 株、IgM アイソタイプ：1 株）、後者に対しては 8 株（IgG：5 株、IgM：3 株）の細胞株を樹立した。

(2) FAM, N-ALP-1, N-ALP-2 を検出する

ELISA の構築：

①FAM の検出：

ウサギ抗体（FAM の aa123-140）を CA（吸着）抗体、モルモット抗体（FAM の aa162-180）を DE（検出）抗体とすることにより構築し、FAM 抗原を検出することができた。*M. pneumoniae* (Mp) 生菌を検出するためには、界面活性剤による前処理が必要であった。*M. penetrans*、*M. genitalium* とは反応しなかった。さらに、生菌を標的抗原として感度を検討したところ、20,000CFU 前後まで、検出可能であった。*in vivo* の急性感染系における Mp 感染マウスの気管支肺胞洗浄液（BALF）中の FAM 抗原を検出できた（図 2）。

②N-ALP-1, N-ALP-2 の検出：

FAM と同様にエピトープ 1 および 2 の組み合わせで ELISA の構築を試みたが、特異的に抗原を検出することができなかった。

③Mab を使った FAM を検出する ELISA の構築：

次に、Mab を使った ELISA の構築を試みた。aa123-140 を認識する Mab アイソタイプを CA 抗体として使用した場合のみ、抗原を特異的に検出できた。しかし、その感度は、ウサギポリクローナル抗体を使った ELISA の感度より明らかに低かった。

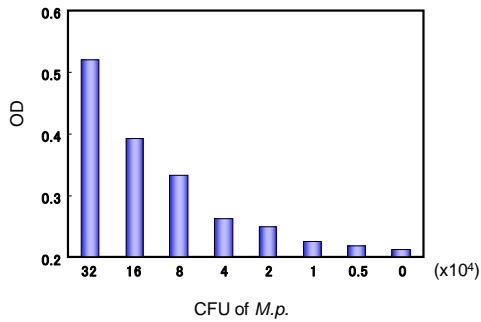


図2 ELISAの感度:吸光度とCFUについて

(3) Mp 感染細胞における FAM, N-ALP-1, N-ALP-2 の免疫染色による検出:

次に、Mp 感染細胞系で、ウサギポリクローナル抗体を使った免疫蛍光抗体法で FAM, N-ALP-1, N-ALP-2 等の検出を行った。Mp 感染細胞、および分離した FAM 処理細胞で、シグナルは弱いですが FAM を検出した。感染マウス肺組織でも同様に、免疫蛍光抗体法を試みたが、検出できなかった。一方、ウサギ抗 N-ALP-1 抗体は、Mp 感染細胞の抗原を検出した。また、Mp 感染肺組織では、単球、および好中球の抗原を検出することができた。しかし、ウサギ抗 N-ALP-2 抗体については、Mp 感染細胞、Mp 感染肺組織の Mp 抗原を検出できなかった。

MAb では、FAM の aa123-140 を認識する IgM アイソタイプ抗体のみが Mp 感染細胞の抗原を検出した。予想に反して、IgG アイソタイプ抗体はすべて、Mp 感染細胞を認識できなかった。

(4) in vivo における FAM の機能解析:

FAM の合成リポペプチドである FAM20 を経鼻的に投与すると、24 時間後に気管支内、および気管支周囲に炎症細胞の著明な浸潤を認めた。一方、FAM20 を腹腔内、あるいは静脈内へ投与してもガラクトサミン前処理マウスが致死することはなかった。また、肝機能傷害のマーカーである AST, ALT 等の上昇を観察できなかった。

(5) in vitro における抗 FAM, N-ALP-1 抗体の中和機能解析:

ワクチン開発を最終目的として、抗体による炎症性サイトカインの抑制を検証した。合成リポプロテインによるサイトカイン産生系に上記の抗体を添加した。しかし、現在までに、特異的な抑制効果は得られていない。

(6) Mp 感染時に誘導される抗菌ペプチドの解析:

Mp 感染後 24 時間の肺胞洗浄液 (BALF) 中で抗菌ペプチド CRAMP を ELISA (図 3)、および WB で検出した。また、感染時の BALF

への浸潤細胞数を野生マウス (BALB/c)、CRAMP^{-/-}で比較すると、CRAMP^{-/-}で細胞数が低い傾向を観察した。現在、種々の炎症性サイトカインの産生の違いも得られている。今後、詳細な検討を実施したい。

