



Title	マイコプラズマ肺炎の炎症惹起メカニズムの解明
Author(s)	民谷, 繁幸
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82192
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

2020 年度（令和 2 年度）博士論文

マイコプラズマ肺炎の 炎症惹起メカニズムの解明

大阪大学大学院薬学研究科 医療薬学専攻

創薬ナノデザイン学分野

博士課程 民谷繁幸

目次

略語一覧	2
緒論	3
本論	
第一節 マイコプラズマ肺炎の炎症惹起メカニズムの解明	5
第二節 遺伝的背景の異なるマウスを用いた感受性比較および炎症評価	42
第三節 ワクチン接種による肺炎悪化メカニズムの解明	57
結論	71
謝辞	72
参考文献	73

略語一覽

alum	• • •	Aluminium hydroxide gel
BALF	• • •	bronchoalveolar lavage fluid
BSA	• • •	Bovine serum albumin
CARDS	• • •	Community acquired respiratory distress syndrome
CFU	• • •	Colony Forming Unit
CXCL	• • •	C-X-C Motif Chemokine Ligand
DMSO	• • •	dimethylsulfoxide
ELISA	• • •	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	• • •	Fluorescence activated cell sorter
FCS	• • •	Fetal calf serum
H&E	• • •	hematoxylin and eosin
IFN	• • •	Interferon
Ig	• • •	Immunoglobulin
IL	• • •	Interleukin
LDH	• • •	Lactate dehydrogenase
MMP	• • •	matrix metalloproteinase
Mp	• • •	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
PCR	• • •	polymerase chain reaction
PMA	• • •	Phorbol 12-myristate 13-acetate
ROS	• • •	reactive oxygen species
RT-PCR	• • •	reverse transcription polymerase chain reaction
Siglec	• • •	Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
Th	• • •	helper T
TLR	• • •	Toll-like receptor

緒論

マイコプラズマは、自然界の中で最も小さい細菌であり¹、ヒトや動物において感染症の原因となる²⁻⁵。一般名としてマイコプラズマと称される病原体は、モリキューテス綱、マイコプラズマ目、マイコプラズマ科、マイコプラズマ属に分類される。ヒトから分離されるマイコプラズマは、約 17 種類あり、肺炎の原因菌である *Mycoplasma pneumoniae* (Mp)²、非淋菌性尿道炎の原因菌である *Mycoplasma genitalium*⁶、さらに新生児において中枢神経系感染症の原因となる *Mycoplasma hominis*⁷などが報告されている。特に、Mp に起因した肺炎、気管支炎を含む呼吸器感染症は、ヒトのマイコプラズマ感染症として最も報告数が多く、流行期においては、市中肺炎の約 20-40%を占めることが知られている²。Mp 肺炎は、かつて、オリンピックが開催される年に流行していたことから、オリンピック肺炎と呼ばれていたが、近年ではその周期は崩れ、日本においては 2011 年、2012 年、2016 年に大流行している。年間約 10000 人の罹患者が報告されているものの、潜在的には数十万から数百万人ほどの感染者が存在すると推定されている⁸。

一般に Mp 肺炎は、小児から高齢者に至る全ての年齢層が罹患するものの⁹、特に、5 歳から 14 歳の小児において最も好発することが知られている^{9,10}。発症初期には、頭痛、倦怠感、発熱などの症状がみられ、数週間にも及ぶ乾性咳嗽を特徴とし、身体面のみならず、精神面にも大きな影響を与える⁸。また、胸部高解像度コンピューター断層撮影において、コンソリデーション、すりガラス影を呈し、組織病理学的所見として、細気管支炎や間質性肺炎を呈することが報告されている^{11,12}。さらに Mp 感染症は、気管支炎や咽頭炎を含む呼吸器疾患の原因になるだけでなく¹³⁻¹⁵、自己免疫性溶血性貧血や、心膜炎、心筋炎、腎炎、髄膜炎など、血液、心臓血管系、胃腸管、皮膚に関連する疾患の原因となることが示唆されている¹⁶⁻¹⁸。

Mp は細胞壁を有さないことから、一般的な感染症治療に汎用される細胞壁合成阻害剤であるβラクタム系抗菌薬では奏功しないことが知られている^{2,19}。そのため、Mp 肺炎に対する治療には、第一選択薬としてクラリスロマイシンなど、蛋白質合成阻害剤であるマクロライド系抗菌薬が用いられる。しかし、2000 年頃からマクロライド系抗菌薬に対する耐性菌がアジアを中心として報告され¹⁹、特に 2010 年、中国において、検査検体の約 90%以上でマクロライド耐性 Mp が検出されている²⁰。日本においても、2011 年の流行時、マクロライド耐性 Mp の割合が 70%を超え、大きな社会問題となった²¹。これらマクロライド耐性 Mp による肺炎の治療には、蛋白質合成阻害剤であるテトラサイクリン系抗菌薬や DNA 合成阻害剤であるニューキノロン系抗菌薬など、第二選択薬の使用が推奨されている。一方で、Mp 肺炎が好発しやすい小児において、テトラサイクリン系抗菌薬では、一過性骨発育

不全、歯牙着色、エナメル質形成不全などが、ニューキノロン系抗菌薬では関節障害などの副作用が報告されており、第二選択薬の使用が制限されている^{13,22,23}。また、発熱が7日以上持続し、炎症マーカーであるLactate dehydrogenase (LDH) が480 IU/Lを超える重篤な肺炎に対しては、対症療法としてステロイド薬が有効であることが報告されている²⁴。しかし、小児呼吸器感染症診療ガイドライン作成委員会と日本小児科学会予防接種・感染対策委員会が共同で作成した「小児肺炎マイコプラズマ肺炎の診断と治療に関する考え方」において、副作用の観点から、安易なステロイド薬の使用は控えるように注意喚起が行われている。そのため、炎症抑制を目指す対症療法においても選択肢が限られている現状にある。本観点から、Mp感染症による炎症誘発機序の理解を通し、Mpの排除を妨げずに、過剰な炎症を抑制する治療戦略が切望されている。

Mp感染症における肺の病態は、Mpによる直接的および間接的な肺組織傷害により形成されることが知られている。直接的な傷害は、Mpが産生する過酸化水素によって誘発される。一方、間接的な傷害は、自然免疫系による過度の炎症により引き起こされ、Mp感染症による肺組織傷害の主体であると考えられている¹⁴。例えば、Mpが有するToll-like receptor-2 (TLR2) リガンドであるリポ蛋白質が、マクロファージ上のTLR2に認識されることで、種々の炎症性サイトカインが誘導され、好中球浸潤を伴う炎症病態に関与することが報告されている^{25,26}。また、Mp感染初期において、好中球浸潤を伴う肺組織の傷害が観察されるものの^{27,28}、好中球浸潤を含め、Mpによる炎症惹起メカニズムは未だ不明な点が多く残されている。そのため、有効な抗炎症薬の開発には至っておらず、Mp感染時における炎症の制御には未だ遠い現状にある。

