

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20718

研究課題名（和文）マイコプラズマニューモニエ由来CARDS toxinの機能解明とワクチン応用

研究課題名（英文）The Role of CARDS Toxin from *Mycoplasma pneumoniae* in Pathogenesis and Vaccine Development

研究代表者

民谷 繁幸 (Tamiya, Shigeyuki)

和歌山県立医科大学・薬学部・助教

研究者番号：90908203

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺炎の主たる原因菌の1つである *Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ) の炎症惹起機序の解明および新規ワクチン開発を目的として検討を行った。その結果、マイコプラズマ由来外毒素である CARDS toxin が、炎症因子として肺炎を誘発するのみならず、接着因子として、マイコプラズマの上皮細胞への接着にも寄与することを見出した。また、CARDS toxin が感染・炎症誘発の双方を抑制可能な新規ワクチン抗原として有用であることも明らかとしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、マイコプラズマ感染時における CARDS toxin の新規機能を明らかとしており、今後のマイコプラズマ研究の礎になると思われる。また今後、新たな薬剤耐性マイコプラズマの出現が示唆されており、さらに治療薬の選択が困難になると予想される。そのため、感染そのものを予防するワクチンの開発が待望されているものの、未だその開発には至っていない。本研究は、新規治療薬・ワクチン開発に向けた基盤情報となり得ると期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we found that CARDS toxin, an exotoxin derived from *Mycoplasma pneumoniae* (*Mycoplasma*), not only induces pneumonia as an inflammatory factor but also contributes to adhesion of *Mycoplasma* to epithelial cells as an adhesion factor. In addition, our results suggest that CARDS toxin is useful as a novel vaccine antigen that can inhibit both infection and inflammation.

研究分野：細菌学、免疫学、ワクチン学

キーワード： *Mycoplasma pneumoniae* 肺炎 CARDS toxin ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

*Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ) に起因した肺炎は、市中肺炎の約 40% を占め、数週間にも及ぶ乾性咳嗽を引き起こすのみならず、気管支喘息の発症・悪化の原因となることも少なくない。また、小児において好発・重篤化しやすく、小児罹患者の約 20% が入院を余儀なくされるなど、特に小児領域において問題となる呼吸器感染症である。また、2011 年の流行期において、検査検体の約 70% で第一選択薬に対する耐性菌が検出されたこと、副作用の観点から小児に対して使用可能な治療薬が限局されたこと、さらには、予防可能なワクチンが実用化されていないことも相まって、患者数が爆発的に増加し、大きな社会問題を引き起こした。しかし、治療薬およびワクチンの開発が未だ滞っており、その最大の理由として、感染成立に必須である、マイコプラズマの上皮細胞への接着に寄与する因子の全貌が不明であること、肺炎病態における炎症惹起メカニズムが不明であることが挙げられる。本観点から申請者は、その解明を試み、感染に伴い浸潤した好中球が、肺炎病態を形成する中心的細胞であり、さらに、マイコプラズマの排除には寄与しないことから、マイコプラズマ肺炎を抑制するための治療標的となり得ることを先駆けて見出した。さらに、好中球浸潤メカニズムを追及し、マイコプラズマ菌体成分であるリポ蛋白質が Toll 様受容体 2 (TLR2) リガンドとして作用し、肺胞マクロファージからの炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$  および IL-12 p40 の誘導を促進し、好中球を浸潤させることを見出した。また、詳細な機能が不明であった、マイコプラズマ由来外毒素である分泌型 CARDS toxin が、TLR2 非依存的に好中球浸潤を誘発することも明らかとした。さらにその過程で、本申請研究の萌芽的知見として、分泌型のみならず、マイコプラズマ表面にも CARDS toxin が存在し、マイコプラズマと上皮細胞との接着を担う可能性をも先駆けて見出している。本知見は、CARDS toxin が、上記を解明するための中心的因子であり、炎症因子のみならず、接着因子として上皮細胞への接着にも寄与することを強く示唆している。そこで、CARDS toxin の新規機能解明を図ると共に、新規ワクチン抗原となり得るかを明らかとするために本研究を遂行した。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、申請者が先駆けて見出した知見を基盤として、1) CARDS toxin による炎症惹起メカニズムの解明、2) CARDS toxin の接着因子としての機能解明と共に、3) マイコプラズマ感染および炎症誘発の双方を抑制可能な、CARDS toxin を抗原として用いた新規ワクチンの開発を図る。

## 3. 研究の方法

### (1) CARDS toxin による炎症惹起メカニズムの解明

これまでに CARDS toxin が TLR2 非依存的に好中球浸潤に寄与することを見出している。そこで、CARDS toxin による好中球浸潤に寄与する分子の同定を中心に、好中球浸潤メカニズムの解明を図る。特に、マイコプラズマ感染時において、肺胞洗浄液中の IL-1 $\alpha$  が好中球浸潤に寄与することを明らかとしていることから、マウスに組換え CARDS toxin 蛋白質を経肺投与し、IL-1 $\alpha$  に対する抗体を用い、好中球浸潤を含む炎症惹起が抑制可能かを評価する。

