

令和3年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	たにぐち まふゆ 谷口 まふゆ	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	たにぐち ゆめ 谷口 結女	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4 年
	むらかみ まひろ 村上 真宙		歯学部 歯学科		4 年
					年
アドバイザー教員 氏名	住友 倫子	所属	歯学研究科 口腔細菌学教室		
研究課題名	細菌性髄膜炎の発症につながる新たな細菌伝播機構の解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
【研究目的】 口腔と鼻腔を含む上気道の常在細菌は血液脳関門を介して血行性に髄膜へ伝播し、髄膜炎を発症させると認識されてきた。高い致死率と後遺症の発生率が臨床的に問題であり、病態生理に基づく感染制御法や迅速検査法の開発が待ち望まれている。これまで、髄膜炎起因菌であり、鼻咽腔に定着する肺炎球菌やインフルエンザ菌が主な検査対象細菌として挙げられてきた。ところが、国立感染症研究所の細菌性髄膜炎に関する報告では、患者髄液検体の 50%以上で肺炎球菌やインフルエンザ菌などの検査対象菌種は検出されておらず、細菌性髄膜炎への菌性感染症及び口腔細菌の関与が疑われている。実際、副鼻腔炎に付随し、口腔レンサ球菌が細菌性髄膜炎を惹起する症例が散見されている¹⁾。改訂された「細菌性髄膜炎診療ガイドライン 2014」では、PCR 法による口腔細菌の検出が遺伝子診断項目に追加された²⁾。私たちは、以下に示す①～④の科学的根拠から、新規細菌伝播経路を推察した；① 患者血液検体の約 50% において旧検査対象細菌が検出されない、② 細菌性髄膜炎は上顎洞炎や蝶形骨洞炎などの副鼻腔炎に合併することが多い、③ 急性副鼻腔炎と慢性副鼻腔炎の病巣より、それぞれ口腔レンサ球菌と歯周病原菌が高頻度で検出される、④ 薬物の脳内デリバリーのため“Nose-to-Brain”経路が脳血液関門経路のバイパスとして着目されてきた。すなわち、上気道の常在細菌は、血液脳関門だけでなく嗅上皮中の嗅神経もしくは三叉神経の軸索を介して、非血行性に脳内の嗅球や脳幹へ伝播し、髄膜炎を発症させるという仮説に至った。 本研究では、肺炎球菌をモデル細菌として、非血行性髄膜炎マウスモデルを構築し、鼻咽腔に定着した細菌が血液脳関門を通過せず、非血行性に脳内へ到達する分子メカニズムの解明を行うことを目的とした。					

【研究計画】

本研究では、以下の2点について、詳細な解析を行うことを目的とした。

1. 鼻粘膜に定着する肺炎球菌が非血行性に脳組織に伝播するマウスモデルを構築し、肺炎球菌の脳組織への伝播に重要な細菌因子の検索を行う。
2. 鼻粘膜上皮バリアの傷害に寄与する細菌因子と宿主因子を同定し、肺炎球菌の脳伝播機構との関連を検証する。

【研究方法】**1. 非血行性髄膜炎マウスモデルの構築**

中耳炎由来の肺炎球菌 EF3030 株（血清型 19F）をマウス（Balb/c，メス，6 週齢）の鼻腔内に感染させた。経時的に鼻腔洗浄液中の菌数測定による細菌定着を検討し、マウス上気道への細菌の定着を試みた。所定時間経過後、感染マウスから鼻腔組織、嗅球、大脳、小脳、肺組織、および血液を採取し、組織懸濁液における菌数の測定と組織切片の免疫組織化学染色を行った。

2. ニューモライシン組換え体の作製

肺炎球菌 EF3030 株を親株として、コンピテンス刺激ペプチドを用いた相同組換えにより、ニューモライシン遺伝子 (*ply*) 欠失株を作製した。また、ニューモライシン (PLY) の N 末端側に GST タグを付与した組換えタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) に発現させ、菌体破砕液からアフィニティクロマトグラフィーにより、GST 融合 PLY を精製した。組換え PLY は PreScission protease (Cytiva) 処理により GST タグを除去し、マウス感染実験に使用した。

3. 鼻粘膜上皮バリア傷害機構の解析

マウス鼻腔内に肺炎球菌 EF3030 株（野生株）もしくは *ply* 遺伝子欠失株を感染させ、感染 3 日後のマウスから鼻腔洗浄液を採取した。鼻腔洗浄液中の RNA は RNeasy キット (Qiagen) で回収し、PrimeScript RT Regent Kit (TaKaRa) により cDNA を合成した。調製した cDNA を鋳型として、上皮バリアの機能維持に重要な遺伝子群の転写を RT-PCR 法により解析した。