治療法や対症療法が行き詰まる中で、Mp感染症を未然に予防可能なワクチンの開発が待望され続けている。しかし、Mpに対して有効で安全なワクチン開発の成功には、未だ至っていない。1960年代に、ホルマリンなどで不活化したMpを抗原としたワクチン開発が試みられたが、ワクチン接種により、逆に肺炎が悪化することが報告されている^{29,30}。約半世紀経った今日まで、ワクチン接種による肺炎悪化メカニズムの解明はなされておらず、ワクチン開発の大きな障壁となっており、未だにMp感染症に有効な予防手段は皆無である。

以上の観点から、Mp感染時における炎症惹起メカニズムおよび不活化Mpワクチン接種による肺炎悪化メカニズムの解明が、Mp感染症に対する新規抗炎症薬およびワクチン開発に向けて解決すべき課題であると言える。そこで、本博士論文では、Mp肺炎の病態形成メカニズムの解明を目指し、肺組織への好中球浸潤メカニズムを含む、炎症惹起メカニズムの解明を図った。さらに、新規ワクチン開発に向けた基盤情報取得のため、ワクチン接種による肺炎悪化メカニズムの解明を図り、新たな知見を見出したため、博士論文として纏める次第である。

本論

第一節 マイコプラズマ肺炎の炎症惹起メカニズムの解明

流行期における Mp 肺炎は、市中肺炎の約 20-40%を占めており²、特に、好発しやすい小児において重篤化しやすく、入院の原因となる例も少なくない^{9,10,31}。例えば、Okada らは、日本における 10 施設の医療機関において、肺炎で入院した 6 歳以上の小児のうち、約 30%が Mp 感染に起因した肺炎であると報告している³²。また、国立感染症研究所の報告によると、大流行した 2011 年、2012 年、2016 年の日本において、一定点あたりの患者数が例年の約 2 倍に増加したことが報告されており³³、第一選択薬であるマクロライド系抗菌薬に対する耐性菌の出現も相まって¹⁹、大きな社会問題となっている。

Mp 感染時に観察される肺傷害は、主に、自然免疫系が過度に活性化した結果として引き起こされると考えられている¹⁴。本観点について、マウス³⁴やヒト^{27,28}において、Mp 感染早期の肺胞腔における好中球浸潤を伴う炎症が病理所見として認められることがよく知られる。好中球は、自然免疫を担う主たる免疫細胞であり、外界からの異物や病原体の排除に寄与する反面、好中球が過度に活性化すると活性酸素などを放出し、組織傷害を引き起こす³⁵。さらに、好中球が Mp の排除に寄与しないとの報告も存在することから^{36,37}、Mp 感染早期の好中球浸潤は生体にとって少なくとも有益ではない可能性があり、Mp 肺炎の治療標的となり得ると推察される。

Mp は、TLR2 リガンドであるリポ蛋白質を保有していることが知られている²⁵。リポ蛋白質を用いた検討において、TLR2 シグナルが、種々の炎症性サイトカインを誘導し²⁵、好中球浸潤を伴う炎症病態を形成することが報告されている^{25,26}。このことから、Mp の TLR2 を介した炎症反応が、Mp 感染時の好中球浸潤を引き起こしている可能性も考えられるが、その関連は明らかではない。一方で、Mp がマクロファージに対して誘導する炎症反応が、*TLR2*^{-/-} マウス由来のマクロファージにおいて減弱しなかったことも報告されており³⁸、Mp 感染による炎症反応が TLR2 に限らず多様な経路を介して引き起こされていることは間違いない。本観点から、自己傷害につながる炎症経路と、菌の排除等に関わる炎症経路が異なる可能性も考えられ、詳細な炎症惹起メカニズムの解明は、菌の排除機構に影響を与えない安全な新規抗炎症薬の開発に繋がることが期待できる。

これまでに、Mp の病原因子として、気道上皮細胞への接着に必須である付着因子 (P1、P30 など)、グリセロール代謝産物として Mp から分泌される過酸化水素などが報告されている⁸。特に、2006 年に Baseman らによって同定された Community acquired respiratory distress syndrome (CARDS) toxin は、本来外毒素を産生しないと考えられてきた Mp より発見され、百日咳毒素に類似した外毒素である³⁹。Mp 肺炎に罹患した小児

の肺胞洗浄液中において、CARDS toxin の mRNA 量が上昇し、それらが炎症性サイトカインと正の相関を示すことから、CARDS toxin が Mp 感染時における炎症に寄与する可能性が指摘されている⁴⁰。また、マウスやヒヒを用いた検討においても、組換え CARDS toxin 蛋白質投与により、好中球浸潤を伴う炎症惹起および気道機能の障害が観察されている^{41,42}。さらに、実際に Mp 感染早期において、CARDS toxin が、マウス肺内において増加することは報告されているものの^{43,44}、Mp 感染時に観察される炎症と CARDS toxin の関連については未だ不明である。本節では、Mp 感染早期において観察される好中球浸潤に関して、Mp 肺炎における役割を評価すると共に、その誘導メカニズムに関して、既存の報告から関与が疑われる TLR2 および CARDS toxin という二つの観点から追求した。

【実験材料と方法】

試薬

Mp (FH 株) は、American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。PPLO broth、Yeast extract、PPLO agar は、Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) より購入した。Horse serum、Collagenase Type IV は、Thermo Fisher Scientific (Hampton, NH, USA) より購入した。Penicillin G、Phenol red、Insulin は、Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。Glucose、Deoxyribonuclease I、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (×100)、Glycerol、Kanamycin sulfate、Dimethyl sulfoxide は、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より購入した。Butylated hydroxyanisole (BHA)、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。cOmplete® mini EDTA-free protease inhibitor は、Roche (Indianapolis, IN, USA) より購入した。Ac-YVAD-CHO は、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) より購入した。Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA-2Na)、Ammonium chloride (NH₄Cl)、Potassium hydrogen carbonate (KHCO₃)、Dulbecco's Modified Eagle Medium、ホルムアルデヒド液 (ホルマリン)、LB broth、Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。抗 CARDS toxin 抗体、CARDS toxin 発現プラスミドは、一般財団法人阪大微生物病研究会 (Osaka, Japan) より供与頂いた。