### (2) CARDS toxin の接着因子としての機能評価

これまでに、マイコプラズマ由来 P1 蛋白質が上皮細胞への接着に寄与する一方で、P1 蛋白質に依存しない接着、即ち、新規接着因子の存在が示唆されている。まず、既存の報告通り、マイコプラズマ表面に CARDS toxin が存在することを抗 CARDS toxin ポリクローナル抗体を用いて確認する。また、既知の接着因子として知られている P1 蛋白質はコントロールとして、抗 P1 ポリクローナル抗体で評価する。その後、マイコプラズマの上皮細胞への接着が、組換え CARDS toxin 蛋白質により阻害されるかをフローサイトメトリーで評価する。また、組換え CARDS toxin 蛋白質と上皮細胞への結合が、マイコプラズマにより阻害されるのかも同様に評価する。さらに、P1 タンパク質と CARDS toxin の上皮細胞への接着における相互作用を明らかとするため、抗 P1 抗体と組換え CARDS toxin 蛋白質を用いて、マイコプラズマと上皮細胞の接着に与える影響について精査する。

### (3) CARDS toxin のワクチン抗原としての有用性評価

CARDS toxin のワクチン抗原としての有用性を精査する。組換え CARDS toxin 蛋白質を、アジュバントである STING アゴニスト c-di-GMP と共に、数週間おきに 2 回経鼻投与する。ワクチン後、血漿、肺胞洗浄液中の CARDS toxin 特異的抗体価 (IgG、IgA) を評価した後、マイコプラズマを経鼻感染させ、肺胞洗浄液中の菌量を測定することで感染防御能を評価する。また、感染後の肺胞洗浄液中における好中球数や炎症性サイトカイン、特に、IL-1 $\alpha$  の変動についても解析し、炎症抑制能についても評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) CARDS toxin による炎症惹起メカニズムの解明

CARDS toxin 投与時における好中球浸潤メカニズムの解明を目的として、抗 IL-1alpha 抗体または抗 IL-12 p40 抗体を CARDS toxin 投与 1 時間前に経鼻投与した後、CARDS toxin を経鼻投与し、CARDS toxin 投与 1 日後における肺胞洗浄液中の免疫細胞数を評価した。その結果、抗 IL-1alpha 抗体投与群における免疫細胞数および好中球数は、アイソタイプ抗体投与群と比較して有意な減少が認められた。一方、抗 IL-12 p40 抗体投与群における免疫細胞数および好中球数は、アイソタイプ抗体投与群と同程度であった。また、肺胞マクロファージ数は、抗 IL-1alpha 抗体や抗 IL-12 p40 抗体投与による変化が認められなかった。以上より、CARDS toxin は、TLR2 非依存的に好中球浸潤を促進し、その浸潤の一部には、IL-1alpha が寄与する可能性が示された。

##### (2) CARDS toxin の接着因子としての機能評価

過去の報告より、マイコプラズマ表面に CARDS toxin が存在することが示唆されている。そこでまず、フローサイトメーターを用いてマイコプラズマ表面に CARDS toxin が局在しているのかを確認した。この際、マイコプラズマ表面に存在し、既知の接着因子として知られている P1 蛋白質をコントロールとして評価する。それぞれの蛋白質の検出には、抗 CARDS toxin ポリクローナル抗体と抗 P1 ポリクローナル抗体を用い、マイコプラズマの核酸の検出には DAPI を使用した。その結果、アイソタイプコントロール抗体添加群と比較して、抗 P1 抗体添加群だけでなく抗 CARDS toxin 抗体添加群においてもマイコプラズマ表面に抗体が結合していることが明らかとなった。これらの結果は、マイコプラズマ表面に P1 だけでなく、CARDS toxin も発現していることを示している。また、CARDS toxin を発現しているマイコプラズマの割合は、P1 を発現しているマイコプラズマの割合よりも低いことも明らかとなった。

次に、マイコプラズマ表面に存在する CARDS toxin が上皮細胞 (A549 細胞) への接着に寄与しているかを評価するために、組換え CARDS toxin によってマイコプラズマの A549 細胞への結合を阻害できるかを評価した。この際、FITC で標識した抗マイコプラズマ抗体を用いて A549 細胞に結合するマイコプラズマをフローサイトメトリーで検出した。その結果、組換え CARDS toxin は、マイコプラズマの A549 細胞への結合を容量依存的に減少させた。さらに、同様の目的で、マイコプラズマによって組換え CARDS toxin の A549 細胞への結合を阻害できるかを評価した。この際、作製した組換え CARDS toxin は、N 末端に His タグを有しているため、抗 His-tag 抗体を用いて検出することができる。そのため、A549 細胞に結合した組換え CARDS toxin は、Alexa Fluor® 488 で標識した抗 His-tag 抗体により、フローサイトメトリーで検出した。その結果、マイコプラズマは、組換え CARDS toxin の A549 細胞への結合を有意に阻害した。これらの結果は、マイコプラズマ表面に局在する CARDS toxin が、マイコプラズマの上皮細胞への接着に寄与することを示唆している。次に CARDS toxin と P1 蛋白質の上皮細胞への接着における差異について精査した。A549 細胞とマイコプラズマを 1 時間共培養した際には、A549 細胞とマイコプラズマの結合が抗 P1 抗体によって完全に阻害できた一方で、組換え CARDS toxin によっては全く阻害できなかった。また、A549 細胞とマイコプラズマを 18 時間共培養した際には、A549 細胞とマイコプラズマの結合を抗 P1 抗体および組換え CARDS toxin、いずれにおいても結合を阻害できた。本結果は、マイコプラズマが上皮細胞に接着する際に、CARDS toxin が P1 等の接着因子より感染後期に寄与している可能性を示唆している。

