

論 文 要 旨

Polyinosine-polycytidylic Acid Enhances Cellular Adherence of *Streptococcus pneumoniae*

〔 Polyinosine-polycytidylic acid が *Streptococcus pneumoniae* の上皮接着に及ぼす影響 〕

川 島 雅 樹

【序論および目的】

ウイルス性上気道感染症の後に、細菌感染が続発することが知られている。また、肺炎球菌は上気道の常在菌である一方で、急性中耳炎や急性副鼻腔炎の主な起因菌でもある。しかしながら、常在菌が病原菌へとなる機序についての詳細は解明されていない。近年、ウイルス感染症が肺炎球菌による下気道感染症を増強する報告もされている。ウイルスの構成成分であるdsRNA (double-stranded RNA) の合成化合物である Polyinosine-polycytidylic acid (Poly [I:C]) が肺炎球菌の咽頭上皮接着に与える影響について検討した。

【材料および方法】

ヒト咽頭癌細胞由来の Detroit 562 (ATCC CCL-138) を用いた。肺炎球菌は、上皮細胞の Platelet-activating factor receptor (PAF-R) を介して接着することが知られている。Poly [I:C] による Detroit 562 細胞の PAF-R 発現量の変化を Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)、Flow cytometry、免疫染色を行って検討した。また、Poly [I:C] による刺激前後での肺炎球菌の上皮接着数を比較した。Fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した肺炎球菌の上皮接着数を顕微鏡観察下に数えた。同時に、上皮に接着した細菌を血液寒天培地で培養し、コロニー数を数えた。更に、PAF-R のアンタゴニストによる肺炎球菌の上皮接着阻害効果を検討した。

【結 果】

Poly(I:C)の刺激により、Detroit 562のPAF-R発現量が増加した。また、肺炎球菌の接着も促進された。更に、この肺炎球菌の接着亢進の大部分は、PAF-Rのアンタゴニストにより抑制された。

【結論及び考察】

以上の結果より、RNA ウイルスの構成成分が存在することで、上皮の PAF-R 発現量が増加し肺炎球菌の上皮接着亢進することが示唆された。

RNA ウイルス感染により咽頭上皮細胞への肺炎球菌の接着が亢進することが、常在菌である肺炎球菌が病原菌となる理由の一つである可能性が示唆された。

(Laryngoscope Vol.121, No.11 2011年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第192号		学位申請者	川島 雅樹
審査委員	主査	井上 博雅	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査	吉家 清貴
	副査	出雲 周二	副査	西 順一郎

Polyinosine-polycytidylic Acid Enhances Cellular Adherence of *Streptococcus pneumoniae*
(Polyinosine-polycytidylic Acid が *Streptococcus pneumoniae* の上皮接着に及ぼす影響)
(Laryngoscope 2011; 121: 2443-2448)

ウイルス性上気道感染症の後に、急性中耳炎や急性副鼻腔炎などの細菌性上気道感染症が続発することが知られている。急性中耳炎や急性副鼻腔炎の主な起原菌である肺炎球菌は、鼻咽腔の常在菌でもある。しかしながら、鼻咽腔の常在菌が宿主に対して病原性を獲得する機序についての詳細は解明されていない。滲出性中耳炎や慢性副鼻腔炎では、健康人と比較して上咽頭や鼻粘膜への細菌接着性が亢進していることが知られており、粘膜上皮への細菌接着亢進が中耳炎や副鼻腔炎の発症に関与していることが考えられる。肺炎球菌は、菌表面に発現するPhosphorylcholine (PCho)が上皮細胞に発現しているPlatelet-activating factor receptor (PAF-R)に結合することで上皮に接着すると考えられている。そこで、本研究ではRNAウイルスが宿主細胞に感染し複製する際に生じる二本鎖RNA(dsRNA)の合成化合物Polyinosine-polycytidylic acid (Poly [I:C])を用いて、肺炎球菌の咽頭上皮接着への影響についてin vitroで検討した。咽頭上皮細胞は、ヒト咽頭癌由来のDetroit562細胞を用いた。肺炎球菌表面のPCho発現量をフローサイトメトリーで測定し、咽頭上皮細胞への接着性との関連を検討した。また、Poly(I:C)刺激による咽頭上皮細胞におけるPAF-Rの発現量の変化を免疫染色、フローサイトメトリー、real-time PCRにて解析した。さらに、Poly(I:C)刺激による咽頭上皮細胞への肺炎球菌接着数の変化を比較した。接着細菌数はFITC標識した細菌の接着数および接着細菌の培養により評価した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 肺炎球菌のPCho発現量と咽頭上皮細胞接着数は相関し、PCho高発現の菌株ほど上皮接着能が高い傾向にあった。
- 免疫染色とフローサイトメトリーでは、Poly(I:C)刺激により咽頭上皮細胞のPAF-Rの発現量が増加した。PAF-R mRNAの発現量も用量依存性に増加した。
- PCho高発現の菌株では、FITC標識した細菌の接着数および接着細菌の培養による評価のいずれにおいても、Poly(I:C)刺激により肺炎球菌の咽頭上皮細胞接着数が亢進した。
- Poly(I:C)刺激による肺炎球菌の接着亢進の大部分が、PAF-RアンタゴニストABT-491により有意に抑制された。