実験動物

6-7 週齢の BALB/c マウス (雄) は、日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。遺伝的バックグラウンドを BALB/c とする TLR2 欠損マウスは、Oriental Bio Service (Kyoto, Japan) より購入した。マウスは室温で 12 時間ごとの点灯、消灯のサイクルで飼育した。全ての動物実験は大阪大学微生物病研究所の動物実験施設で行い、大阪大学動物実験規定に準じた。

Mp 培養

Mp は、IWAKI 組織培養用ディッシュ (φ93 × 21 mm, AGC technoglass, Shizuoka, Japan) を用い、PPLO 培地 (pH 7.6 : PPLO broth、10% horse serum、0.25% yeast extract、1000 U/mL penicillin G、0.25% glucose、0.002% phenol red) 9 mL と Mp ストック (約 3.5×10^7 CFU/mL) 1 mL で 37°C、1 日間培養した。翌日、PPLO 培地は橙黄色になったことを確認し、セルスクレーパー (Sumitomo Bakelite, Co., Ltd., Tokyo, Japan) でディッシュに接着する Mp を剥がし、Mp 液を 10mL 回収した。その後、細胞培養用フラスコ 75 cm² (ASONE, Osaka, Japan) 3 枚にそれぞれ Mp 液 3 mL と新しい

PPLO 培地 27 mL を加え、37℃、2 日間培養した。培養後、PPLO 培地 が 橙-黄色 になったことを確認し、セルスクレーパーでフラスコに接着する Mp を剥がし、Mp 液を 90mL 回収した。その後、フラスコ 14 枚にそれぞれ Mp 液 5 mL と新しい PPLO 培地 25 mL を加え、37℃、1 日間培養した。培養後、PPLO 培地 が 橙-黄色 になったことを確認し、培養上清を取り除き、新しい PPLO 培地 10 ml を加え、セルスクレーパーでフラスコに接着する Mp を回収した。さらに、新しい PPLO 培地 5 mL を加え、セルスクレーパーでフラスコに残存する Mp を回収した。回収した Mp 液 15 mL は、1.5 mL チューブに 300 μ L ずつ分注し、-80℃で保存した。

Mp ストックのタイター確認

-80℃で保管している Mp を室温で溶解し、PPLO 培地で 10 倍段階希釈 ($10^1 \sim 10^7$) した。その後、PPLO 寒天培地 (PPLO agar、10% horse serum、0.25% yeast extract、1000 U/mL penicillin G、0.25% glucose) に 10^5 、 10^6 、 10^7 倍希釈した Mp 液を 10 μ L ずつ各 2 箇所 に 滴下 した。滴下した Mp 液がプレート上で乾燥したことを確認した後、37℃で 2 週間培養した。培養後、光学顕微鏡を用い、各希釈倍率における 2 点の平均コロニー数を計測し、Mp のタイターを確定した (約 2.0×10^9 CFU/mL)。

Mp 感染

-80℃で保管している Mp を室温で溶解し、6000 \times g、3 分で遠心、上清を回収した後、ペレットを PBS で 2 回洗浄した。その後、 1.5×10^9 CFU/mL となるように、PBS を加え、25G 針 (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) を用いて、再懸濁した。マウスに麻酔下で、Mp (1.5×10^9 CFU/mL) を片鼻 20 μ L ずつ、計 40 μ L (6.0×10^7 CFU/mouse) で経鼻投与した。

肺胞洗浄液の回収

マウスに Mp を感染させた後、麻酔下で開腹し、腎動脈切断により脱血することでマウスを安楽死させた。次に、横隔膜を切除し気管を露出させ、22G 留置針 (Terumo Corporation) を気管に穿刺し、カテーテルを挿管した。挿管後、気管を 5-0 縫合糸 (Alfresa Pharma Corporation, Osaka, Japan) により結紮した。1 mL シリンジ (Terumo Corporation) を用い、PBS を 0.7 mL 肺内に投与し、回収した。続けて、PBS を 0.5 mL 投与し、回収することにより肺胞洗浄液を約 1 mL 採取した。肺胞洗浄液を 6000 \times g、4℃、5 分で遠心し得られたペレットは、Mag Extractor (TOYOBO, Osaka, Japan) で DNA を抽出し、real-time PCR (Light Cycler 480 SYBR Green, Roche, Mannheim, Germany) を用い、肺胞洗浄液中の菌量を評価した。また、上清はサイトカインの評価に用いた。さらに、肺胞

洗浄液を 600 × g、4°C、5 分で遠心し、ペレットはフローサイトメーターで免疫細胞数を評価、上清は組織傷害のマーカーである LDH の評価に使用した。

肺胞洗浄液中における菌量評価

肺胞洗浄液 400 μL を 6000 × g、5 分遠心し、ペレットは Mag Extractor を用い、DNA を抽出した。プロトコールは kit に準じた。肺胞洗浄液中の菌量は、real-time PCR を用いて測定した。Mp の P1 DNA 特異的なプライマー (forward, 5'-ATA CCC AAC CAA ACA ACA ACG TTC AG-3'; reverse, 5'-TTG GGG ACC TTG ACT GGA GGC CGT TA-3') を用いた。また、既知の Mp ストックを希釈した後、それぞれ DNA 抽出して、スタンダードを作製 (10⁷ CFU - 10¹ CFU) し、肺胞洗浄液中の菌量を定量した。

肺胞洗浄液中における組織傷害マーカー評価

Mp を感染後の肺胞洗浄液を回収し、600 × g、5 分遠心した。遠心後、上清を回収し、上清 100 μL に LDH assay 液 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を 100 μL 加えて、暗所で 10 分間静置した。その後、LDH stop 液 50 μL を添加して、反応を停止させ、microplate reader (Power Wave HT, BioTek, Winooski, VT, USA) を用いて OD₄₉₀ を測定した。

肺における炎症性細胞浸潤評価(H&E 染色)

マウスに Mp を感染させ、1 日後、麻酔下で開腹し、腎動脈切断により脱血することでマウスを安楽死させた。次に、横隔膜を切除し、心臓を露出させ、26G 針を左心室に挿入し、5 mL シリンジ (Terumo Corporation) を用いて、PBS で血液を環流した。環流後、22G 留置針を気管に穿刺し、カテーテルを挿管した。挿管後、気管を 5-0 縫合糸により結紮した。組織固定には、PBS で 10 倍希釈したホルマリンを使用した。1 mL シリンジを用い、ホルマリンを 1 mL 肺内に注入し、組織を固定した。回収した肺は、ホルマリン中、室温で 1 日間静置した後、保存液を PBS に置換し、4°C で保存した。そして、H&E 染色およびその病理解析は、Applied Medical Research Laboratory (Osaka, Japan) に依頼した。

