

令和 6 年 9 月 17 日現在

機関番号：83201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08503

研究課題名(和文)血清型による侵襲性肺炎球菌感染症の発症機序に関する研究

研究課題名(英文) Study on pathogenesis of invasive pneumococcal disease by different serotypes

研究代表者

大石 和徳(Oishi, Kazunori)

富山県衛生研究所・その他部局等・所長

研究者番号：80160414

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)：我々は血液脳関門バリアのモデルとして、ヒト微小脳血管内皮細胞(TY09)を培養したトランスウェルチャンバーを用いて、肺炎球菌血清型による侵襲性の違いについて検討した。血清型23A(0.38)のBacterial transcytosis(BT:%)は、血清型3(0.03)や血清型12F(0.14)と比べ有意に高かった。また、血清型10A(0.31)のBT(%)も血清型3より有意に高かった。これらの結果から、血清型により血液脳関門バリアの通過能が異なり、特に血清型23A、10Aは細胞間移動能が高く、血液脳関門バリアを通過して髄膜炎を発症しやすいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌血清型による侵襲性ポテンシャルに違いあることは知られているが、この所見に関する菌側の科学的知見はほとんど無い。本研究で示した血清型10A、23Aがヒト微小脳血管内皮細胞の細胞間移動能が高い所見は、これらの血清型が成人で髄膜炎を発症しやすい疫学所見を支持しており学術的意義、また社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：A recent study reported that pneumococcal serotypes of 10A and 23A were associated with a high risk of developing bacterial meningitis among adults (Chang B, Sci Rep, 2022). We investigated the differences of invasiveness by pneumococcal serotypes using an in vitro Transwell chamber where the human brain microvascular endothelial cells (TY09 cells) were cultured as a model of cerebrospinal fluid barrier. The %BT (mean) differed between serotypes: Serotype 23A (0.38) was significantly higher than serotypes 3 (0.03) and 12F (0.14). Serotype 10A (0.31) was also significantly higher than serotype 3. Our results may suggest that the capability of bacterial transcytosis differs by serotypes, and pneumococcal strain with serotypes 10A or 23A are highly capable of passing the cerebrospinal fluid barrier, leading to the development of bacterial meningitis.

研究分野：感染症学、細菌学

キーワード：肺炎球菌 血清型 侵襲性ポテンシャル ヒト微小脳血管内皮細胞 細胞間移動能 血液脳関門バリア 髄膜炎

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

主要な呼吸器病原性菌である肺炎球菌は通常乳幼児の鼻咽腔に保菌されており、しばしば侵襲性肺炎球菌感染症(invasive pneumococcal disease: IPD)を発症する。IPDの病型は肺炎、髄膜炎、巣症状のない菌血症など多様であり、成人IPDにおける致命率は20%と高い。また、本菌はその表層の莢膜ポリサッカライドの生化学的構造の違いにより100種類の血清型が存在し、血清型によって菌の侵襲性(菌が無菌部位に侵入すること)は60倍も異なるとされている(Brueggemann AB, et al. J Infect Dis, 2003)。血液中に侵入した肺炎球菌は血流脳関門(BBB)を通過し、髄膜炎を発症する。また、肺炎球菌の菌血症、髄膜炎発症における菌の細胞付着、侵入、細胞間移動過程の解析にトランスウェルチャンバーを用いた細胞培養系が有用なツールとなっている(Brissac T, Orihuela CJ. Methods Mol Biol, 2019)。

我々は国内の成人IPDサーベイランスにおいて、血清型10A、23Aが統計学的に有意に髄膜炎発症リスクが高いことを報告した(Chang B, et al. Sci Rep, 2022)。

このような背景から、本研究では、成人IPDの疫学所見から判断して、血清型としては、菌血症・髄膜炎を起こす割合の高い12F、10A、23A (高侵襲性と想定)、また菌血症・髄膜炎を起こす割合の低い血清型3、19A (低侵襲性と想定)を使用した。

また、生体内関門細胞の通過時に発現する細胞のRNA-seq解析により、肺炎球菌の侵襲性に関与する生体内関門細胞に発現する膜蛋白質を同定することが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳微小血管内皮細胞(TY09)を用いた *in vitro* 細胞培養系において、高侵襲性(12F、10A、23A)および低侵襲性(3、19A)と考えられる血清型のBlood-CSF barrierの通過能力を評価する。

