

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293390

研究課題名(和文)好中球免疫系の作動機序の統合的解明と細菌由来分子による好中球免疫の制御方法の検索

研究課題名(英文) Investigation for a control method of neutrophil immunity

研究代表者

寺尾 豊 (TERAO, Yutaka)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50397717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌は、高齢者肺炎で主たる病原菌として知られている。その肺炎球菌には、細菌内部にニューモリシンと呼ばれる毒素が内在している。しかし、その毒素をヒトに向けて放出するポンプ装置は保有していない。そこで、本研究では、まず、細菌が自己溶菌することで毒素を外界へ漏出させることを示した。次いで、ニューモリシンは肺胞上皮細胞ではなく、肺に浸潤した免疫細胞である好中球をターゲットにしていることを明らかにした。最後に、好中球の内在性エラスターゼを阻害する薬剤により好中球免疫の恒常化を図れば、免疫機能の正常化を誘導できることも提示した。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pneumoniae is a major pathogen that causes elderly pneumonia. S. pneumoniae expresses several toxins and one of them possesses cytolytic activity. However, the pneumolysin is located in the cytosol of the pneumococcus and this bacteria doesn't have any pump system to release the pneumolysin. The main contribution of this present study is the elucidation of the mechanism by which S. pneumoniae recruits host enzymes to promote the progression of pneumococcal infection. We believe that this contribution is theoretically and practically relevant because we demonstrate that the pneumococcal pore-forming toxin pneumolysin selectively degrades neutrophils to promote the release of neutrophil elastase, which subsequently targets alveolar epithelial cells and macrophages, but exhibits no cytotoxicity toward S. pneumoniae.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：好中球

## 1. 研究開始当初の背景

「歯科領域 第三の感染症」とも称される誤嚥性肺炎を包含する肺炎は、耐性菌の増加と人口動態の高齢化に伴い増大・重症化する傾向にある。ついに昨年度は、わが国の死因疾患トップ3が入れ替わり、肺炎が第3位となる事態が生じている。そこで本研究では、「好中球免疫系の作動機序の統合的解明と好中球免疫の制御方法の検索」を行い、既存の抗生剤治療と併用可能な感染症治療薬開発の基盤確立を目指すこととした。

## 2. 研究の目的

研究代表者が15年の間一貫して研究テーマとしているレンサ球菌属は、ヒトの口腔や鼻腔から感染し、う蝕・咽頭炎・肺炎を引き起こす。その中でも、肺炎レンサ球菌は高齢者肺炎・誤嚥性肺炎の主要な起因微生物である。しかしながら、わが国の医学領域では、肺炎レンサ球菌は疫学的な研究対象となっているにすぎず、基礎領域の分子解析を行う医学研究者はほとんどいない。そのため、臨床現場における経験則に基づく肺炎対処療法が主となり、結果として毎年約10万人の肺炎死亡者を出すことになっている。

上記の微生物感染に抗するヒトのシステムが免疫系であるが、その最初に作動する好中球については、他の免疫研究テーマの後塵を拝し、詳細な解析がされてこなかった。肺炎レンサ球菌感染症では、患者病理組織像において好中球の浸潤が多数認められるにも関わらず、細菌排除が行われず病態が悪化することが示されている。そこで本研究課題では、研究代表者がこれまでの研究で考案した手技や蓄積データを基にして、肺炎球菌等の病原性レンサ球菌との感染メカニズム、および好中球免疫の分子メカニズムを統合的に解析する。さらに、肺炎レンサ球菌などの微生物由来物質を用い、好中球の免疫機構を制御することも試みる。

## 3. 研究の方法

病原性レンサ球菌の感染実験においては、好中球のETosis細胞死と、ETosisに伴う「細胞外の異物捕獲構造物 (Neutrophil extracellular traps; NETs)」による新規の免疫システムの作動が報告されているが、好中球にNETsを産生させるレンサ球菌由来物質は不明である。特に、肺炎レンサ球菌感染症においては、感染肺組織に多量の好中球浸潤し、NETs様構造物が展開されることが、申請者らのマウス予備実験、および臨床現場におけるヒト肺炎レンサ球菌感染症において確認されている。そこで、好中球NETs免疫システムの作動因子について、肺炎レンサ球菌の分子群から同定を試みる。さらに、未だ重症化機構について多くが未知の肺炎球菌の宿主感染メカニズムについて、好中球免疫とのせめぎ合いを分子生物学的手法で解明する。