肺胞洗浄液中における免疫細胞数評価

Mp を感染後の肺胞洗浄液を回収し、そのうち 300 μL を 6000 × g、5 分遠心した。遠心後、上清を取り除き、ペレットに ACK lysis buffer (0.1 mM EDTA-2Na, 10 mM KHCO₃, 150 mM NH₄Cl 溶解水) を 500 μL 添加し、混和後、室温で 5 分静置し溶血させた。その後、FACS バッファー (1 w/v% BSA-PBS) を 500 μL 加え、溶血反応を止め、600 × g、4°C、5 分遠心した。上清を 900 μL 取り除き、残り 100 μL でペレットを再懸濁し、96 well U-bottomed culture plate (Thermo Fisher Scientific) に播種した。プレートを 600 ×

g、4°C、5分遠心、上清を取り除き、FACS バッファーで anti-mouse CD16/CD32 抗体 (clone: 93, BioLegend) を終濃度 10 µg/mL となるように調製し、50 µL/well で添加した。添加後、4°C、20 分間静置した。その後、FITC anti-Ly6G 抗体 (clone: 1A8, BioLegend) を終濃度 2.5 µg/mL、APC/Cy7 anti-CD11c 抗体 (clone: N418, BioLegend) を終濃度 10 µg/mL、BV421 anti-CD45 抗体 (clone: 30-F11, BioLegend) を終濃度 2.5 µg/mL、BV785 anti-CD11b 抗体 (clone: M1/70, BioLegend) を終濃度 2.5 µg/mL、APC anti-Siglec-F 抗体 (clone: REA798, Miltenyi Biotec) を終濃度 3.0 µg/mL となるようにプレートに添加し、遮光条件下、4°C で 20 分間静置し染色した。染色後、FACS バッファーによる洗浄 (FACS バッファーを 150 µL/well で添加し、ピペティング後、600 × g、4°C、5分遠心し上清を廃棄) を 2 回行い、FACS バッファーを 100 µL/well で添加、懸濁しフローサイトメーター (NovoCyte Flow Cytometer, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) を用いて解析した。

また、Mp 感染 3 時間後における肺胞マクロファージの細胞死の評価は、上述する方法を用いて、抗体による染色を行った後、FACS バッファーによる洗浄を 2 回行い、上清を取り除き、7-amino-actinomycin D (7-AAD) Viability Staining Solution (BioLegend) を 1 vol% で添加した FACS バッファーを 100 µL/well で添加、懸濁しフローサイトメーターを用いて解析した。

解析にあたり、免疫細胞画分を CD45⁺、好中球画分を CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻、肺胞マクロファージ画分を CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺ として解析した。

肺胞洗浄液中におけるサイトカイン評価

肺胞洗浄液を 6000 × g、5 分で遠心し、上清を回収した後、ELISA kit を用い、IL-1α (433401, BioLegend)、IL-6 (431301, BioLegend)、IL-12 p40 (431601, BioLegend)、matrix metalloproteinase 9 (MMP-9; MMPT90, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を測定した。プロトコールは各 kit に準じた。

肺胞洗浄液中におけるケモカイン評価

肺胞洗浄液を 6000 × g、5 分で遠心し、上清を回収した後、ELISA kit を用い、CXCL1 (MKC00B, R&D Systems)、CXCL2 (MM200, R&D Systems) を測定した。プロトコールは各 kit に準じた。

Mp 感染時における好中球の寄与評価

好中球を欠失させるために、Mp 感染 1 日前に、Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse Ly-6G Antibody (100 µg/mouse, clone: 1A8, BioLegend) を PBS で希釈し、26G 針と 1

mL シリンジを用い、各マウス 300 μ L で腹腔内投与した。また、コントロール抗体として、Ultra-LEAF™ Purified Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody (100 μ g/mouse, clone: RTK2758, BioLegend) を用いた。そして、先に述べた方法を用い、Mp を感染させた。感染 1 日後の肺胞洗浄液を回収し、菌量は real-time PCR、組織傷害は LDH assay、サイトカインは ELISA を用いてそれぞれ評価した。

肺胞洗浄液のメッセンジャーRNA 評価

肺胞洗浄液を 6000 \times g、5 分で遠心し、上清を取り除き、Fast Gene RNA Basic-Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用い、ペレットを溶解して、RNA を抽出した。その後、RNA 量は、NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) を用いて、測定した。そして、RNA は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写し、cDNA を得た。肺胞洗浄液中のサイトカイン mRNA は、real-time PCR を用いて測定した。IL-1 α DNA 特異的なプライマー(forward, 5'- TGA AGA AGA GAC GGC TGA GT -3'; reverse, 5'- TGG TAG GTG TAA GGT GCT GAT -3')、IL-6 DNA 特異的なプライマー(forward, 5'- TGA ACA ACG ATG ATG CAC TTG CAG A -3'; reverse, 5'- TCT GTA TCT CTC TGA AGG ACT CTG GCT -3')、GAPDH DNA 特異的なプライマー(forward, 5'-TGA CGT GCC GCC TGG AGA AA -3'; reverse, 5'-AGT GTA GCC CAA GAT GCC CTT CAG-3')を用いた。

IL-1 α および IL-12 p40 に起因する好中球浸潤の評価

Mp 感染時における好中球浸潤に及ぼす IL-1 α や IL-12 p40 の寄与を評価するために、感染 1 時間前に、PBS で希釈し、調製した Mouse IL-1 alpha/IL-1F1 Antibody (20 μ g/mouse, Polyclonal, R&D Systems) と InVivoMAb anti-mouse IL-12 p40 Antibody (50 μ g/mouse, clone: C17.8, Bio X Cell) を麻酔下のマウスに片鼻 20 μ L ずつ、計 40 μ L で経鼻投与した。また、抗 IL-1 α 抗体のコントロール抗体として、Normal Goat IgG Control Antibody (20 μ g/mouse, Polyclonal, R&D Systems)、抗 IL-12 p40 抗体のコントロール抗体として InVivoMAb rat IgG2a isotype control Antibody (50 μ g/mouse, clone: 2A3, Bio X Cell) をそれぞれ用いた。投与 1 時間後、先に述べた方法を用い、Mp を感染させた。感染 1 日後および 3 日後において肺胞洗浄液を回収し、菌量は real-time PCR、組織傷害は LDH assay、免疫細胞数はフローサイトメーターを用いてそれぞれ評価した。