以上の結果より、RNAウイルス感染時に産生されdsRNAの存在により咽頭上皮細胞のPAF-R発現量が増加し、肺炎球菌の上皮接着が亢進することが示唆された。また、この細菌の接着亢進が常在菌である肺炎球菌が宿主に対して病原性を獲得する機序の一つである可能性が示唆された。

本研究は、細菌性上気道感染症の発症機序について検討したものであり、中耳炎や副鼻腔炎などの予防や治療についての臨床応用への道を開く基礎研究である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 192 号	学位申請者	川島 雅樹
審査委員	主査	井上 博雅	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査 吉家 清貴
	副査	出雲 周二	副査 西 順一郎

主査および副査の5名は、平成24年4月16日、学位申請者 川島 雅樹 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1：上咽頭粘膜に細菌が接着しやすくなることで、中耳炎や副鼻腔炎が起りやすくなるということか。

回答：滲出性中耳炎や慢性副鼻腔炎では、健常人と比較して上咽頭や鼻粘膜上皮への細菌接着性が亢進していることが知られている。したがって、そのように理解している。

質問2：dsRNAは、RNAウイルスが感染すると必ず産生されるのか。

回答：dsRNAは、RNAウイルスが宿主細胞に感染し複製する際に常に産生される。

質問3：PAF-Rの発現は、斑状に出現するものなのか。

回答：PAF-Rの発現部位に局在性があるのか否かについては不明である。癌細胞の cell line に特有の現象で、実際の咽頭上皮では異なることも推測される。

質問4：共焦点顕微鏡での観察は行ったか。

回答：共焦点顕微鏡での観察も行ったが、細菌の接着や接着部位の局在を明瞭に確認することができなかった。その為、FITC 標識した細菌を用いて実験を行った。

質問5：細菌培養による接着菌数の検討では、上皮細胞に接着している細菌を正確に数えられているのか。同一の上皮細胞上に接着した複数菌が1つのコロニーとし数えられている可能性はないか。

回答：その可能性を考慮し、コロニー数の計測とともに、顕微鏡下の観察による接着菌数の直接的な測定を行った。

質問6：顕微鏡下の観察で、肺炎球菌の輝度に違いが見られるのはなぜか。

回答：標本の乾燥の程度で輝度が異なる。また、細胞表面の凹凸により焦点深度がそれぞれの細菌で異なり、そのため肺炎球菌の輝度に違いがみられると考えられる。

質問7：Poly(I:C)による前処置を48時間行っている一方で、Real-time PCRでの検討を12時間で行ったのはなぜか。

回答：予備実験で Real-time PCR を2~24時間で、PAF-Rの発現は12~72時間で観察し、その至適時間がこの条件であったことによる。

質問8：Poly(I:C)の投与量を20 μ gにした理由はなにか。

回答：予備実験で1~50 μ gのPoly(I:C)を反応させて検討したところ、30 μ g以上の濃度では72時間の培養で上皮細胞の大部分が脱落等の細胞障害が認められた。そのため至適濃度として20 μ gを設定した。

質問9：Poly(I:C)の前処置と実際のRNAウイルス感染との最も大きな違いは何か。

回答：実際のウイルス感染では、ウイルスが細胞内へ侵入し増殖することで上皮細胞が障害される。Poly(I:C)の前処置ではウイルスの細胞内増殖の反応に類似しているが細胞障害は少ないと考える。