## 4. 研究成果

肺炎球菌は細菌内部にニューモリシンと呼ばれる毒素を有しているが、その毒素をヒトに向けて放出するポンプ装置は保有していない。そこで、本研究では、まず、細菌が自殺することで毒素を外界へ漏出させることを示した。次いで、細菌毒素が直接的に肺を傷害する可能性を考え、肺胞上皮細胞に作用させた。しかしながら、本毒素は肺胞上皮細胞に対する傷害作用は有意には存在しなかった。そこで、ニューモリシンは肺胞上皮細胞ではなく、肺に浸潤した免疫細胞である好中球をターゲットにしているのではないかと仮説を立てた。ニューモリシンを好中球に作用させると細胞膜を融解し、エラスターゼと呼ばれる酵素を漏出させることが明らかにした。好中球エラスターゼは、本来は好中球内部に存在し、細菌など異物の分解、消化に関与する重要な生体防御因子の一つである。しかし、このエラスターゼが過剰に分泌さ

れることにより, 肺組織を傷害してしまうことを推察し実験を進めた. 肺胞上皮細胞にエラストラーゼを作用させると, 細胞間の接着がバラバラになり, 剥離する様子が観察された. また, エラストラーゼをマクロファージに作用させると, 貪食作用が阻害されることも明らかになった. しかも, 肺炎球菌は, エラストラーゼに殺菌されないタイプの細菌であることも示された. そして, 好中球の内性エラストラーゼを阻害する薬剤により好中球免疫の恒常化を図れば, 免疫機能の正常化を誘導できることも提示した.

## 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 16 件) 全て査読有り

- (1) Maekawa T, Kulwattanaporn P, Hosur K, Domon H, Oda M, Terao Y, Maeda T, Hajishengallis G: Differential expression and roles of secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) and the wingless homolog Wnt5a in periodontitis. J Dent Res, May;96(5):571-577. doi: 10.1177/0022034516687248. Epub 2017 Jan 17.
- (2) Nagai K, Domon H, Oda M, Shirai T, Ohsumi T, Terao Y, Arai Y: Antimicrobial activity of ethylene-vinyl acetate containing bioactive filler against oral bacteria. Dent Mater J, 480:173-179, 2016.
- (3) Domon H, Oda M, Maekawa T, Nagai K, Takeda W, Terao Y: Streptococcus pneumoniae disrupts pulmonary immune defence via elastase release following pneumolysin-dependent neutrophil lysis. Sci Rep, 6: 38013, 2016.
- (4) Takenaka S, Oda M, Domon H, Ohsumi T, Suzuki Y, Ohshima H, Yamamoto H, Terao Y, Noiri Y: Vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes Streptococcus mutans biofilm to detach by altering its internal architecture. Biochem Biophys Res Commun, 480: 173-179, 2016.
- (5) Oda M, Terao Y, Sakurai J, Nagahama M: Membrane-binding mechanism of Clostridium perfringens alpha-toxin. Toxins 7(12), 5268-5275, 2015.
- (6) Yamamoto H, Oda M, Kanno M, Tamashiro S, Tamura I, Yoneda T, Yamasaki N, Domon H, Nakano M, Takahashi H, Terao Y, Kasai Y, Imagawa H: Chemical hybridization of Vizantin and Lipid A to generate a novel LPS antagonist. Chem Pharm Bull 64: 246-257, 2016.
- (7) Sakaue Y, Domon H, Oda M, Takenaka S, Kubo M, Fukuyama Y, Okiji T, Terao Y: Anti-biofilm and bactericidal effects of Magnolia bark-derived magnolol and honokiol on Streptococcus mutans. Microbiol Immunol 60:10-16, 2016.
- (8) Kurosawa M, Oda M, Domon H, Saitoh I, Hayasaki H, Terao Y: Streptococcus pyogenes CAMP factor attenuates phagocytic activity of RAW 264.7 cells. Microb Infect 18: 118-127, 2016.
- (9) Domon H, Uehara Y, Oda M, Seo H, Kubota N, Terao Y: Poor survival of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus on inanimate objects in the public spaces. MicrobiologyOpen 5: 39-46, 2016.
- (10) Namba K, Takeuchi K, Kaihara Y, Oda M, Nakayama A, Nakayama A, Yoshida M, Tanino K: Total synthesis of palau'amine. Nat Commun 6: 8731, 2015.
- (11) Miyamoto K, Seike S, Takagishi T, Okui K, Oda M, Takehara M, Nagahama M: Identification of the replication region in pBCNF5603, a bacteriocin-encoding plasmid, in the enterotoxigenic Clostridium perfringens strain F5603. BMC Microbiol 15: 118, 2015.
- (12) Kubo M, Nishikawa Y, Harada K, Oda M, Huang JM, Domon H, Terao Y, Fukuyama Y: Tetranorsesquiterpenoids and santalane-type sesquiterpenoids from Illicium lanceolatum and their antimicrobial activity against the oral pathogen Porphyromonas gingivalis. J Nat Prod 78: 1466-1469, 2015.
- (13) Takagishi T, Oda M, Kabura M, Kurosawa M,