### 3. 研究の方法

脳微小血管内皮細胞(TY09細胞:Sano Y, et al. J Cell Physiol, 2010)を使用した。TY09細胞をトランスウェルチャンバーのインサート(3 $\mu$ mポア)上で一晩培養し、上層に血清型の異なる肺炎球菌を接種し、300xg、5分遠心後に、1時間静置し(上層にはgentamicin 20 $\mu$ g/ml添加)上層から下層に移動した菌数をカウントし、経細胞間移動(bacterial transcytosis, BT%)を算定する。

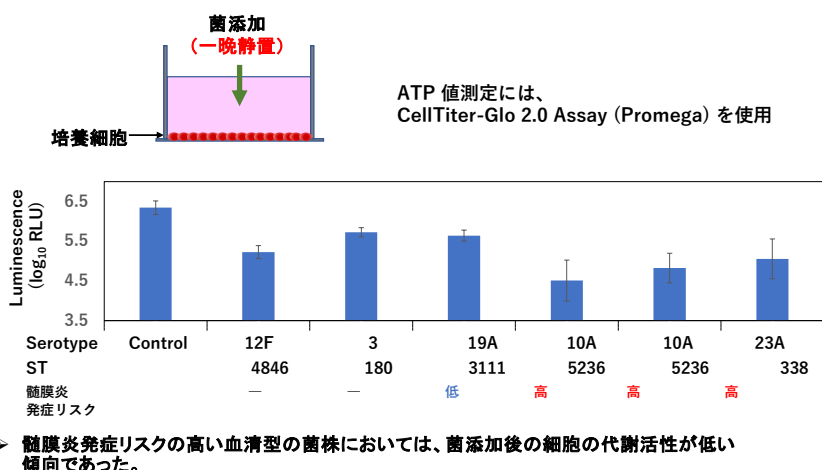
また、TY09細胞をカルチャープレート上で一晩培養し、上層に血清型の異なる肺炎球菌を接種し、300xg、5分遠心後に、1時間静置後に細胞外の菌を溶菌し、細胞内の菌数をカウントし、細胞内侵入能(bacterial invasion, BI%)を測定した。

TY09細胞の細胞障害性機能を評価した(予備実験1)。血清型による差は明らかではなかった。

予備実験1.

TY09 細胞における肺炎球菌の細胞傷害性評価 (Cell Viability Assay)

肺炎球菌を TY09 細胞に添加し、代謝活性を有する細胞の指標である ATP を定量

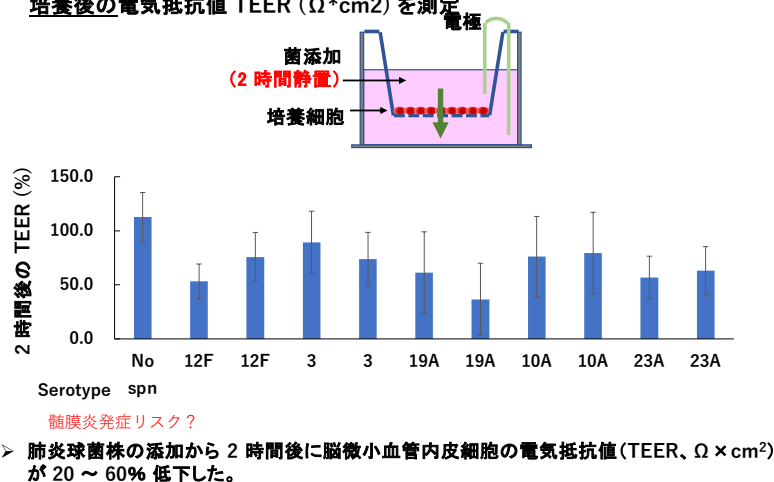


TY09 細胞に肺炎球菌を添加し、菌添加 2 時間後の電気抵抗値を測定した (予備実験 2)。肺炎球菌株添加 2 時間後に TY09 細胞の電気抵抗値が 20~60%低下したが、血清型による有意な違いはなかった。

予備実験2.