肺胞マクロファージの単離培養

マウス 12 匹を麻酔下で開腹し、腎動脈切断により脱血することで安楽死させた。次に、横隔膜および心臓を切除し、気管を露出させ、気管も含めて肺を回収し、6 穴プレートに加

えた 5%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (PBS で希釈) 中で数分間静置した。さらに、ホモジナイズ用メディウム (100 U/mL Deoxyribonuclease I、200 U/mL collagenase Type IV、3%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液添加 DMEM) 10 mL を加えた Gentle MACS C Tube 3 本 (Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany) に 6 穴プレートに静置していた肺 (各 4 匹分) を加え、解剖用のハサミで細切れにした。その後、37°C 条件下で、シェイカー (170 rpm : NR-10, Taitec, Saitama, Japan) を使用し、1 時間培養した。培養後、Gentle MACS™ Dissociator (Miltenyi Biotech) を用い、肺をホモジネートした。50 mL チューブにホモジネート液を移し、Gentle MACS C Tube に PBS 10 mL を加えて洗浄し、その後、ホモジネート液の入った 50 mL チューブに移して、300 × g、1 分で遠心した。次に、オートピペッターを用いて、遠心後のペレットと上清を再懸濁し、70 μm セルストレーナー (Corning Inc., Corning, NY, USA) に通して細胞塊を除き、50 mL チューブにスルー液を回収した。スルー液を 300 × g、10 分で遠心後、上清を取り除き、ペレットを 10 mL の PBS で懸濁、30 μm セルストレーナー (Miltenyi Biotech) に通し、15 mL チューブにスルー液を回収した。スルー液を 300 × g、10 分で遠心後、上清を取り除き、ペレットを 10 mL の PBS で懸濁、細胞を洗浄した。洗浄後、300 × g、10 分で遠心し、上清を取り除き、ペレットを肺胞マクロファージ培養用メディウム 10 mL (10% FCS、5 μg/ml Insulin 添加 DMEM) で懸濁した。そして、Gentle MACS C Tube 3 本分 (30 mL) をプールし、肺胞マクロファージ培養用メディウム 50 mL を加え、細胞培養用フラスコ 75 cm² (ASONE) 4 本を用いて、各総液量 20 mL、37°C で培養した (Day 0)。その後、Day 1、Day 2、Day 3 でメディウム交換を行い、Day 5 において、肺胞マクロファージ培養用メディウムを 10 mL 追加した。肺胞マクロファージは、線維芽細胞上で増殖するため、day 6 において、シェイカー (170 rpm) を用い、37°C、1 時間振盪し、線維芽細胞から肺胞マクロファージを遊離させた。振盪後、上清を回収し、600 × g、5 分で遠心、上清を取り除き、PBS 10 mL を用い、細胞を洗浄した。さらに、600 × g、5 分で遠心し、上清を取り除き、細胞培養用メディウム (10% FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 RPMI1640) に置換し、細胞数を測定した。なお、本培養液中には、肺胞マクロファージと間質マクロファージが約 1:1 で存在する。

培養肺胞マクロファージと Mp の共培養

培養した肺胞マクロファージは、 5.0×10^4 cells/well となるよう、細胞培養用メディウムで調製し、96 well flat-bottomed culture plate (Thermo Fisher Scientific) に播種した。そして、37°C で 2 時間静置することで、肺胞マクロファージをプレートに接着させた。その後、上清をアスピレーターで取り除き、PBS 150 μL で 2 回洗浄し、各濃度の Mp (1.0×10^8 CFU、 1.0×10^7 CFU、 1.0×10^6 CFU/well) を添加し、総液量 100 μL で、

37°C、24 時間培養した。培養後、回収した上清は、LDH assay およびサイトカイン量の評価に使用した。

培養上清中における組織傷害マーカー評価

培養した肺胞マクロファージと Mp を共培養後、600 × g、5 分遠心し、上清を回収した。上清 20 μL に PBS 80 μL を加え、さらに、LDH assay 液を 100 μL 加えて、暗所で 10 分間静置した。その後、LDH stop 液 50 μL を添加して、反応を停止させ、microplate reader を用いて OD₄₉₀ を測定した。

活性酸素によるサイトカイン誘導評価

培養した肺胞マクロファージは、 5.0×10^4 cells/well となるよう、細胞培養用メディアウムで調製し、96 well flat-bottomed culture plate (Thermo Fisher Scientific) に播種した。そして、37°C で 2 時間静置することで、肺胞マクロファージをプレートに接着させた。その後、上清をアスピレーターで取り除き、PBS 150 μL で 2 回洗浄し、BHA(終濃度 150 μM, Sigma-Aldrich)および各濃度の Mp (1.0×10^8 CFU、 1.0×10^7 CFU/well) または、Pam2CKS4 (終濃度 10 ng/mL, InvivoGen, San Diego, CA, USA) を添加し、総液量 100 μL で、37°C、24 時間培養した。24 時間培養後、回収した上清は、LDH assay およびサイトカイン量の評価に使用した。

組換え CARDS toxin 蛋白質の作製

BL21(DE3) Competent *E. coli* (New England BioLabs Inc., MA, USA) は、CARDS toxin 発現プラスミドと共に、氷上で 30 分間静置し、42°C、10 秒でヒートショックした後、氷上で 5 分静置し、トランスフォーメーションした。その後、CARDS toxin 発現プラスミドを有する BL21 (DE3) は、終濃度 30 μg/mL kanamycin 含有 LB 液体培地 500 mL 中で OD₆₀₀ が 0.6 になるまで、37°C で培養した。培養後、終濃度 0.5mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、18°C、16 時間培養することで、組換え CARDS toxin 蛋白質を誘導した。16 時間後、培養液 500 mL を 50 mL チューブに分注し、5000 × g、10 分遠心して、上清を取り除き、ペレットを回収した。ペレットは、プロテアーゼインヒビター (cOmplete® Mini, Roche) を加えた binding buffer 10 mL (20 mM Tris-HCl [pH 7.0], 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) で懸濁し、超音波ホモジナイザー (Tomy International, Tokyo, Japan) を用いて、大腸菌を破碎した。その後、破碎した懸濁液を 50 mL チューブに分注し、15000 × g、30 分遠心して、上清を回収した。回収した上清は、0.45 μm フィルター (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて、細胞断片等を取り除いた。その後、Ni-Sepharose HisTrap FF column (GE Healthcare,