Tominaga K, Urano S, Ueda Y, Kobayashi K, Kobayashi T, Sakurai J, Terao Y, Nagahama M: Clostridium perfringens alpha-toxin induces GM1a clustering and TrkA phosphorylation in the host cell membrane. PLoS one 10; e0120497, 2015.

(14) Ohsumi, T., Takenaka, S., Wakamatsu, R., Sakaue, Y., Narisawa, N., Senpuku, H., Ohshima, H., Terao, Y., and Okiji, T.: Residual structure of Streptococcus mutans biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. PLoS one, 10: e0116647, 2015.

(15) Oda, M., Yamamoto, H., Shibutani, M., Nakano, M., Yabiku, K., Tarui, T., Kameyama, N., Shirakawa, D., Obayashi, S., Watanabe, N., Nakase, H., Suenaga, M., Matsunaga, Y., Nagahama, M., Takahashi, H., Imagawa, H., Kurosawa, M., Terao, Y., Nishizawa, M., and Sakurai, J.: Vizantin inhibits endotoxin-mediated immune responses via the Toll-like receptor 4/MD-2 complex. J. Immunol., 193: 4507-4514, 2014.

(16) Domon, H., Nakajima, T., Tabet, K., and Yamazaki, K.: Age-related alterations in gene expression of gingival fibroblasts stimulated with Porphyromonas gingivalis. J. Periodontal Res., 49: 536-543, 2014.

[学会発表] (計 30 件)

(1) Maekawa T, Kulwattanaporn P, Hosur K, Domon H, Terao Y, Maeda T, Hajishengallis G: Differential Expression and Roles of Sfrp5 and Wnt5a in Periodontitis. 95th General Session & Exhibition of the IADR, San Francisco, CA, USA 2017.3.24, Abstracts & Program book: no2228, 2017.

(2) 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 寺尾 豊: 肺炎球菌感染時における好中球エラストラーゼの in vitro 機能解析. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台国際ホール(宮城県仙台市), 2017 年 3 月 20 日.

(3) 土門久哲: 誤嚥性肺炎に対する新規感染制御法の開発に向けた多次元解析. 第 1 回 D<sup>3</sup> 研究交流会, ときめいと(新潟県新潟市), 2017 年 1 月 24 日.

(4) 土門久哲: 食品由来ペプチドを用いた 誤嚥性肺

炎感染制御法の検索. 第 1 回 U-go サロン, 新潟大学(新潟県新潟市), 2016 年 12 月 5 日.

