

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860768

研究課題名(和文) ライブイメージング技術を用いた細菌性髄膜炎ワクチン効果の解明

研究課題名(英文) The dynamics of immune cells and pneumococcus were analyzed by live imaging technique

研究代表者

荻野 英賢 (OGINO, Hidetaka)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80589325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細菌性髄膜炎は発症率が高く、乳児では重症化することが知られている。また、予後不良(脳梗塞または難聴)の割合も20%と高い。肺炎球菌およびインフルエンザ菌が主要な原因菌として知られているが、近年薬剤耐性菌が増加しており、治療が困難になるケースもある。そのため、ワクチンの予防は重要になってきている。

この研究では、免疫細胞および肺炎球菌の動態をライブイメージング技術によって分析した。その結果、肺の中の感染の焦点の形成が観察された。さらに、肺内部の免疫細胞の蓄積も観察された。

研究成果の概要(英文)：Bacterial meningitis is highly onset and progression to severe in infants. The risk of poor prognosis (a cerebral infarction or deafness) is known to be high. Pneumococcus and Haemophilus influenzae are known to be the major causative organisms. In recent years, drug-resistant bacteria have been increasing, and treatments are becoming difficult in some cases. For that reason prevention with vaccines is important.

In this study, the dynamics of immune cells and pneumococcus were analyzed by live imaging technique. As a result, formation of infection focus inside the lung was observed. Moreover, accumulation of immune cells inside the lung was also observed.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌学 感染症 イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

細菌性髄膜炎は上気道あるいは呼吸器感染病巣を経由して血中から髄膜に原因菌が達することで起こると考えられている。発熱・頭痛・嘔吐などを示し、進行すると意識障害や痙攣を伴う感染症で、発症すると5%が死に至る。予後も不良で、脳梗塞や難聴などの後遺症率が20%と極めて高い。特に乳児から幼児(生後数ヶ月~4歳)の発症率が高く、重症化しやすい。これは主に見られる症状が発熱や嘔吐で、他の風邪や嘔吐性下痢などと見分けが付きにくく診断がつけにくいためである(専門的な設備を有しない市中医院では重症化するまで細菌性髄膜炎と判断するのが難しいケースも多い)。また、乳幼児の免疫細胞は未発達で効率的に菌を排除することが難しく、抗生物質に耐性の原因菌も増えていることもあり適切な治療が難しい。実際に、原因菌である肺炎球菌やインフルエンザ菌に対する抗菌薬も開発されているが、近年「薬剤耐性菌(抗菌薬が効かない菌)」の頻度が30%以上と高く、効果的な治療が施せないケースも増加している。

そのため、細菌性髄膜炎を予防する「細菌性髄膜炎ワクチン」が注目を集めている。ワクチン接種により、あらかじめ体内に原因菌に対する抗体を作らせることができるので、感染後の原因菌を効率よく排除することが出来る。ワクチン効果に関する研究は幾つかあるが、従来の組織切片や培養細胞を用いた解析では原因菌が感染し病巣を広げていく経時的/空間的な変遷を追うことができず、ワクチン効果の評価に重要な「実際の生体内での反応」を理解することが難しかった。

そこで本研究では、ワクチンの作用機構、特に細菌性髄膜炎菌が居住する生体内で原因菌を排除する免疫細胞の時空間的に連続した挙動を明らかにする。これはマウスを生かしたまま生体内を観察できる「ライブイメージング顕微鏡観察技術」を持つ当研究グループ独自の研究手法である。申請者の研究グループが開発した\*ライブイメージング顕微鏡観察技術は個体を生かしたまま生体内における細胞動態を観察できる、世界で唯一の方法である。本手法を病巣形成過程および免疫細胞動態の解明に応用することにより、これまで想像の域を出なかった複数の免疫細胞による複合的な細菌性髄膜炎原因菌の排除機構を時空間的に解析できる。また、結果をリアルタイムで解析できるためワクチンの評価システムとして使用できる点に特色がある。細菌性髄膜炎の重症化およびワクチンの副反応は免疫細胞の暴走による過剰な炎症反応が関わるということが知られている。

\*ライブイメージング顕微鏡観察：共焦点蛍光顕微鏡と小動物用の酸素分圧調節機能付き麻酔装置を組み合わせたもの。Hasegawa A et al., *J Allergy Clin Immunol*. 125(2):461-468. 2010