Diegem, Belgium) を取り付けた AKTA explorer chromatography system (GE Healthcare) を用いて精製した。まず、回収した上清を His Trap FF column に流し、His タグ付き蛋白質をカラムに吸着させた。その後、elution buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.0], 500 mM NaCl, 500 mM imidazole) で溶出した。回収した組換え CARDS toxin 蛋白質溶液は、EndoTrap[®] HD column (LIONEX, Braunschweig, Germany) を用いて、エンドトキシンを取り除いた。精製した組換え CARDS toxin 蛋白質溶液に含まれるエンドトキシン量は、Limulus Color KY Test (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて測定した (< 0.05 EU/μg)。回収した組換え CARDS toxin 蛋白質溶液は、Amicon Ultra 30k spin filter (Merck Millipore) を用いて、濃縮した後、a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、蛋白質量を測定した。

Mp 感染時における CARDS toxin の寄与評価

Mp 感染 1 日後における好中球浸潤に CARDS toxin が寄与するのかを評価するために、抗 CARDS toxin 抗体 (20 μg/mouse, polyclonal) を用いた。Mp と抗 CARDS toxin 抗体を PBS で希釈、混合し、混合液を作製した (Mp 終濃度 : 1.5×10^9 CFU/mL、抗体 : 0.5 mg/mL)。コントロール抗体として、Rabbit IgG-UNLB (20 μg/mouse, polyclonal, SouthernBiotech) を用いた。その後、麻酔下のマウスに混合液を片鼻 20 μL ずつ、計 40 μL で経鼻投与した (Mp : 6.0×10^7 CFU/mouse、抗体 : 20 μg/mouse)。感染 1 日後において肺胞洗浄液を回収し、肺胞洗浄液中の好中球数は、フローサイトメーターを用いて解析した。

また、Mp 感染 3 日後における好中球浸潤に CARDS toxin が寄与するのかを評価するために、上述した方法と同様に、Mp と抗体をマウスに経鼻投与した (Mp : 6.0×10^7 CFU/mouse、抗体 : 20 μg/mouse)。さらに、感染 2 日後において、抗体のみをマウスに経鼻投与し (抗体 : 20 μg/mouse)、感染 3 日後において肺胞洗浄液を回収後、肺胞洗浄液中の好中球数は、フローサイトメーターを用いて解析した。

組換え CARDS toxin 蛋白質の空胞化活性評価

作製した組換え CARDS toxin 蛋白質が、過去の報告と同様、空胞化活性を有するのかを評価した。まず、A549 細胞は、 1.0×10^4 cells/well となるよう、細胞培養用メEDIUM で調製し、96 well flat-bottomed culture plate に播種し、37°C、24 時間培養した。培養後、上清はアスピレーターを用いて取り除き、PBS 200 μL/well で 2 回洗浄した。上清を取り除いた後、無血清培地を用い、各濃度で調製した CARDS toxin (0 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL) を 100 μL/well で添加し、37°C で培養した。培養 2 時間後において、FCS

を 5 μ L/well (終濃度 5%) で添加し、37°C で 48 時間培養した。培養後の細胞は、蛍光顕微鏡 (BZ-X700 : KEYENCE Co., Osaka, Japan) を用いて、空胞を観察した。

組換え CARDS toxin 蛋白質の IL-1 β 誘導能評価

作製した組換え CARDS toxin 蛋白質が、過去の報告と同様、IL-1 β 誘導能を有するのかを評価した。まず、THP-1 細胞は、 6.0×10^5 cells/mL となるよう、細胞培養用メディアウムで調製し、THP-1 細胞 50 μ L (3.0×10^4 cells/well) を 96 well flat-bottomed culture plate に播種し、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 50 μ L (終濃度 0.5 μ M) を添加後、計 100 μ L で 37°C、24 時間培養した。培養後、上清はアスピレーターを用いて取り除き、PBS 200 μ L/well で 2 回洗浄した。上清を取り除いた後、無血清培地で調製した CARDS toxin (終濃度 100 μ g/mL) とカスパーゼ 1 阻害剤である Ac-YVAD-CHO (終濃度 30 μ M) を各 50 μ L/well で添加し、37°C で培養した。Ac-YVAD-CHO は DMSO に溶解しているため、コントロールは DMSO を用いた。培養 2 時間後において、FCS を 10 μ L/well (終濃度 10%) で添加し、37°C で 24 時間培養した。培養後、600 \times g、5 分遠心し、培養上清を回収した。回収した上清中における IL-1 β は、Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA kit (R&D Systems) を用いて評価した。

組換え CARDS toxin 蛋白質経鼻投与

マウスに麻酔下で、組換え CARDS toxin 蛋白質 (1.25 mg/mL) を片鼻 20 μ L ずつ、計 40 μ L (50 μ g /mouse) で経鼻投与した。投与 12 時間後および 1 日後において肺胞洗浄液を回収し、組織傷害は LDH assay、免疫細胞数はフローサイトメーター、サイトカインおよびケモカインは ELISA を用いてそれぞれ評価した。

組換え CARDS toxin 蛋白質投与時における IL-1 α および IL-12 p40 の寄与評価

組換え CARDS toxin 蛋白質投与時における好中球浸潤に及ぼす IL-1 α や IL-12 p40 の寄与を評価するために、PBS で調製した Mouse IL-1 alpha/IL-1F1 Antibody (20 μ g/mouse, Polyclonal, R&D Systems) と InVivoMAb anti-mouse IL-12 p40 Antibody (50 μ g/mouse, clone: C17.8, Bio X Cell) を麻酔下のマウスに片鼻 20 μ L ずつ、計 40 μ L で経鼻投与した。また、抗 IL-1 α 抗体のコントロール抗体として、Normal Goat IgG Control Antibody (20 μ g/mouse, Polyclonal, R&D Systems)、抗 IL-12 p40 抗体のコントロール抗体として InVivoMAb rat IgG2a isotype control Antibody (50 μ g/mouse, clone: 2A3, Bio X Cell) をそれぞれ用いた。抗体投与 1 時間後、上述した方法と同様に、CARDS toxin を経鼻投与した。CARDS toxin 投与 1 日後において肺胞洗浄液を回収し、肺胞洗浄液中における免疫細胞数はフローサイトメーターを用いて評価した。

統計解析

統計解析には Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。グラフは平均値と標準偏差 (SD) で、二群比較検定は Student's *t*-test、コントロールと多重比較検定は Dunnett's test、全群間多重比較検定は Tukey's test を用い、有意差検定を行った。統計学的有意差は、 $P < 0.05$ の場合を有意であるとした。

