

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15276

研究課題名（和文）マイコプラズマニューモニアに起因した気管支喘息の発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of bronchial asthma caused by Mycoplasma pneumoniae

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイコプラズマ感染後における気管支喘息の発症および増悪機序を明らかにすることを目的として検討を行った。その結果、マイコプラズマ感染後に喘息、アレルギー性鼻炎の原因となるダニ抗原を投与したところ、予想に反して、アレルギー症状の抑制が認められた。これら抑制の機序には、肺胞洗浄液中のIL-1αやTh1/Th2バランスの乱れが寄与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイコプラズマ感染後の気管支喘息の発症および増悪は、経済や社会に大きな影響を与え、患者の生活にも大きな支障をきたす。しかし、未だマイコプラズマに起因した気管支喘息の発症機序が不明であり、予防することができないのが現状である。本研究で得られた結果は、マイコプラズマ感染後の気管支喘息の発症予防法の確立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 this study, we aimed to elucidate the pathogenesis and exacerbation mechanisms of bronchial asthma following Mycoplasma pneumoniae (Mycoplasma) infection. As a result, contrary to expectations, the administration of house dust mite antigens, which cause asthma and allergic rhinitis, after Mycoplasma infection showed suppression of allergic symptoms. The mechanisms underlying this suppression might involve the reduction of IL-1α in bronchoalveolar lavage fluid and the disruption of the Th1/Th2 balance.

研究分野：免疫学、細菌学

キーワード：Mycoplasma pneumoniae 肺炎 アレルギー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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、頭痛、発熱、倦怠感などに加え、数週間にも及ぶ乾性咳嗽を特徴とし、身体面のみならず、精神面にも大きな影響を与える。また、小児は好発・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、小児領域において問題となる呼吸器感染症の 1 つである。また過去の流行期において、薬剤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、予防可能なワクチンが実用化されていないことに起因して、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。さらに、マイコプラズマ感染症は、自己免疫性溶血性貧血や、心膜炎、心筋炎、腎炎、髄膜炎など、多くの疾患の原因となることが示唆されている。中でも、感染後の気管支喘息の発症および増悪は、定期的な通院、薬剤費などによる医療費増加を余儀なくされることから、経済面でも大きな影響を与え、患者の生活に大きな支障をきたす。さらに、重度の喘息で入院した小児を対象に行われた臨床研究において、気管支喘息を初発した患者の約 50%、過去に喘息と診断されていた患者の約 20% でマイコプラズマ感染が観察されており、マイコプラズマ感染と気管支喘息の発症や増悪が深く関連すると考えられている。そのため、マイコプラズマ感染後の気管支喘息を予防することが極めて重要であると考えられるが、未だマイコプラズマに起因した気管支喘息の発症機序が不明であるのみならず、マイコプラズマの感染機序および炎症惹起機序すらも詳細が不明なままであり、マイコプラズマに対する治療薬およびワクチンの開発が滞っている現状にある。

### 2. 研究の目的

本研究では、マイコプラズマ感染後における気管支喘息の発症および増悪機序を明らかにすると共に、種々の解析を通じて新規予防法確立のための基盤情報を提案することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダニ抗原を用いたアレルギーモデルの作製

まず既報に従い、ダニ抗原 (HDM) を連続投与することでアレルギーを発症するのかを確認した。麻酔下において 6 週齢の雄の BALB/c マウスに HDM 5  $\mu$ g を 5 日間連続で片鼻 5  $\mu$ L ずつ、計 10  $\mu$ L を経鼻投与した。1 日間の休止期間を設け、その後再び、同量の HDM を 5 日間連続で経鼻投与 (計 10 回) した。HDM の最終投与から 1 日後において、アレルギー症状を評価するため、肺胞洗浄液を回収し、肺胞洗浄液中における免疫細胞数をフローサイトメトリーを用いて評価した。