質問10：咽喉頭、鼻副鼻腔、中耳の粘膜上皮にはどのような違いがあるのか。

回答：咽喉頭は扁平上皮で、鼻副鼻腔粘膜は多列線毛円柱上皮で覆われるが、中耳粘膜は線毛円柱上皮や無線毛円柱上皮、扁平上皮が混在する。また咽頭粘膜と中耳粘膜で細菌の接着性が異なる事を確認している。

質問11：TLR3以外のTLRの影響はないか。

最終試験の結果の要旨

- 回答：TLR1,2,9それぞれのリガンドを用いて同様の実験を行ったが、いずれも PAF-R mRNA 発現への影響はなかった。
- 質問 12：細菌の Phosphorylcholine (PCho)の発現と細菌毒性の関連性を示すデータがあるか。
- 回答：今回用いた肺炎球菌は、マウスの腹腔内投与で敗血症を起こした。また、PCho は細菌が病原菌として細胞内へ侵入する際に発現が亢進することが知られている。
- 質問 13：細菌をフロサイトメトリーで解析する方法が一般的な手法か。また 10%ホルムアルデヒドによる固定は、細菌の表面抗原の固定に適しているか。
- 回答：フロサイトメトリーを用いた報告は過去に多数ある。細菌の固定についても過去の報告に従って行った。
- 質問 14：使用した肺炎球菌の血清型と形状はどうであったか。ムコイド型ではないか。
- 回答：血清型の確認は行っていない。寒天培地上のコロニー形状は、莢膜が薄い transparent 型であった。したがってムコイド型ではないと思われる。
- 質問 15：中耳炎の発症において、咽頭から中耳腔へと逆行性の感染を起こすのはなぜか。
- 回答：先行するウイルス感染で線毛運動が障害されるためと考えられている。鼻かみ、鼻すすりなどで機械的に細菌が送り込まれること、あるいは耳管内腔表面に沿って細菌が増殖することも知られている。
- 質問 16：接着菌数を数えるにあたって、グラム染色ではなく FITC 標識をして行ったのはなぜか。
- 回答：グラム染色でも可能であるが、上皮細胞も染色されるため、細菌の識別が難しい。それゆえ、菌数をより数えやすい FITC 標識による方法を用いた。
- 質問 17：接着菌数が 2 倍に増えることにどのような臨床的意義があるのか。
- 回答：細菌が接着する機会が 2 倍になると考えると意義がある。培養時間を延長すればもっと多くの細菌が接着し、さらに細胞表面で増殖すると予想される。
- 質問 18：PCho の発現について phase variation の影響は考慮したか。
- 回答：PCho は細菌の phase variation によって発現量が異なり、それが細菌の細胞内侵入に関与する。そのため、一定条件で培養した細菌を使用した。なお、培養時間によって PCho の発現量が異なることも予備実験で確認している。
- 質問 19：粘膜上皮のどこに TLR3 が発現するか。
- 回答：TLR3 は細胞表面上とエンドソームに存在することが知られている。
- 質問 20：pH の低下によって PAF-R の発現が亢進する報告がある。Poly (I:C)投与による pH の変化は調べたか。
- 回答：pH の値は確認していないが、Poly (I:C)の投与で培養液の色調は変化しなかったため pH の変化はなかったと考ええる。
- 質問 21：PAF-R を発現する他の細胞への接着について検討されている報告はあるか。
- 回答：血小板、マクロファージ、血管内皮細胞が PAF-R を発現していることが知られている。血管内皮細胞については細菌接着の実験がなされている。
- 質問 22：PAF-R のノックアウトマウスを用いた感染実験の報告はあるか。
- 回答：PAF-R のノックアウトマウスでは、肺炎球菌による敗血症が抑制されることが報告されている。
- 質問 23：PAF-R 発現が亢進する機序をどう考えるか。細胞内シグナルの解析は行っているか。
- 回答：Poly (I:C)による直接的な作用と、Poly (I:C)刺激によって産生される種々のサイトカインによる間接的な作用が推測される。細胞内シグナルについては観察していない。
- 質問 24：PAF-R 以外の受容体についての検討は行っているか。
- 回答：Polymeric immunoglobulin receptor も肺炎球菌の受容体となることが知られている。しかし、Poly (I:C)によるその発現増強は認められなかった。
- 以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。