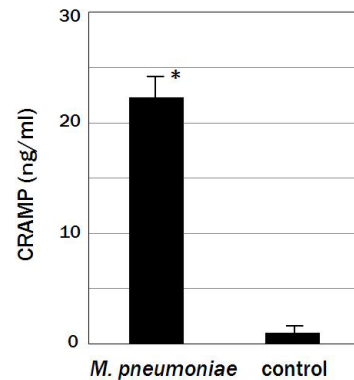


図3 BALF 中の CRAMP (control は非感染)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

① Kida Y, Shimizu T, and Kuwano K. Cooperation between LepA and PlcH contributes to the in vivo virulence and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect Immun.* 79:211-219 (2011) 査読有

② Shimizu. T, Kida. Y, Kuwano. K Cytoadherence-dependent induction of inflammatory responses by *Mycoplasma pneumoniae*. *Immunology* 133:51-61 (2011) 査読有

③ Taira J, Kida Y, Yamaguchi H, Kuwano K, Higashimoto Y, Kodama H Modifications on amphiphilicity and cationicity of unnatural amino acid containing peptides for the improvement of antimicrobial activity against pathogenic bacteria *Journal of peptide science* 16: 607-612 (2010) 査読有

④ 北崎宏平, 馬場武志, 古賀康弘, 桑野剛一, 以下 14 名省略 ナイシン A を利用した酪農分野における牛感染症防除 FFI ジャーナル 215: 449-456 (2010) 査読有

⑤ 桑野剛一, 清水隆 *Mycoplasma pneumoniae* リポプロテインを標的抗原とした ELISA の構築 日本マイコプラズマ学会雑誌 36: 4-5 (2009) 査読無

⑥ 清水隆, 木田豊, 桑野剛一 接着に依存的

な *Mycoplasma pneumoniae* の炎症誘導 日本マイコプラズマ学会雑誌 36 : 13-15 (2009) 査読無

⑦ Shimizu T, Kida Y, Kuwano K *Mycoplasma pneumoniae*-derived Lipopeptides Induce Acute Inflammatory Responses in the Lungs of Mice. *Infect Immun.* 76:270-277 (2008) 査読有

⑧ Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol.* 10 1491-1504 (2008) 査読有

⑨ Shimizu T, Kida Y, Kuwano K *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF-kappaB through TLR1, TLR2 and TLR6 *Microbiology* 154: 1318-1325 (2008) 査読有

⑩ 清水隆、木田豊、桑野剛一 *Ureaplasma parvum* 由来リポタンパク質による Toll-like receptor シグナルの活性化 日本マイコプラズマ学会雑誌 35 : 73-74 (2008) 査読無

⑪ Shimizu T, Kida Y, Kuwano K A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF-kappaB through Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2. *Infect Immun.* 76: 3672-3678 (2008) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 桑野剛一、清水隆、木田豊
マイコプラズマ感染における CRAMP の意義の検討 第 83 回日本細菌学会総会 平成 22 年 3 月 28 日 横浜

② 清水隆、木田豊、桑野剛一
Mycoplasma pneumoniae の接着に依存的な炎症誘導。第 37 回日本マイコプラズマ学会、平成 22 年 6 月 10 日 東京 国立感染症研究所

③ 桑野剛一、清水 隆
Mycoplasma pneumoniae リポタンパク質を標的抗原とした ELISA の構築。第 36 回日本マイコプラズマ学会、平成 21 年 6 月 4 日、北海道大学 (百年記念館)

④ 清水隆、木田豊、桑野剛一
Mycoplasma genitalium 由来リポタンパク質による Toll-like receptor シグナルの活性

化 第 82 回日本細菌学会総会 平成 21 年 3 月 13 日 名古屋国際会議場

⑤ 清水隆、木田豊、桑野剛一
Ureaplasma parvum 由来リポタンパク質による Toll-like receptor シグナルの活性化。第 35 回日本マイコプラズマ学会、平成 20 年 5 月 30-31 日 東京大学 (弥生講堂)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: マイコプラズマ感染症用ワクチン組成物

発明者: 桑野剛一、清水 隆

権利者: 学校法人 久留米大学

種類: 特許願

番号: 2008-136011

出願年月日: 平成 20 年 5 月 23 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/micro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 剛一 (KUWANO KOICHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 60215118

(2) 研究分担者

清水 隆 (SHIMIZU TAKASHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 40320155

木田 豊 (KIDA YUTAKA)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 30309752