(5) 毛利泰士, 住友倫子, 松岡悠美, 本多真理子, 山口雅也, 寺尾 豊, 中田匡宣, 川端重忠: Streptococcus pyogenes による皮膚病変の形成機構に関する解析. 第 69 回日本細菌学会関西支部総会・学術講演会, 大阪市立大学(大阪府堺市), 2016 年 11 月 19 日.

(6) 土門久哲, 小田真隆, 川端重忠, 寺尾 豊: 肺炎球菌性肺炎の重症化メカニズムの分子解析. 第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市), 2016 年 10 月 27 日.

(7) 竹中彰治, 小田真隆, 黒澤美絵, 土門久哲, 大墨竜也, 寺尾 豊, 野村由一郎: 結核表層糖脂質誘導体の Streptococcus mutans バイオフィーム形成に与える影響. 日本歯科保存学会 2016 年度秋期学術大会, 松本歯科大学(長野県塩尻市), 2016 年 10 月 27 日.

(8) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 齊藤一誠, 早崎治明, 寺尾 豊: A 群レンサ球菌の PI3K/Akt 活性化因子を介した咽頭上皮細胞株への付着・侵入メカニズムの解析. 第 58 回歯科基礎医学会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 8 月 25 日.

(9) 前川知樹, 前田健康, 寺尾 豊: Porphyromonas gingivalis は補体 C5a と TLR を利用して免疫系から回避する. 第 58 回歯科基礎医学会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 8 月 25 日.

(10) 寺尾 豊, 土門久哲: Streptococcus pneumoniae の肺組織障害におけるカスケード機構の解析. 第 48 回レンサ球菌研究会, 長崎大学(長崎県長崎市), 2016 年 7 月 9 日.

(11) 土門久哲, 小田真隆, 寺尾 豊: 肺炎球菌の自己融解に起点を発する肺傷害のカスケード機構, 第 55 回新潟化学療法研究会, ANA クラウンプラザホテル(新潟県新潟市), 2016 年 7 月 2 日.

(12) 小田真隆, 黒澤美絵, 土門久哲, 寺尾 豊: 多機能性糖脂質によるマクロファージ細胞外捕獲網形成機構の解明. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪, 2016 年 3 月 23-25 日, 第 89 回日本細菌学会総会

ログラム集 78 頁, 2016.

(13) 土門久哲, 坂上雄樹, 小田真隆, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊:肺炎球菌による肺組織傷害誘導メカニズムの解析. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪, 2016 年 3 月 23-25 日.

(14) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: Streptococcus pyogenes の咽頭上皮細胞株への付着・侵入における CAMP factor の役割. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪, 2016 年 3 月 23-25 日.

(15) 小田真隆, 黒澤美絵, 土門久哲, 寺尾 豊: 多機能性糖脂質によるマクロファージ METs 形成メカニズムの解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2015 年 9 月 11-13 日.

(16) 土門久哲, 坂上雄樹, 小田真隆, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊:肺炎球菌による宿主細胞の細胞死誘導能の解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2015 年 9 月 11-13 日.

(17) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 斎藤一誠, 早崎治明, 寺尾 豊: Streptococcus pyogenes CAMP factor の RAW264.7 細胞に対する空胞形成メカニズムの検討. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2015 年 9 月 11-13 日.

(18) 毛利 泰士, 住友 倫子, 山口 雅也, 中田 匡宣, 寺尾 豊, 川端 重忠: Streptococcus pyogenes に起因する皮膚感染症の発症における SpeB の関与. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2015 年 9 月 11-13 日.

(19) 寺尾 豊: イメージングと細菌学研究, 第 67 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 徳島, 2014 年 10 月 4 日.

(20) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: Streptococcus pyogenes CAMP factor の RAW264.7 細胞に対する病原性解析, 第 88 回日本細菌学会総会, 岐阜, 2015 年 3 月 28 日.

(21) 坂上雄樹, 土門久哲, 小田真隆, 興地隆史, 寺尾 豊: Streptococcus mutans バイオフィルムに対する植物由来抽出物の検索, 第 51 回日本細菌学会中部支部総会, 金沢, 2014 年 10 月 17 日.

(22) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: Streptococcus pyogenes CAMP factor の免疫担当細

胞に対する病原性解析, 第 51 回日本細菌学会中部支部総会, 金沢, 2014 年 10 月 17 日.

(23) 小田真隆, 山本博文, 黒澤美絵, 土門久哲, 寺尾 豊: 多機能性糖脂質の自然免疫活性化メカニズムの解明, 第 51 回日本細菌学会中部支部総会, 金沢, 2014 年 10 月 17 日.

(24) 土門久哲, 坂上雄樹, 小田真隆, 寺尾 豊: 慢性炎症性疾患における TLR シグナル抑制因子の解析, 第 51 回日本細菌学会中部支部総会, 金沢, 2014 年 10 月 17 日.

(25) 小田真隆, 黒澤美絵, 土門久哲, 寺尾 豊: A 群レンサ球菌 CAMP ファクターのマクロファージに対する病原性解析, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡, 2014 年 9 月 27 日.

(26) 土門久哲, 小田真隆, 寺尾 豊: 歯周炎における TLR シグナル抑制因子の解析, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡, 2014 年 9 月 27 日.

(27) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: 合成糖脂質の Streptococcus mutans バイオフィルムに対する作用, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡, 2014 年 9 月 26 日.

(28) 坂上雄樹, 土門久哲, 小田真隆, 興地隆史, 寺尾 豊: Streptococcus mutans に対する植物由来抽出物の殺菌ならびに抗バイオフィルム効果の検討, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡, 2014 年 9 月 26 日.

(29) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 寺尾 豊: 多機能性糖脂質の Streptococcus mutans バイオフィルム形成に対する作用, 第 2 回四大学・口腔微生物研究会, 福岡, 2014 年 9 月 25 日.

(30) 坂上雄樹, 土門久哲, 小田真隆, 興地隆史, 寺尾 豊: Streptococcus mutans に対する厚朴由来抽出物の殺菌ならびに抗バイオフィルム効果の検討, 第 2 回四大学・口腔微生物研究会, 福岡, 2014 年 9 月 25 日.

[図書] (計 7 件)

(1) 寺尾 豊, シリーズバイオセーフティ(これから微生物学系研究室を立ち上げる 3 つのポイント), BMSA ジャーナル, NPO 法人 BMSA 研究会出版部

28(3), 99-103, 2016.

(2) 寺尾 豊, 黒澤美絵, 劇症型溶血性レンサ球菌感染症(人食いバクテリア), 感染・炎症・免疫, 医学の門社, 7月号, 76-78, 2016.

(3) Takenaka S, Oda M, Domon H, Wakamatsu R, Ohsumi T, Terao Y, Noiri Y: Adverse Influences of Antimicrobial Strategy against Mature Oral Biofilm. Microbial Biofilms - Importance and Applications (Dharumadurai Dhanasekaran, Nooruddin Thajuddin), Chapter 18, InTech, 2016.

(4) 寺尾 豊, 小田真隆: 口腔微生物学・免疫学 第4版(川端重忠, 小松澤均, 大原直也, 寺尾 豊, 浜田茂幸編), 111-114 頁, 175-196 頁, 医歯薬出版, 2015.

(5) Nagahama M., Ochi S., Oda M., Miyamoto K., Takehara M., and Kobayashi K.: Recent insights into Clostridium perfringens beta-toxin. Toxins, 7:396-406, 2015.

(6) 寺尾 豊, ナノスケールの研究を歯科医学に, 日本歯科評論, ヒョーロン・パブリッシャーズ社, 74: 9-11 2014.

(7) Nagahama M, Oda M, Tsuge H., Kobayashi K.: Enteric toxins of Clostridium perfringens: Beta Toxin, TpeL, Epsilon Toxin and Iota Toxin. Molecular Medical Microbiology Second edition, Vol. 2, 997-1013, 2014.

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/microbio/microbio.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

寺尾 豊 (TERAO, Yutaka)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号:50397717

### (2)研究分担者

小田 真隆 (ODA, Masataka)

新潟大学・医歯学系・准教授

平成28年10月より京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号:00412403

### (3)研究分担者

土門 久哲 (DOMON, Hisanori)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号:00594350