【研究成果】**1. 非血行性髄膜炎マウスモデルの構築**

口腔細菌学教室ではこれまでに、口腔鼻咽腔領域に定着するレンサ球菌が、局所バリアの破綻および宿主免疫の回避を経て、遠隔組織で侵襲性疾患を惹起する分子機構を明らかにしてきた³⁻⁶⁾。培養細胞を用いた血液脳関門モデルにおいて、血管壁を裏打ちする脳血管内皮細胞に感染性を示さない多数の髄膜炎由来レンサ球菌株を認めた。この実験結果と疫学情報から着想を得て、肺炎と菌血症を伴わない非血行性髄膜炎発症マウスモデルの構築を試みた。私たちは、中耳炎由来の肺炎球菌 EF3030 株をモデル細菌としてマウス鼻腔内に感染させ非血行性に脳組織へ伝播するマウス

モデルの構築に成功した。この感染マウスモデルでは、肺組織と血液中から肺炎球菌は検出されなかった。一方で、脳組織ホモジネート中の菌数測定により、肺炎球菌が脳の嗅球から大脳と小脳に向かって伝播する現象を認めた。また、脳組織に侵入した細菌は感染 4 週間後でも持続感染し炎症応答を誘導することを見いだした。

2. ニューモライシン依存的な肺炎球菌の脳内伝播

化膿レンサ球菌感染症では、細菌が産生する毒素が上皮バリアを傷害し、細菌の組織伝播を亢進させることが明らかになっている^{3,6)}。そこで私たちは、EF3030 株を親株として、肺炎球菌が産生する細胞溶解毒素 ニューモライシン遺伝子 (*ply*) 欠失株を作製した。感染 1、3、7 日後において、野生株と *ply* 欠失株の鼻粘膜上皮への定着菌数に有意差は認められなかったが、嗅球、大脳、および小脳への伝播能は *ply* の欠失により有意に低下した (図 1)。また、感染 1 日後の肺組織では細菌が検出されたが、感染 3 日後以降は認められず、宿主防御機構によりクリアランスされたことが示唆された。また、肺炎球菌感染の 24 時間前に、組換えニューモライシン (rPLY) を経鼻投与することにより、*ply* 欠失株の伝播能は野生株と同等レベルまで回復した。以上の結果から、鼻咽腔に定着した肺炎球菌は PLY 依存的に非血行性に脳内へ伝播することが示唆された。