(3) CARDS toxin のワクチン抗原としての有用性評価 CARDS toxin がワクチン抗原候補となり得るかを評価するため、マウスに組換え CARDS toxin または、組換え P1C を 2 回経鼻免疫した。その際、STING アゴニストである c-di-GMP をアジュバントとして共投与した。最終免疫から 2 週間後、それぞれの免疫後の抗体反応を評価するために、P1C、CARDS toxin およびマイコプラズマ特異的血漿中 IgG、肺胞洗浄液中 IgG および肺胞洗浄液中 IgA を ELISA を用いて評価した。組換え CARDS toxin または組換え P1C 免疫群では、PBS 免疫群と比較して、それぞれの抗原特異的な血中 IgG、肺胞洗浄液中 IgG および IgA の産生が有意に上昇した。また、組換え P1C 免疫群だけでなく、組換え CARDS toxin 免疫群においても、PBS 免疫群と比較してマイコプラズマ特異的 IgA および IgG 産生が有意に上昇した。CARDS toxin に対する抗体がマイコプラズマに反応した本結果は、CARDS toxin がマイコプラズマ表面上に存在することを裏付けている。

そこで次に、これらワクチン接種後のマウスにマイコプラズマを経鼻より感染させ、感染 1 日後の肺胞洗浄液を回収し、菌量、好中球数および炎症性サイトカインを評価した。その結果、肺胞洗浄液中の菌量は、組換え P1C 免疫群、組換え CARDS toxin 免疫群共に、PBS 免疫群と比較して有意に減少した。また、マイコプラズマ感染による炎症反応を評価するために細胞・組織損傷のマーカーである LDH、遊走された好中球数をフローサイトメーターで、炎症性サイトカインである IL-1alpha、IL-6 の濃度は ELISA でそれぞれ測定した。その結果、PBS 免疫群と比較して、組換え P1C 免疫群と組換え CARDS toxin 免疫群で肺胞洗浄液中の LDH、IL-1alpha お

よび IL-6 が有意に減少した。さらに、PBS 免疫群と比較して、組換え CARDS toxin 免疫群では、肺胞洗浄液中の好中球数が有意に減少した一方で、P1C 免疫群では有意な減少は認められなかった。以上の結果より、CARDS toxin は、P1 と比較して、マイコプラズマ感染時における同程度の感染防御能と同等以上の肺炎の抑制効果を兼ね備えたワクチン抗原である可能性が示された。

本研究で得られた成果は、マイコプラズマ肺炎の病態形成機序解明の一助となると共に、新規治療薬・ワクチン開発に向けた基盤情報の提供になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Rina, Takahashi Junya, Shirakura Keisuke, Funatsu Risa, Kosugi Kaori, Deguchi Sayaka, Yamamoto Masaki, Tsunoda Yugo, Morita Maaya, Muraoka Kosuke, Tanaka Masato, Kanbara Tomoaki, Tanaka Shota, Tamiya Shigeyuki, Tokunoh Nagisa, Kawai Atsushi, Ikawa Masahito, Ono Chikako, Tachibana Keisuke. et al	4. 巻 8
2. 論文標題 SARS-CoV-2 disrupts respiratory vascular barriers by suppressing Claudin-5 expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abo6783	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 Matsuda Teppei, Misato Kazuki, Tamiya Shigeyuki, Akeda Yasuhiro, Nakase Ikuhiko, Kuroda Etsushi, Takahama Shokichi, Nonaka Motohiro, Yamamoto Takuya, Fukuda Michiko N., Yoshioka Yasuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Efficient antigen delivery by dendritic cell-targeting peptide via nucleolin confers superior vaccine effects in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105324 ~ 105324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105324	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 Yoshikawa Eisuke, Tamiya Shigeyuki, Inoue Yuji, Suzuki Koichiro, Yoshioka Yasuo	4. 巻 594
2. 論文標題 Vaccine using community-acquired respiratory distress syndrome toxin as an antigen against Mycoplasma pneumoniae in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 81 ~ 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.058	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 民谷 繁幸、吉川 英佑、吉岡 靖雄
2. 発表標題 マイコプラズマニューモニエ由来CARDS toxinの機能解析と新規ワクチン抗原としての有用性評価
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第49回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳納 渚沙、民谷 繁幸、吉岡 靖雄
2. 発表標題 SARS-CoV-2に対する不活化全粒子経鼻ワクチンの開発
3. 学会等名 第26回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------