TY09 細胞のバリア機能評価

Bacterial Transcytosis (BT) における脳微小血管内皮細胞 (TY09) の 2 h 培養後の電気抵抗値 TEER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) を測定

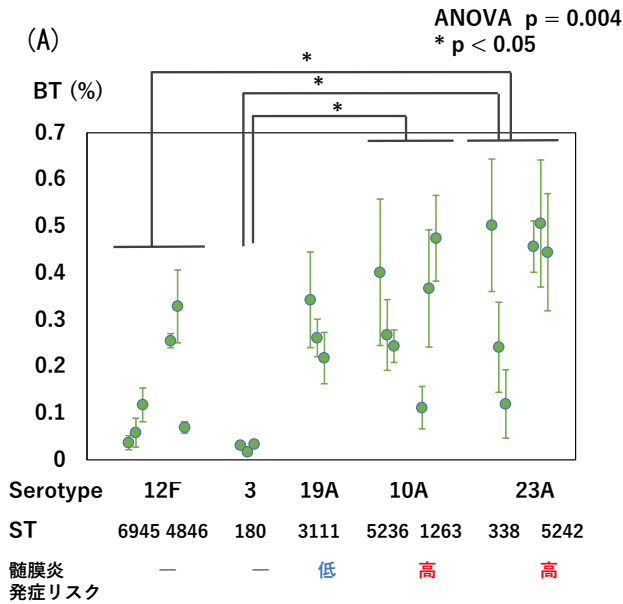


RNA-seq 解析について、TY09 細胞と肺炎球菌の生菌を 1 時間インキュベートし、細胞を洗浄後に RNA を抽出し、既報 (Tsuneki H, et al. Nat Metab, 2022) に従い解析した。

4. 研究成果

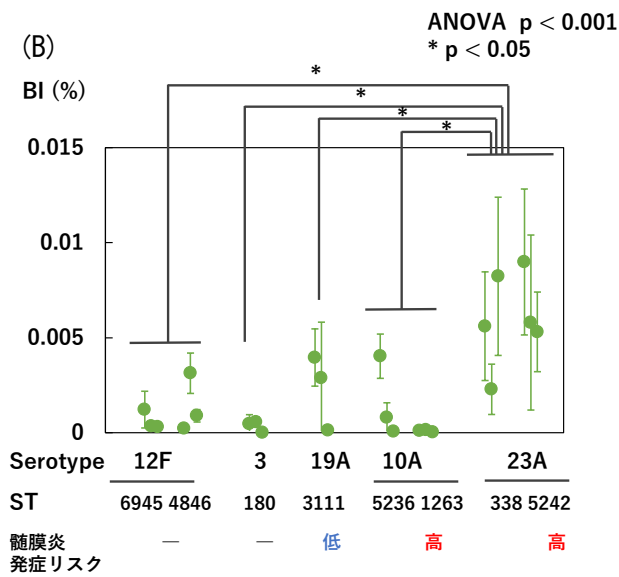
(1) 血清型別の Bacterial transcytosis の評価

Bacterial transcytosis (BT) (%) の測定では、血清型 23A (0.38) は血清型 3 (0.03) や血清型 12F (0.14) に比べ有意に高かった。また、血清型 10A (0.31) も血清型 3 より有意に高かった (図 A)。



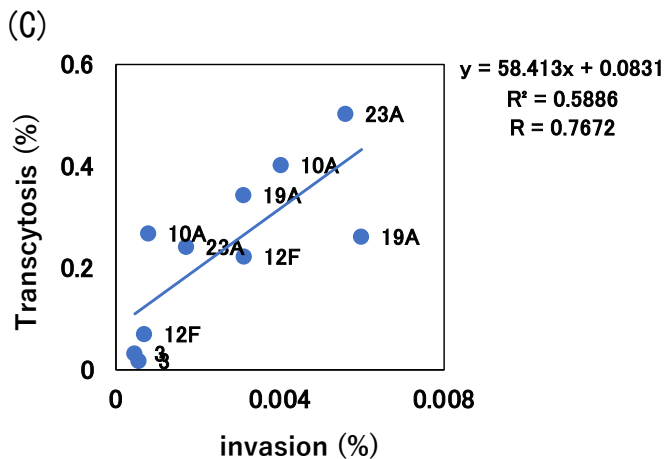
(2) 血清型別の Bacterial invasion の評価

BI (%) は血清型 23A (0.006) は他の 4 血清型 [血清型 3 (0.0003), 10A (0.0009), 12F (0.001), 19A (0.0023)] より有意に高かった (図 B)。