## 2. 研究の目的

免疫機能が低下した高齢者等における細菌性髄膜炎は致命的なものになりやすい。また、免疫機能が未発達な乳幼児では、重篤な後遺症が残る割合が多い。そのため細菌性髄膜炎原因菌の感染機構、特に生体内での感染巣の形成過程および免疫細胞による防衛機序を明らかにすることは、有効な細菌性髄膜炎治療法の開発に寄与し、患者のQOLを高めることに繋がる。

細菌性髄膜炎予防として、海外では易感染性の脾臓摘出者や高齢者に23種の血清型の肺炎球菌莢膜を抗原としたワクチン「ニューモバックスNP」の接種が、乳幼児には7種/13種の血清型の肺炎球菌莢膜に不活化ジフテリアトキシンをアジュバントとして付加した「プレベナー」の接種が進められ効果を上げている。インフルエンザ菌を対象としたワクチンとしてはb型の血清型インフルエンザ菌莢膜に不活化破傷風トキソイドをアジュバントとして付加した「アクトヒブ」の接種がすすめられている。ナイセリア菌を対象としたワクチンは日本での接種は少ないものの、アフリカ等の頻発地帯への渡航の際には使用されている。

我が国でも細菌性髄膜炎原因菌へのワクチンが近年認可されたが、十分に認知されたいとはいえず、国内の副作用への疑念も拭ききっていない。しかし、細菌性髄膜炎原因菌治療に使われる抗生物質に耐性の細菌性髄膜炎原因菌の出現が報告されるなど、治療が困難な場合も出てきており、細菌性髄膜炎ワクチンの重要性は高まっている。

本研究成果は今後のワクチン接種拡大と細菌性髄膜炎の減少に大きく寄与する。従来の光学顕微鏡における観察では細菌性髄膜炎原因菌、組織、免疫細胞の区別が難しく、マウスを生かしたまま生体内を観察するのは非常に難しい。そこで、本研究では細菌性髄膜炎原因菌および免疫細胞にそれぞれ異なる蛍光を発する蛍光タンパク質遺伝子を組み込み、マウスを生かしたまま肺内部を観察できる独自の手法を用いてマウス生体内における両者の経時的な細胞動態を明らかにする。申請者は、これまでに細菌の細胞内で起こる細胞分裂というダイナミックな機構を蛍光タンパク質と蛍光顕微鏡を用いた観察により明らかにしてきた(Ogino et al., *J. Bacteriol.*, 2008., Ogino et al., *Mol Microbiol*, 2008.)。本研究では、この技術を細菌性髄膜炎原因菌の動態解析に応用して、病原菌と宿主との攻防を蛍光タンパク質を用いることでリアルタイムにイメージングし、生体内で実際に起こっている複雑な現象を解明する。さらに、日本でも認可された細菌性髄膜炎ワクチンが、どのように免疫機能を賦活化し原因菌排除に貢献しているのかを明らかにすべく、生体内における細胞レベルでの動態解析を行なう。

### 3. 研究の方法

(1) 細菌性髄膜炎原因菌への赤色蛍光タンパク質遺伝子導入による可視化

電気穿孔法を利用して赤色蛍光タンパク質遺伝子を導入する。導入遺伝子のソースとしてサンゴ由来の DsRed や、その変異体 mCherry をコードする遺伝子を用いる。生体内での観察には、蛍光タンパク質の恒常的かつ強力な発現が必要とされるため、構成的に発現するプロモーターが必要となる。インフルエンザ菌ゲノムからランダムにスクリーニングし高発現するプロモーターを探索する。先行研究では肺炎球菌プロモーターのランダムスクリーニングにより有用な高発現プロモーターが得られている。十分な蛍光強度が得られない場合はプロモーターをタンデムに繋ぐなどの遺伝子工学的手法を駆使して改善する。

(2) GFP 遺伝子を導入した免疫細胞のマウスへの移入条件および観察至適条件の検討

GFP トランスジェニックマウスを入手済みであり、脾臓やリンパ節から T 細胞、B 細胞、マクロファージ等を個別に単離する方法を確立できている。感染マウスにおける個々の免疫細胞による反応と複合的な免疫細胞ネットワークを明らかにするため、それぞれの観察に適した移入細胞数や移入時期などの至適条件の検討を行う。申請者の研究グループが開発したライブイメージング装置を用いて生きたままのマウスを麻酔下で手術し肺内部を観察して評価する。