#### (2) マイコプラズマ感染後におけるアレルギー評価

感染に用いるマイコプラズマは、FH 株を用いた。6 週齢の雄の BALB/c マウスに麻酔下でマイコプラズマ ( $1.5 \times 10^9$  CFU/mL) を片鼻 20  $\mu$ L ずつ、計 40  $\mu$ L ( $6.0 \times 10^7$  CFU/mouse) で経鼻投与した。なお、コントロール群には PBS を投与した。感染 1 日後より、(1) の方法を用いて HDM 5  $\mu$ g を計 10 回経鼻投与した。HDM の最終投与から 1 日後において、肺胞洗浄液を回収し、肺胞洗浄液中における好酸球数をフローサイトメトリーを用いて解析することで、アレルギーの発症および増悪を評価した。また、HDM 投与後の肺胞洗浄液中における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た。

#### (3) HDM 特異的 T 細胞応答の評価

(2) の方法を用いて、マイコプラズマ感染と HDM の投与を行った。これらマウスの脾臓細胞を HDM で再刺激し、HDM 特異的な T 細胞応答を評価した。特に、Th1 型サイトカインとして IFN $\gamma$ 、Th2 型サイトカインとして IL-13 を指標とし、その Th1/Th2 バランスの変化も評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) ダニ抗原を用いたアレルギーモデルの作製

マウスに HDM を経鼻投与後、肺胞洗浄液を回収し、肺胞洗浄液中における免疫細胞数をフローサイトメトリーを用いて評価した。その結果、以前の報告通り、アレルギー指標の 1 つである好酸球数の顕著な増加が観察され、HDM 投与によりアレルギーが誘発されていることを確認した。

#### (2) マイコプラズマ感染後におけるアレルギー評価

これまでの臨床研究において、マイコプラズマ感染とアレルギー発症および増悪は深く関与することが報告されている。そこで、(1) のアレルギーモデルを用いて、マイコプラズマ感染後において気管支喘息の発症および増悪が観察されるかを評価した。その結果、予想に反して、マイコプラズマをあらかじめ感染させておくことで、HDM 投与による肺胞洗浄液中における好酸球浸潤が顕著に抑制された。この結果は、HDM 量を 5  $\mu$ g から 10  $\mu$ g に増量しても変わらなかつ

た。したがって、マイコプラズマに感染している場合、アレルギーが誘発されてもアレルギー症状は悪化するのではなく、むしろ抑制されることが観察された。これまでに、IL-1alpha のレセプター欠損マウスではアレルギーの発症が抑制されることや、野生型マウスと IL-1alpha の中和抗体を用いた検討において、アレルゲン感作時に増加する好酸球やリンパ球数が顕著に減少することが報告されている。また、大気中に浮遊する PM2.5 や黄砂を含む微粒子の吸入に伴う肺胞マクロファージの細胞死が細胞内に貯蔵された IL-1alpha 分泌を促進し、アレルギー性炎症発症の引き金となることが示唆されている。これらの報告は、気管支喘息の発症および増悪に IL-1alpha が深く関連することを示している。そこで、HDM の最終投与から 1 日後における肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン量を評価した結果、コントロール群と比較し、マイコプラズマ感染群において、IL-1alpha の減少が観察された。そのため、肺胞洗浄液中における IL-1alpha の減少がアレルギー症状の抑制に寄与した可能性が考えられたが、その詳細な機序については未だ不明であり、今後の検討課題である。

### (3) HDM 特異的 T 細胞応答の評価

これまでの報告において、幼少期におけるウイルスや細菌感染の減少がアレルギー疾患の発症増加に関与することが示唆されている。これらの結果は、感染に伴い、Th2 免疫応答よりも Th1 免疫応答が優位になるためであると考えられている。そこで次に、マイコプラズマ感染後のアレルギーモデルマウスにおける Th1/Th2 バランスを評価した。マイコプラズマ感染後に HDM 10  $\mu\text{g}$  を計 10 回経鼻投与した後、脾臓を回収し、脾臓細胞を HDM で再刺激した。その後、培養上清中において、Th1 型のサイトカインである IFN $\gamma$  量、Th2 型のサイトカインである IL-13 量を評価した。マイコプラズマ非感染群と比較し、マイコプラズマ感染群において、IFN $\gamma$  量には変化がなかったものの、IL-13 量の減少が認められた。これらの結果は、マイコプラズマ感染が相対的に Th1 優位な免疫応答を誘導することで、HDM によるアレルギー反応が抑制される可能性を示唆している。