(3) Bacterial transcytosis と Bacterial invasion の相関

BT (%) と BI (%) は有意な正相関を示した。また、BI (%) は BT (%) の約 1/100 であった (図 C)。



#### (4) RNA-seq 解析結果

Principal component analysis、Heatmap の結果から、血清型 23A、血清型 3 添加群は、コントロール群と比較して、TY09 における遺伝子発現変動が顕著に認められた。肺炎球菌存在下で up-regulation された pathway が複数検出され、とりわけミトコンドリアにおける代謝経路の活性化が認められた。血清型 23A、血清型 3 添加群間における発現遺伝子種の差異は認められなかった。

#### (5) 考察

成人 IPD のリスク因子としては、宿主の糖尿病、慢性肺疾患、慢アルコール多飲等の基礎疾患、免疫不全状態等の宿主要因がある。しかしながら、背景で述べたように肺炎球菌の血清型によっても侵襲性が大きく異なることが判っている。本研究は、*in vitro*における肺炎球菌の粘膜バリアである TY09 細胞の BT、BI を評価し、その髄膜炎発症との関連性について評価した。複数の血清型の肺炎球菌株の BT と BI は正相関をすること、BI は BT の 1/100 と小さいことから、BT は paracellular route を介していることが推察された (Devraj G, et al. Acta Neuropathol, 2020).

#### (6) 結論

*In vitro* BT(%), BI(%)の測定から、血清型により血液脳関門バリアの通過能が異なり、特に血清型 23A, 10A は細胞間移動能が高く、血液脳関門バリアを通過しやすい可能性が示唆された。この結果は成人 IPD の疫学データにおいて、血清型 23A, 10A が髄膜炎発症のリスクが高いとする疫学所見を支持している。

#### <引用文献>

- ① Brueggemann AB, et al. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clonal- specific differences in invasive disease potential. J Infect Dis 2003, 187(9): 1424-32.
- ② Chang B, et al. Pneumococcal meningitis in adults in 2014-2018 after introduction of pediatric 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Japan. 2022, 12: 3066.
- ③ Sano Y, et al. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. J Cell Physiol 2010, 225(2):519-28.
- ④ Devraj G, et al. HIF-1 $\alpha$  is involved in blood-brain barrier dysfunction and paracellular migration of bacteria in pneumococcal meningitis. Acta Neuropathol 2020, 140(2): 183-208.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamura K, Chang B, Shimbashi R, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Oshima K, Maruyama T, Fujita J, Abe S, Kasahara K, Nishi J, Kubota T, Kinjo Y, Fujikura H, Fukusumi M, Shimada T, Sunagawa T, Suzuki M, Yamamoto Y, Oishi K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Dynamic changes in clinical characteristics and serotype distribution of invasive pneumococcal disease among adults in Japan after introduction of the pediatric 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in 2013-2019.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 3338-3344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2022.04.062.	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 -

1. 著者名 1)Chang B, Tamura K, Fujikura H, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Fujita J, Oshima K, Maruyama T, Abe S, Kasahara K, Nishi J, Kubota T, Kinjo Y, Serizawa Y, Shimbashi R, Fukusumi M, Shimada T, Sunagawa T, Suzuki M, Oishi K.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Pneumococcal Meningitis in Adults in 2014-2018 after Introduction of Pediatric 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06950-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金谷潤一、前西絵美、田村恒介、磯部純子、大石和徳.
2. 発表標題 進化する肺炎球菌：診断、病原性、次世代ワクチン.肺炎球菌の経細胞間移動能および細胞間侵入能の評価.
3. 学会等名 第96回日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jun-ichi Kanatani, Emi Maenishi, Junko Isobe, Kazunori Oishi.
2. 発表標題 Bacterial transcytosis of Streptococcus pneumoniae across the host cells: an in vitro model for analysis of invasive potential
3. 学会等名 The 3rd Asian Pneumococcal Symposium (国際学会)
4. 発表年 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	金谷 潤一  (Kanatani Jun-ichi)  (80463131)	富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員   (83201)	
研究分担者	磯部 順子  (Isobe Junko)  (10421893)	富山県衛生研究所・細菌部・上席専門員   (83201)	
研究分担者	安居 輝人  (Yasui Teruhito)  (60283074)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 感染症制御プロジェクト・プロジェクトリーダー   (84420)	

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