

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861570

研究課題名(和文) 新たな肺炎球菌性肺炎の感染制御法の検索 補体系と好中球免疫の攪乱機構の解析

研究課題名(英文) Research for treating or preventing pneumococcal pneumonia

## 研究代表者

土門 久哲 (DOMON, Hisanori)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00594350

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)：肺炎球菌感染症に対しては、細菌 宿主の感染メカニズム解析に基づく更なる感染制御法の検索が重要である。本研究では、肺炎球菌の主要な病原因子である菌体内毒素ニューモリシンに着目し、免疫細胞に対する細胞死誘導能、および肺炎球菌の免疫回避機構について解析した。その結果、肺炎球菌はニューモリシンにより好中球の細胞死を誘導し、結果として過剰なエラスターゼが放出されることが明らかとなった。これを起点として肺炎球菌は肺傷害を誘導し、宿主の免疫による排除から回避する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacterium that is a leading cause of bacterial pneumonia. It was suggested that excessively activated neutrophils release proteinases such as elastase that contribute to lung injury in severe pneumonia. However, underlying mechanisms are not fully understood. In this study, we investigated the effects of pneumococcal pneumolysin against neutrophils. Our findings suggest that S. pneumoniae induce neutrophil cell death caused by pneumococcal autolysis and subsequent release of pneumolysin and may trigger neutrophil elastase-dependent lung injury.

研究分野：微生物学

キーワード：肺炎球菌 好中球 エラスターゼ 免疫回避

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の肺炎による死亡数は年間12万を超えており、特に70歳以上の死亡者が多く、かつ増加し続けている。したがって、超高齢社会を迎える今日において、高齢者に好発する呼吸器感染症を予防することは喫緊の課題と云える。しかしながら、口腔・鼻腔・上下気道を介して発症する肺炎は、医学基礎領域においてはほとんど研究されていない。また、主たる肺炎起因菌 *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) は薬剤耐性化が進行し、ペニシリン系、セフェム系、およびマクロライド系薬剤などに抵抗性を示す多剤耐性菌の登場が報告されている。そのため、抗生剤に代わる新たな治療法の開発が急務となっている。以上のことから、現在の肺炎球菌感染症に対しては、細菌・宿主の感染メカニズムの解析結果に基づく感染制御法の検索が重要だと考えた。そこで、本研究期間では、申請者がこれまでに蓄積した研究手法や知見を基盤として、肺炎重症化機構を細菌と宿主の両面から分子レベルで解析し、長期的な治療・予防法研究の足掛かりとする。

## 2. 研究の目的

申請者は、歯周病という口腔内に特有の慢性細菌性感染症に着目し、口腔細菌と自然免疫との相互作用について研究を行ってきた。口腔細菌の病原因子が補体成分 C5 を分解して積極的に活性化 C5a を産生し、好中球を遊走させながらも C5a 受容体と TLR2 のクロストークを攪乱することで宿主による排除から逃れ、慢性化することを明らかにした (Wang, M., Krauss, J.L., Domon, H. *et al.*, *Sci Signal.* 2010)。この知見は、全身感染症である肺炎等では全く研究されていないことである。肺炎患者や肺炎病態の動物モデルでは、血清中および肺組織における C5a 濃度の上昇が見られると報告されている。さらに、C5a 受容体を攪乱するためには TLR2 とのクロストークが必要であるが、肺炎球菌の細胞壁の構成成分が TLR2 のリガンドであることから、肺炎球菌が口腔細菌と同様の機構を用いて好中球の殺菌機構から逃れる可能性を考えた。すなわち、「肺炎球菌が宿主の補体系を破綻させることで、好中球を感染局所に遊走させながらも殺菌されず、好中球内在性の酵素を過剰放出させて肺組織を破壊しながら、感染拡大を果たし重症化を起こす」という仮説である。これらの基礎的研究仮説ならびに臨床知見を踏まえ、肺炎球菌による肺炎モデルマウスを用い、同菌に対する宿主の免疫応答と排除機構、また排除からの回避機構を解明するため、補体免疫と好中球免疫の攪乱の

観点から、免疫学的、分子生物学的手法を用いて解析する。

## 3. 研究の方法

2ヶ年計画の研究初年度は、肺炎球菌の産生するプロテアーゼが C5 を分解して活性化型 C5a を産生する能力があるか、そして TLR-C5a 受容体のクロストークを利用して、肺炎球菌がマクロファージや好中球による殺菌から逃れるかどうかに関心を当てて研究を行う。TLR2-C5aR のクロストークが確認されなかった場合、肺炎球菌を認識する TLR と好中球の肺への浸潤の二つに焦点を当て、研究を行う。