(3) インフルエンザ菌のマウスへの感染条件検討

マウス肺でのライブイメージング観察を行なうため、経鼻投与による感染実験を行なう。本研究で作製した蛍光インフルエンザ菌株の感染能に問題がないか、文献等を参考に必要投与細菌数を指標にして判断する。マウス肺内部の蛍光観察条件は、先述のライブイメージング装置を用いて感染巣形成時期を判断しながら条件検討を行なう。

(4) インフルエンザ菌のマウス生体内でのコロニー形成過程や局在部位の解析

感染した病原菌は菌特異的な抗体が産生されるまでの間、肺上皮細胞に付着しコロニーを形成すると考えられている。本研究では、感染巣形成過程や原因菌の局在変化などをライブイメージング装置を用いて同一個体で経時的に観察し、マウスへの投与細菌数の違いによるコロニー形成速度の違いや経時的な局在変化をリアルタイムで解析することで原因菌の感染巣形成過程を明らかにする。肺炎球菌を用いた先行研究では経鼻投与後のコロニー形成が観察された。本研究では細菌性髄膜炎発症の端緒となるインフルエンザ菌が血中へ移行する様子などを経時的に観察する。

(5) インフルエンザ菌ワクチン投与後のインフルエンザ菌および免疫細胞の動態解析

細菌性髄膜炎菌ワクチンとして「アクトヒ

ブ」(インフルエンザ菌に対するワクチン)を、蛍光トランスジェニックマウスに投与する。ワクチンを投与されたマウスから各種免疫細胞を単離し、インフルエンザ菌感染マウスに移入する。ライブイメージング顕微鏡観察技術を用いて、細菌性髄膜炎原因菌が形成した感染巣に対する免疫細胞の浸潤、凝集、貪食の過程を経時的に観察し、原因菌の排除に関わる免疫細胞ネットワークを明らかにする。これにより従来エンドポイントでのみ観察されていたワクチン投与後の病原菌排除過程が細胞レベルで観察でき、詳細なワクチンによる免疫細胞の活性化およびインフルエンザ菌排除機構の解明に繋がる。申請者の研究グループが先行して行なった、アレルギー性喘息モデルを用いた免疫細胞のライブイメージング解析では、従来リンパ節に留まると考えられていた T 細胞が浸潤細胞の主体をなす好酸球に先んじて炎症部位に浸潤し、炎症巣形成の制御をすることを明らかにした。さらにワクチン未投与時の動態と比較し、病原菌排除に要する期間および炎症による病巣周辺細胞への傷害がワクチン投与により改善されるか観察し、細胞レベルでのワクチン効果を明らかにする。

### 4. 研究成果

細胞の可視化に成功し、生体内での細菌性髄膜炎原因菌のコロニー形成、免疫細胞の集積過程を捉えることが出来た。ワクチン投与後の細菌性髄膜炎原因菌および免疫細胞の解析準備を進めている。

### 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) Matsutani M, Ito K, Azuma Y, Ogino H, Shirai M, Yakushi T, Matsushita K. Adaptive mutation related to cellulose producibility in *Komagataeibacter medellinensis* (*Gluconacetobacter xylinus*) NBRC 3288. *Appl Microbiol Biotechnol.*, (査読有) 99(17), 2015, 7229-7240

[学会発表](計4件)

(1) 荻野 英賢、長谷川 明洋、浅岡 洋一、松谷 峰之介、白井 睦訓  
「環境中に存在する細菌の高温適応機構の解明」  
第 69 回日本細菌学会中国四国支部総会、2016 年 10 月 15 日、かがわ国際会議場(香川県高松市)

(2) 知識 麻友子、宇治家 武史、荻野 英賢、長谷川 明洋、江崎 孝行、白井 睦訓  
「肺炎原因菌検出における Multiplex NASBA- 核酸クマト法の評価」  
第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 28 日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

(3) 長谷川 明洋、荻野 英賢、大津山 賢一郎、中山 俊憲、白井 睦訓

「CD69 ノックアウトマウスでみられた腸炎の抑制」

第88回日本細菌学会総会、2015年3月28日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

(4) 荻野 英賢、大津山 賢一郎、長谷川 明洋「肺炎原因菌の感染巣における動態観察」

第4回動く細胞と場のクロストーク若手の会、2014年9月4日、火の国ハイツ（熊本県熊本市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荻野 英賢 (OGINO, Hidetaka)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80589325

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし