

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591298

研究課題名（和文） マイコプラズマ肺炎のマウスモデルの解析と治療への応用

研究課題名（英文） Analysis on mouse model of Mycoplasma pneumoniae pneumonia, and its application to treatment.

研究代表者

後藤 元 (GOTO HAJIME)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80134617

研究成果の概要（和文）：

肺炎マイコプラズマの菌体成分 Mp extract を用いて、マイコプラズマ肺炎マウスモデルを作成し、解析した。培養細胞の研究により、Mp extract は、p38、PI-3K、NF- κ B などの細胞内シグナル伝達を賦活化することが判った。マウス肺の組織学的所見では、本マウスは、重症型のマイコプラズマ肺炎と考えられた。ステロイドやクラリスロマイシンは、本マウスの炎症に影響を及ぼしたが、そのパターンから、マイコプラズマ肺炎が NF- κ B 依存性および NF- κ B 非依存性の宿主免疫の過剰反応を惹起している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We generate a mouse model for Mycoplasma pneumoniae pneumonia, using M. pneumoniae extract (Mp extract). Cell culture experiments demonstrated that Mp extract activated intracellular signals, associated with p38, PI-3K and NF- κ B. Mouse model histologically yielded the severe human M. pneumoniae pneumonia, as both share lymph-plasma cytic peri-bronchovascular infiltration. Our results on the effect of either dexamethasone, clarithromycin or both further demonstrated that Mycoplasma pneumoniae infection caused both NF- κ B-dependent and NF- κ B independent reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011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・感染症内科学

キーワード：感染症治療学

1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマ肺炎患者の臨床的観察より、マイコプラズマ肺炎は「宿主免疫反応」の過剰な反応であることが推定された。マイコプ

ラズマ肺炎をマクロライド系抗菌薬で治療する」ということは、実は、「肺炎マイコプラズマ感染が惹起した宿主免疫の過剰反応をマクロライドの免疫調整作用により、制御することである。」という仮説を立てた。本

仮説に基づき、モデルマウスを作成、解析、さらに応用について検討することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、マイコプラズマ肺炎のマウスモデルを作成し、そのモデルを応用してクラリスロマイシンの「抗炎症修飾」作用について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

[方法] マイコプラズマ肺炎マウスモデルを作成し解析した。

I. マウスの処理

(1) モデルの作成

マイコプラズマ抽出液 Mp extract の作成：肺炎マイコプラズマ *Mycoplasma pneumoniae* を PPL0 培地で増殖させ、集菌する。菌体を洗浄し、HBSS バッファーに浮遊させ、超音波にて菌体を破碎し、遠心にて不溶物をじよ寄与することにより、抽出液を作成し Mp extract と命名した。Mp extract を Alum adjuvant と一緒に腹腔内に1週間隔で2回注射を行い、さらに2週間後に経気管的に Mp extract を投与することにより、肺炎モデルを作成した。

(2) ステロイドおよびマクロライドの効果

ステロイドおよびマクロライドの炎症に対する影響を明らかにするため、Dexamethasone、Clarithromycin あるいは両者を上記のマウスモデルに投与した。

(3) RAW264.7 の解析

より単純な反応系におけるステロイドやマクロライドの影響を検討するため、マクロファージ系の培養細胞 RAW264.7 細胞を培養し、LPS にて刺激を行った。この LPS の刺激が作動する細胞内シグナル伝達を検討するため、SB203580 (p38 の阻害薬)、LY294002 (PI-3K の阻害薬)、Parthenolide (NF-kB の阻害薬) を投与し IL-6 および TNF-a の誘導への影響を検討した。さらに、Dexamethasone や Clarithromycin の影響を見るため、LPS で刺激した両薬物の影響を検討した。

II. 解析

マウスの解析は以下の通り行った。

(1) 組織学的解析

マウス肺の炎症が、組織学的にどのような状況であるかを検討するため、上記のモデルマウス肺をホルマリン固定し、3 μ m 厚のスライドを作成、HE 染色にて検討を行った。

(2) 気管支肺胞洗浄

HBSS により気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage (BAL) を行った。全肺当たりの総細胞数を数えるとともに、好中球、マクロファージ、リンパ球、その他に分類し、各分画についても量的評価を行った。

(3) タンパク濃度の測定

また、BAL 液中のサイトカインについて、あるいは、RAW264.7 細胞の培養液上清について、評価した。タンパク濃度は、Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)、あるいは、IL-6, TNF-a, monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), IL-17, IL-23, macrophage inflammatory protein-1a (MIP-1a), KC, interferon-g (IFN-g), RANTES を、SearchLight proteome arrays SearchLight および Imaging System を用いたビーズ法による網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1) Mp extract による本マウスモデルは、リンパ形質細胞が気道周囲に集簇し、重症のマイコプラズマ肺炎と似た組織像を示すことが判った。