本研究では、ヒトにおいて感染が成立する *Mycoplasma pneumoniae* をマウスに感染させて検討を行っている。*Mycoplasma pneumoniae* をマウスに感染させても肺炎初期の炎症は模倣できる一方で、気道上皮細胞上での増殖は観察されず、病原性を完全には再現できていない。そのため、これが原因でアレルギー症状の抑制が観察された可能性がある。今後の検討により、マウスにおいて感染が成立する *Mycoplasma pulmonis* をマウスに感染させた際に、感染後のアレルギー症状が悪化するのか、抑制するのかを評価していきたい。これら検討を図ることで、マイコプラズマ感染がアレルギー疾患の発症および増悪にどのように寄与するのかを明らかにすることができ、アレルギー発症予防法の確立に貢献できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 2件）

1. 著者名 Sakai Hibiki, Kamuro Hiroyasu, Tokunoh Nagisa, Izawa Takeshi, Tamiya Shigeyuki, Yamamoto Ayaha, Tanaka Shota, Okuzaki Daisuke, Ono Chikako, Matsuura Yoshiharu, Okada Yoshiaki, Yoshioka Yasuo, Fujio Yasushi, Obana Masanori	4. 巻 -
2. 論文標題 JAK inhibition during the early phase of SARS-CoV-2 infection worsens kidney injury by suppressing endogenous antiviral activity in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	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） 10.1152/ajprenal.00011.2024	査読の有無 無
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 Kawai Atsushi, Tokunoh Nagisa, Kawahara Eigo, Tamiya Shigeyuki, Okamura Shinya, Ono Chikako, Anindita Jessica, Tanaka Hiroki, Akita Hidetaka, Yamasaki Sho, Kunisawa Jun, Okamoto Toru, Matsuura Yoshiharu, Hirai Toshiro, Yoshioka Yasuo	4. 巻 133
2. 論文標題 Intranasal immunization with an RBD-hemagglutinin fusion protein harnesses preexisting immunity to enhance antigen-specific responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI166827	査読の有無 無
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 Matsumoto Naomi, Kurokawa Shiho, Tamiya Shigeyuki, Nakamura Yutaka, Sakon Naomi, Okitsu Shoko, Ushijima Hiroshi, Yuki Yoshikazu, Kiyono Hiroshi, Sato Shintaro	4. 巻 15
2. 論文標題 Replication of Human Sapovirus in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1929 ~ 1929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v15091929	査読の有無 無
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 Minami Shohei, Matsumoto Naomi, Omori Hiroko, Nakamura Yutaka, Tamiya Shigeyuki, Nouda Ryotaro, Nurdin Jeffery A., Yamasaki Moeko, Kotaki Tomohiro, Kanai Yuta, Okamoto Toru, Tachibana Taro, Ushijima Hiroshi, Kobayashi Takeshi, Sato Shintaro	4. 巻 13
2. 論文標題 Effective SARS-CoV-2 replication of monolayers of intestinal epithelial cells differentiated from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11610-11610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-38548-1	査読の有無 無
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 Tokunoh Nagisa, Tamiya Shigeyuki, Watanabe Masato, Okamoto Toru, Anindita Jessica, Tanaka Hiroki, Ono Chikako, Hirai Toshiro, Akita Hidetaka, Matsuura Yoshiharu, Yoshioka Yasuo	4. 巻 14
2. 論文標題 A nasal vaccine with inactivated whole-virion elicits protective mucosal immunity against SARS-CoV-2 in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1224634-1224634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1224634	査読の有無 無
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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 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
---------	---------