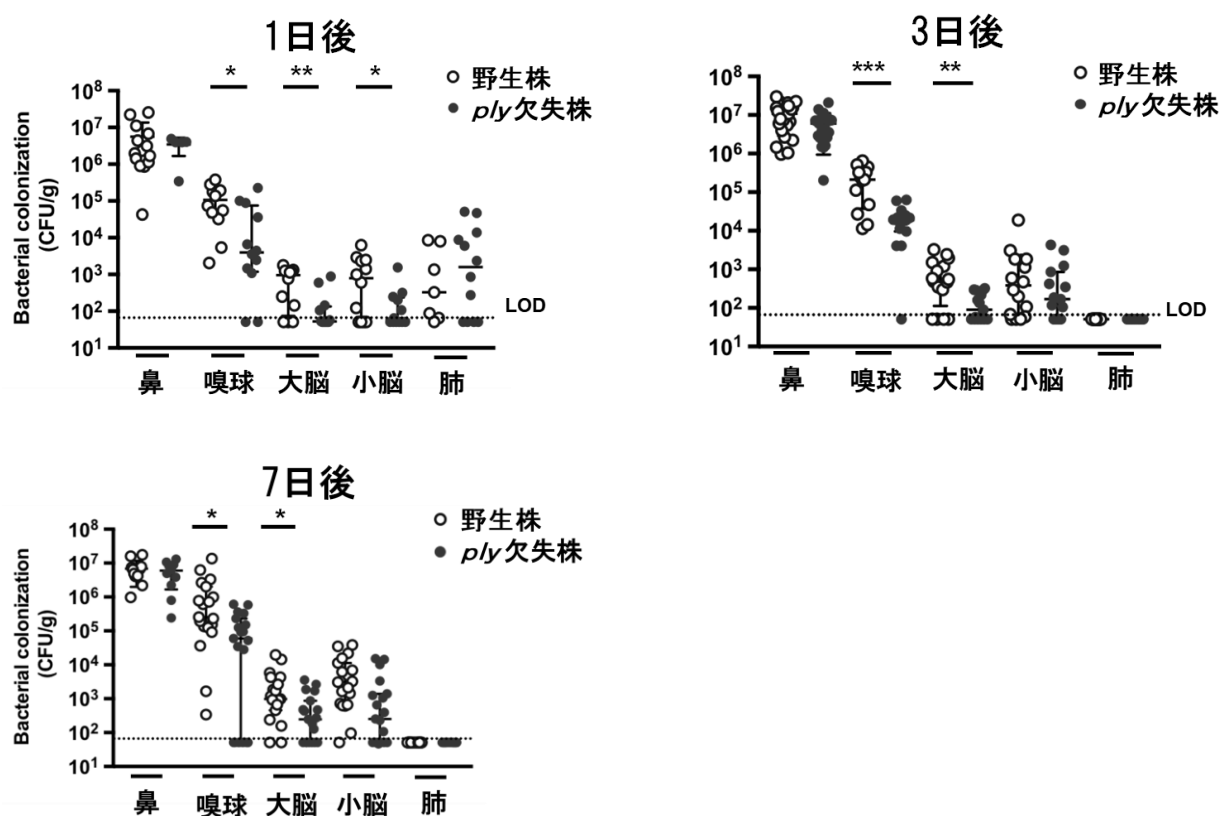
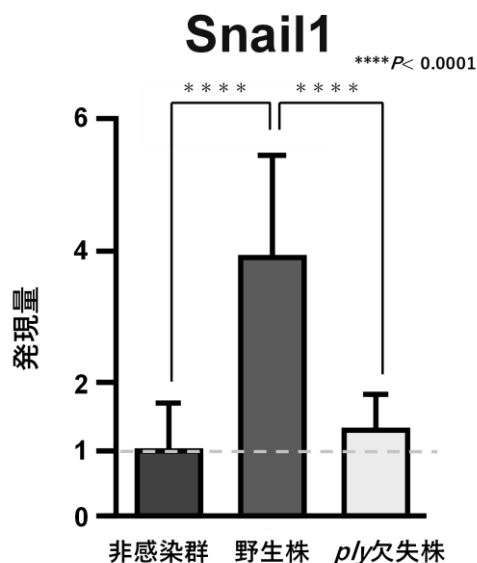


図 1. 肺炎球菌の脳組織への伝播

マウス (Balb/c, メス, 6 週齢) 鼻腔内に肺炎球菌 EF3030 株 (野生株) もしくは *ply* 欠失株を感染させ、所定時間経過後の各組織における菌数を測定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3. Snail1 依存的な鼻粘膜バリア傷害と細菌の脳組織伝播

肺炎球菌が感染した鼻粘膜上皮におけるバリア傷害と細菌の脳組織伝播の関連を検証するため、野生株もしくは *ply* 欠失株感染マウスから鼻腔洗浄液を回収し、上皮細胞間接着を担う分子群の発現を RT-PCR で解析した。野生株感染群の鼻腔洗浄液では、非感染群と比較して、細胞間接着分子群の転写を抑制する *Snail1* 遺伝子の発現上昇と、E-カドヘリンの発現低下を認めたが、*ply* 欠失株感染群では非感染群と同程度であった (図 2)。以上の結果から、鼻咽腔に定着する肺炎球菌は、ニューモライシンの作用により *Snail1* 依存的に鼻粘膜バリアを傷害し、嗅神経経路を介して脳組織に伝播することが示唆された。

図 2. 肺炎球菌感染マウスの鼻粘膜上皮における *Snail1* の発現

肺炎球菌 EF3030 株 (野生株) もしくは *ply* 欠失株感染マウスから鼻腔洗浄液を回収し、E-カドヘリンの転写を抑制する *Snail1* の発現を RT-PCR により解析した。

【参考文献】

- 1) Fukushima *et al.*, *Streptococcus sanguis* Meningitis: Report of a Case and Review of the Literature, *Internal Medicine*, 51: 3073-3076, 2012.
- 2) 亀井 聡, 細菌性髄膜炎診療ガイドライン 2014, *日本内科学会雑誌*, 106: 986-993, 2017.
- 3) Sumitomo, Takahara *et al.*, GP96 drives exacerbation of secondary bacterial pneumonia following influenza A virus infection, *mBio*, 12: e03269-20, 2021.
- 4) Hirose *et al.*, *Streptococcus pyogenes* upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface, *Cell Rep*, 34:108924, 2021.
- 5) Nakata *et al.*, Thermosensitive pillus production by FCT type3 *Streptococcus pyogenes* controlled by Nra regulator translational efficiency, *Mol Microbiol*, 113:173, 2019.
- 6) Sumitomo *et al.*, Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. *J Biol Chem*, 286: 2750, 2011.