【実験結果】

Mp 感染早期における炎症評価

Mp 感染時における病態形成メカニズムの解明を目指し、感染早期の肺における炎症に着目した。まず、マウスに Mp を経鼻投与し、1、3、5 日後における肺胞洗浄液中の菌量を real-time PCR で測定した。その結果、肺胞洗浄液中の菌量は、感染 1 日後において高値を示し、感染 5 日後まで検出が可能であった (Fig. 1a)。また肺胞洗浄液中の細胞・組織傷害マーカーである LDH は、感染 1、3、5 日後、いずれのタイミングにおいても、PBS 投与群と比較して高値を示した (Fig. 1b)。次に、H&E 染色を用いて、組織病理学的な評価を行ったところ、感染 1 日後の肺組織において、PBS 投与群と比較し、好中球の浸潤が著しく増加していることが観察された (Fig. 1c)。さらに、感染 1 日後における肺胞洗浄液中の細胞を、免疫細胞 (CD45⁺)、好中球 (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻)、肺胞マクロファージ (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) に分け、それぞれの細胞数をフローサイトメーターにより評価した (Fig. 1d)。H&E 染色の結果と同様、Mp 感染群で免疫細胞の増加、特に好中球の浸潤が顕著に認められた一方で、肺胞マクロファージ数には変化がなかった (Fig. 1e)。

次に、感染 1 日後に肺胞洗浄液中の 7 種類の炎症性サイトカイン量 (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-23、TNF α) を評価したところ、PBS 投与群と比較し、Mp 感染群において、IL-1 α 、IL-6 および IL-12 p40 の有意な上昇が観察された (Fig. 2a)。一方、PBS 投与群および Mp 感染群で IL-1 β および IL-12 p70 は検出できず、IL-23 および TNF α は両群間で変化が認められなかった (データ未記載)。また、肺胞洗浄液中における IL-1 α および IL-6 の mRNA 量を感染 1 時間後から 6 時間後まで経時的に評価したところ、感染 1 時間後から有意な上昇もしくは上昇傾向が認められ、時間が経過するにつれ、さらに上昇した (Fig. 2b)。さらに、Mp 感染 1 日後の肺胞洗浄液中において、好中球浸潤に重要なケモカインである CXCL1 および CXCL2 を評価したところ、PBS 投与群と比較し、Mp 感染群で共に有意な増加が認められた (Fig. 2c)。また、好中球浸潤の指標として、感染 1 日後の肺胞洗浄液中において、MMP-9 量を評価したところ、PBS 投与群と比較し、Mp 感染群で有意な増加が観察された (Fig. 2d)。以上の結果より、Mp 感染 1 日後から顕著な好中球浸潤、肺の炎症および組織傷害が観察され、感染 3、5 日後においても組織傷害が認められることが判明した。

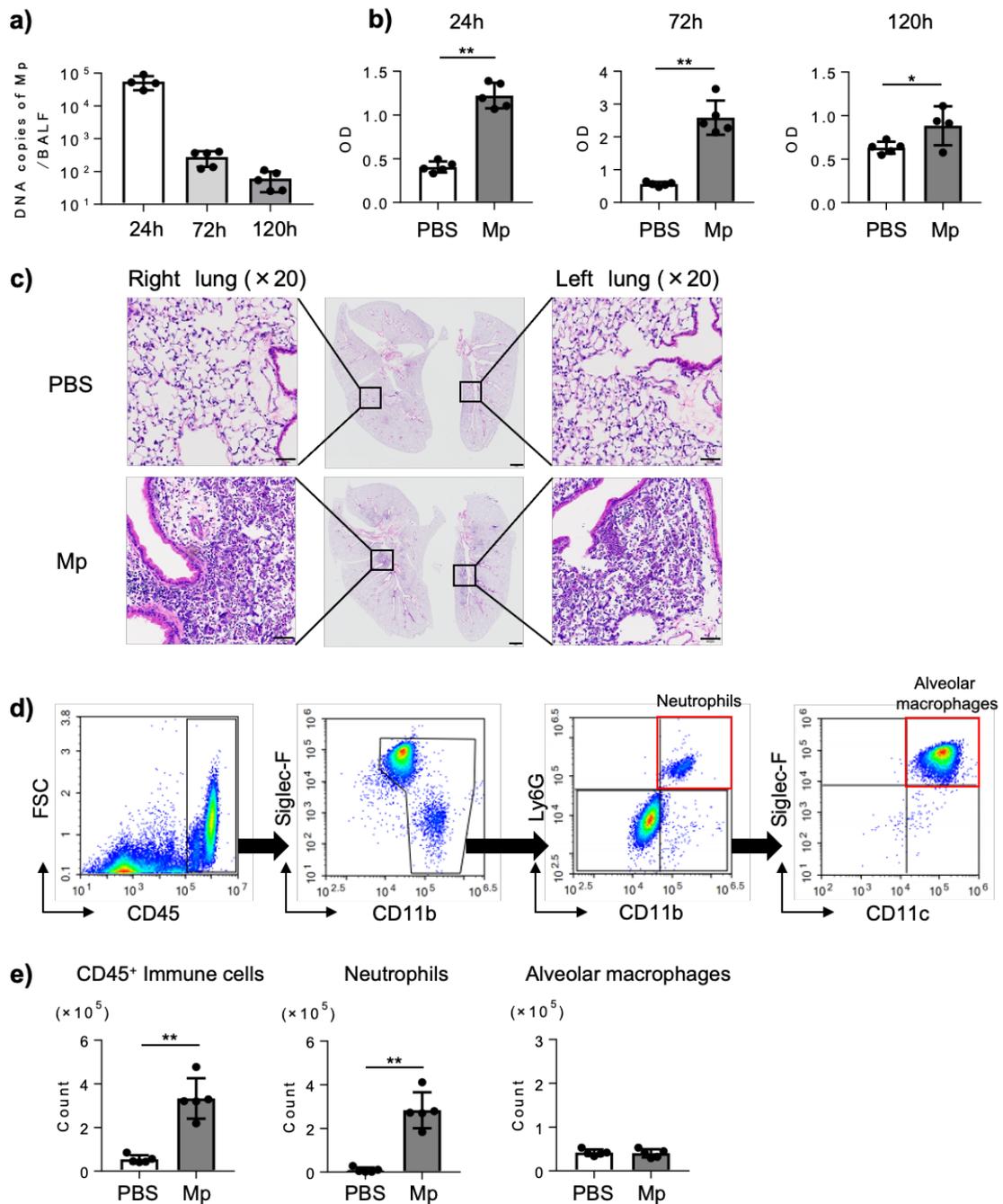


Figure 1. Lung injury by Mp infection accompanied with neutrophil infiltration. BALB/c mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). (a, b) On 24h, 72h and 120h after Mp infection, BALF samples were collected. DNA copies of Mp were measured by real-time PCR (a) and the lung injury was evaluated by LDH assay (b). (c) H&E staining of the lungs at 24h after Mp infection. (d) Gating strategy for analysis of BALF cells by flow cytometry. (e) Flow cytometric analysis of BALF cells harvested 24h after Mp infection. The numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) were analyzed. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) 24h: $n = 4$, 72h: $n = 5$, 120h: $n = 5$; (b) PBS: $n = 5$, Mp: $n = 4$ -5; (e) PBS: $n = 5$, Mp: $n = 5$. Student's *t*-test (b, e) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Middle panel: Scale bars 1mm, Left panel and Right panel: Scale bars 50 μ m (c).