(2) さらに、RAW264.7 細胞の培養液の検討では、p38、PI-3K、NF-kB、いずれの細胞内シグナル伝達系をも作動させることが判った。ステロイドはこれらの反応を抑制することが示されたが、クラリスロマイシンは、更新させる働きが一部に認められた。

(3) 一方、ステロイドとクラリスロマイシンの投与によるマイコプラズマ肺炎モデルへの影響の網羅的検討では、両者への反応のパターンから、IL-6、TNF-a、MIP-1a、MCP-1、RANTES と残りの IL-17、IL-23、KC、IFN-g の二通りに分類されることが判った。本結果より、マイコプラズマ肺炎が NF-kB 依存性 (IL-6、TNF-a、MIP-1a、MCP-1、RANTES) および NF-kB 非依存性 (IL-17、IL-23、KC、IFN-g) の宿主免疫の過剰反応を惹起している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 和田裕雄、大西宏明、後藤元 「マイコプラズマ感染症の診断：新しい LAMP 法による診断について」 Laboratory and Clinical Practice 2012; 29: 91-98.

② Hirao S, Wada H, Nakagaki K, Saraya T, Kurai D, Mikura S, Yasutake T, Higaki M, Yokoyama T, Ishii H, Nakata K, Akashi T, Kamiya S and Goto H. “Inflammation provoked by Mycoplasma pneumoniae extract: implications for combination treatment with clarithromycin and dexamethasone” FEMS Immunology & Medical Microbiology 2011; 62: 182-189.

③ Saraya T, Nakata K, Nakagaki K, Motoi N, Iihara K, Fujioka Y, Oka T, Kurai D, Wada H, Ishii H, Taguchi H, Kamiya S and Goto H. “Identification of a mechanism for lung inflammation caused by Mycoplasma pneumoniae using a novel mouse model.” Results in Immunology 2011; 1: 76-87.

[学会発表] (計 件)

<2010 年>

① 平尾晋、和田裕雄、檜垣学、安武哲生、三倉真一郎、皿谷健、倉井大輔、中垣和英、明石敏、神谷茂、後藤元 「クラリスロマイシンとデキサメサゾンの共投与がマイコプラズマ肺炎モデルへ及ぼす影響の検討」第 48 回日本呼吸器学会総会 (2010 年 4 月 25 日京都)

② 和田裕雄、平尾晋、三倉真一郎、安武哲生、檜垣学、倉井大輔、皿谷健、石井晴之、明石敏、中垣和英、神谷茂、後藤元 「マイコプラズマ抽出液の刺激による RAW264.7 細胞の IL-6 および TNF- α 産生炎症惹起作用の検討」第 48 回日本呼吸器学会総会 (2010 年 4 月 25 日 (京都))

③ 倉井大輔、和田裕雄、皿谷健、中垣和英、神谷茂、藤岡保範、後藤元 「マイコプラズマ肺炎マウスモデルにおける IL-23 の関与について」第 48 回日本呼吸器学会総会 (2010 年 4 月 25 日 (京都))

<2009 年>

④ Hirao S, Wada H, Mikura S, Saraya T, Kurai D, Akashi T, Nakagaki K, Kamiya S, Goto H. Co-treatment with clarithromycin and dexamethasone on murine Mycoplasma pneumoniae pneumonia

model. Eur Respir J 2009; 34: 360s presented in ERS 2009 in Vienna, 14 Sep 2009, P2098

⑤ Wada H, Hirao S, Mikura S, Saraya T, Kurai D, Akashi T, Nakagaki K, Kamiya S, Goto H. Mycoplasma pneumoniae extract induced IL-6 and TNF-alpha production by RAW264.7 cells. Eur Respir J 2009; 34: 370s, presented in ERS 2009 in Vienna, 14 Sep 2009, P2148

⑥ 平尾晋、和田裕雄、皿谷健、三倉真一郎、倉井大輔、石井晴之、中垣和英、明石敏、後藤元 「マイコプラズマ菌体抽出物による炎症反応に対するクラリスロマイシンの効果について」第 83 回日本感染症学会総会 (2009 年 4 月 23 日 東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/respir-med/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 元 (GOTO HAJIME)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：80134617

(2) 研究分担者

和田 裕雄 (WADA HIROO)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号：50407053

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：