計画2年目は、ヒト細菌性肺炎を模し、マウス肺炎モデルを構築する。ついで、感染後の肺における炎症応答を組織学的に評価すると共に、各種炎症性サイトカイン等の発現の変動を検討する。また、生体における肺炎球菌の排除能を C5a 受容体、および TLR ノックアウトマウス、あるいは好中球枯渇マウスを用いて評価する。最終的には、本研究の仮説を検証するため、抗体あるいは C5a 受容体アンタゴニストを用いて C5a の活性を抑制し、好中球の肺への遊走を阻害することが炎症の抑制と治療に適しているか検討を行う。

## 4. 研究成果

【平成26年度】

### (1) 肺炎球菌の補体成分 C5 分解能

肺炎球菌 D39 株もしくはその培養上清を用い、補体成分 C3 および C5 と混合した後、ウェスタンブロットにて補体成分に対する分解能を検討した。しかしながら、今回の実験条件下では明確な分解能が認められなかった。

### (2) 肺炎球菌による TLR2-C5aR のクロストーク攪乱現象の有無

肺炎球菌 D39 株を感染させた好中球に C5a を添加し、1-3 時間後に貪食された菌に対する殺菌能を比較したが、明らかな殺菌能の低下は認められなかった。

### (3) 肺炎球菌菌体に対する菌体認識 TLR

ヒト単球系細胞株 THP-1 を肺炎球菌 D39 株、熱処理した死菌、もしくは肺炎球菌の培養上清にて感染・刺激を行ったところ、生菌感染によるサイトカイン産生の上昇が有意に認められた。一方で、死菌もしくは培養上清刺激においてはサイトカイン産生が僅かであった。さらに、生菌感染時、サイトカラシン D を用いて単球細胞内への肺炎球菌の取り込みを抑制すると、有意にサイトカイン産生が減少することが明らかとなった。これらの結果より、肺炎球菌は好中球の細胞膜上のレセプターに認識される

と同時に、食後の細胞内においても認識を受け、サイトカイン産生を誘導していることが明らかとなった。

【平成 27 年度】

平成 26 年度の結果より、肺炎球菌が TLR2-C5aR のクロストークを利用していることが確認されなかった。したがって、当初計画どおりに進まない時の対応として、肺炎球菌を認識する TLR、好中球の肺への浸潤および肺炎球菌の免疫回避機構に焦点を当てた。

(4) 肺炎球菌の菌体内毒素ニューモリシンの遺伝子組換え体の作製

ニューモリシンは、TLR 認識と密接な関わりがあり、またその細胞毒性により好中球を破壊することが報告されている。そこで平成 27 年度は、まず大腸菌発現系を用い、ニューモリシンの遺伝子組換え体を作製した。

(5) 好中球に対するニューモリシンの細胞毒性

新潟大学倫理委員会の承認のもと（承認番号:25-R9-07-13）、ヒト由来の好中球を単離した。次に、ニューモライシンを培地に添加し作用を解析した。その結果、ニューモリシンは好中球の細胞膜に結合して破壊し、細胞死を誘導すること（図 1）、細胞死した好中球はエラスターゼを過剰に分泌すること（図 2）が明らかとなった。

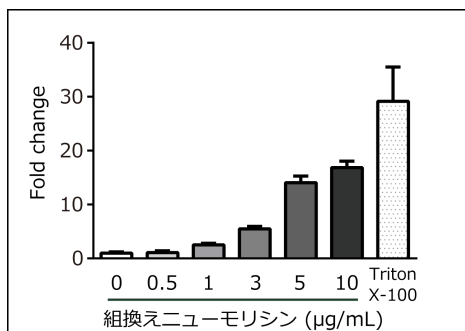


図 1. 好中球に対する細胞毒性 (LDH 遊離量)

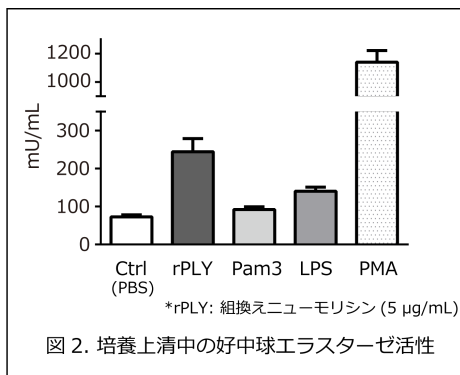


図 2. 培養上清中の好中球エラスターゼ活性

(6) in vitro における好中球エラスターゼの肺炎球菌殺菌作用

肺炎球菌培地中に好中球エラスターゼを各種濃度で添加して 6 時間インキュベートし、その殺菌能を評価した。結果、肺炎球菌はエラスターゼ存在下においても生菌数に影響が認められなかった。

(7) ニューモリシンのターゲット分子の検索

他の細菌種由来の孔形成毒素は、P2X7 レセプターに結合して病原性を発揮することが報告されている。免疫組織化学を用いて細胞死が誘導された好中球を解析すると、ニューモリシンと P2X7 レセプターの共有像が確認された。また、P2X7 レセプターアンタゴニストの作用によりニューモリシンによる細胞死が抑制されることが明らかとなった。一方、ニューモリシンを作用させた好中球において TNF 産生誘導は認められなかったことから、少なくともニューモリシン単独では TLR に認識されないことが判明した。

以上の結果より、肺炎球菌はニューモリシンを放出することで肺胞中に浸潤する好中球を細胞死させ、エラスターゼを放出させながらも自らは殺菌されず、宿主による排除から回避していることが明らかとなった。今後、好中球が放出したエラスターゼと肺炎の重症化についての解析を行う予定である

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 8 件)

1. 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 (Tokyo)*, 64: 246-257, 2016. DOI: 10.1248/cpb.c15-00828. 査読有
2. 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. DOI: 10.1111/1348-0421.12343. 査読有
3. 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. DOI: 10.1002/mbo3.308. 査読有

4. Kurosawa M, Oda M, Domon H, Saitoh I, Hayasaki H, Terao Y.: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor attenuates phagocytic activity of RAW 264.7 cells. *Microbes Infect*, 18: 118-127, 2016. DOI: 10.1016/j.micinf.2015.10.003. 査読有
5. 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. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00237. 査読有
6. Yamada H, Nakajima T, Domon H, Honda T, Yamazaki K.: Endoplasmic reticulum stress response and bone loss in experimental periodontitis in mice. *J Periodontal Res*, 50: 500-508, 2015. DOI: 10.1111/jre.12232. 査読有
7. Domon H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K.: Age-related alterations in gene expression of gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 49: 536-543, 2014. DOI: 10.1111/jre.12134. 査読有
8. Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Miyauchi S, Miyazawa H, Yamada H, Domon H, Tabeta K, Yamazaki K.: Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 49: 69-76, 2014. DOI: 10.1111/jre.12080. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 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, 平成 28 年 3 月 23-25 日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市)
2. 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, 平成 28 年 3 月 23-25 日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市)
3. 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, 平成 28 年 3 月 23-25 日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市)

4. 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, 平成 27 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市).
5. 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, 平成 27 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市).
6. 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, 平成 27 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市).
7. 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, 平成 26 年 10 月 17-18 日, 北陸大学薬学部, (石川県・金沢市)
8. 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, 平成 26 年 10 月 17-18 日, 北陸大学薬学部, (石川県・金沢市)
9. 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, 平成 26 年 10 月 17-18 日, 北陸大学薬学部, (石川県・金沢市)
10. 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, 平成 26 年 10 月 17-18 日, 北陸大学薬学部, (石川県・金沢市)
11. 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, 平成 26 年 9 月 25-27 日, 福岡国際

会議場（福岡県・福岡市）。

12. 小田 真隆, 黒澤 美絵, 土門 久哲, 寺尾 豊: A 群レンサ球菌 CAMP factor 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, 平成 26 年 9 月 25-27 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)。
13. 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, 平成 26 年 9 月 25-27 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)。
14. 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, 平成 26 年 9 月 25-27 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)。
15. 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 回口腔微生物研究会, 平成 26 年 9 月 25 日, リファレンスビル(福岡県・福岡市)。
16. 黒澤 美絵, 小田 真隆, 土門 久哲, 寺尾 豊: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor のマクロファージに対する病原性解析, 第 2 回口腔微生物研究会, 平成 26 年 9 月 25 日, リファレンスビル(福岡県・福岡市)。
17. 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 回口腔微生物研究会, 平成 26 年 9 月 25 日, リファレンスビル(福岡県・福岡市)。
18. 坂上 雄樹, 土門 久哲, 小田 真隆, 興地 隆史, 寺尾 豊: *Streptococcus pneumoniae* の自己溶解能による生存戦略メカニズムの検索, 第 2 回口腔微生物研究会, 平成 26 年 9 月 25 日, リファレンスビル(福岡県・福岡市)。

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土門 久哲 (DOMON, Hisanori)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 00594350