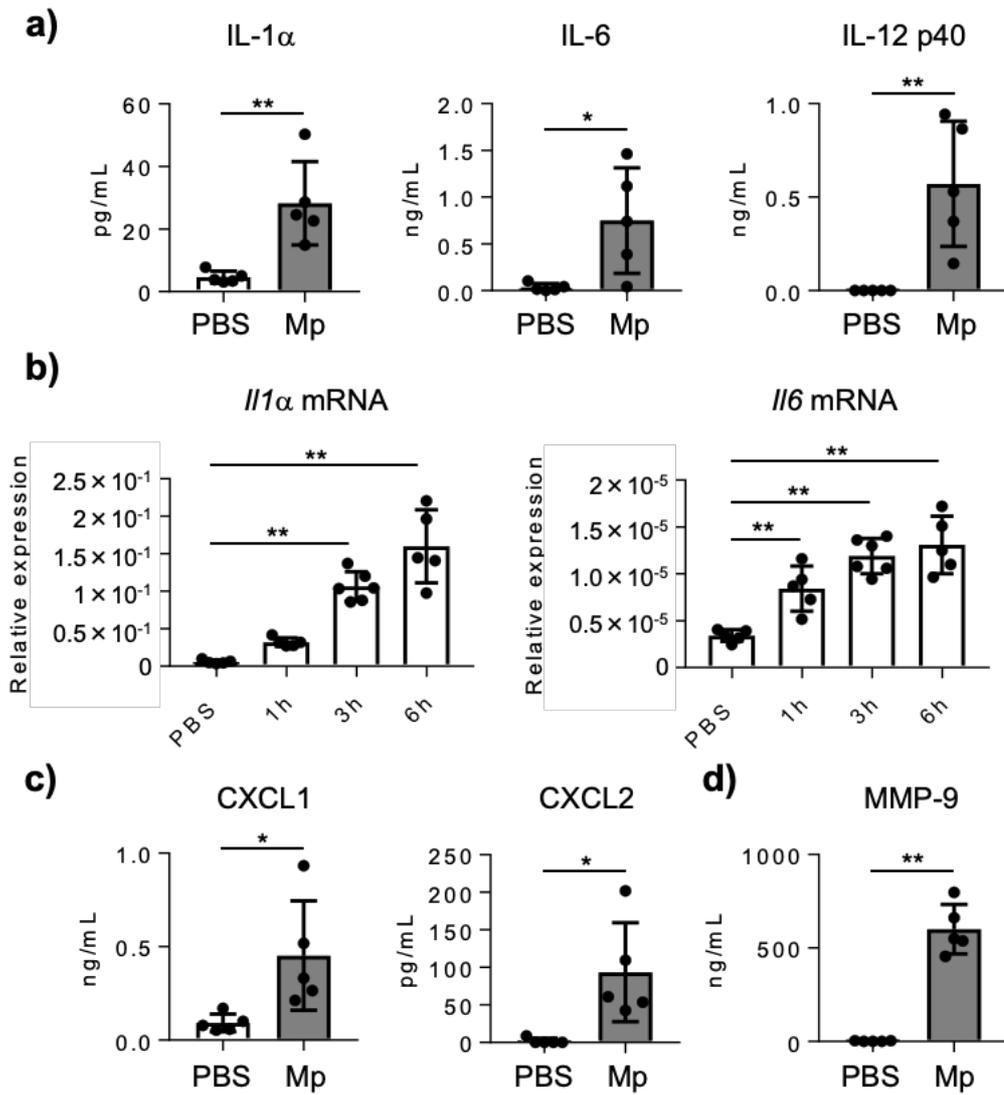


Figure 2. The cytokine response of Mp-mediated lung inflammation. BALB/c mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). (a) The levels of IL-1 α , IL-6 and IL-12 p40 in BALF harvested 24h after Mp infection were measured by ELISA. (b) Time course measuring of *Il1 α* and *Il6* mRNA expression normalized to *GAPDH* in BALF at indicated time point after Mp infection. (c, d) The levels of CXCL1 and CXCL2 (c) and MMP-9 (d) in BALF harvested 24h after Mp infection were measured by ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) PBS: $n = 5$, Mp: $n = 5$; (b) PBS: $n = 5$, 1h: $n = 5$, 3h: $n = 6$, 6h: $n = 5$; (c) PBS: $n = 5$, Mp: $n = 5$; (d) PBS: $n = 5$, Mp: $n = 5$. Student's *t*-test (a, c, d) and Dunnett's test (b) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Mp 感染時の肺組織傷害における好中球の寄与

好中球は、Mp 感染後の肺組織傷害に寄与することが、マウス³⁴ やヒト^{27,28} における報告より示唆されている。そこで、本モデルにおいて認められた肺組織傷害が好中球に起因したものを明らかとするため、抗 Ly6G 抗体を用いて好中球を除去した後に Mp を感染させ、肺における炎症および組織傷害を評価した。なお、好中球除去率は、約 100 % であり、好中球除去に伴い、肺泡マクロファージ数に影響を与えないことを確認している（データ未記載）。その結果、感染 1 日後の肺泡洗浄液中における菌量は、抗 Ly6G 抗体群とアイソタイプ抗体投与群間に有意な差が認められなかった（Fig. 3a）。一方で、感染 1 日後および 3 日後における肺泡洗浄液中の LDH は、アイソタイプ抗体投与群と比較し、抗 Ly6G 抗体群で有意に減少した（Fig. 3b）。また、肺泡洗浄液中における炎症性サイトカイン量は、好中球の有無に関わらず、変化が認められなかった（Fig. 3c）。さらに、肺泡洗浄液中における MMP-9 量は、アイソタイプ抗体投与群と比較し、抗 Ly6G 抗体群において有意に減少した（Fig. 3d）。以上の結果より、感染早期に浸潤する好中球が肺組織傷害の主体であること、さらに菌の排除には寄与しないことが明らかとなり、好中球浸潤の抑制が Mp 感染時における肺炎悪化の予防に繋がることが示された。

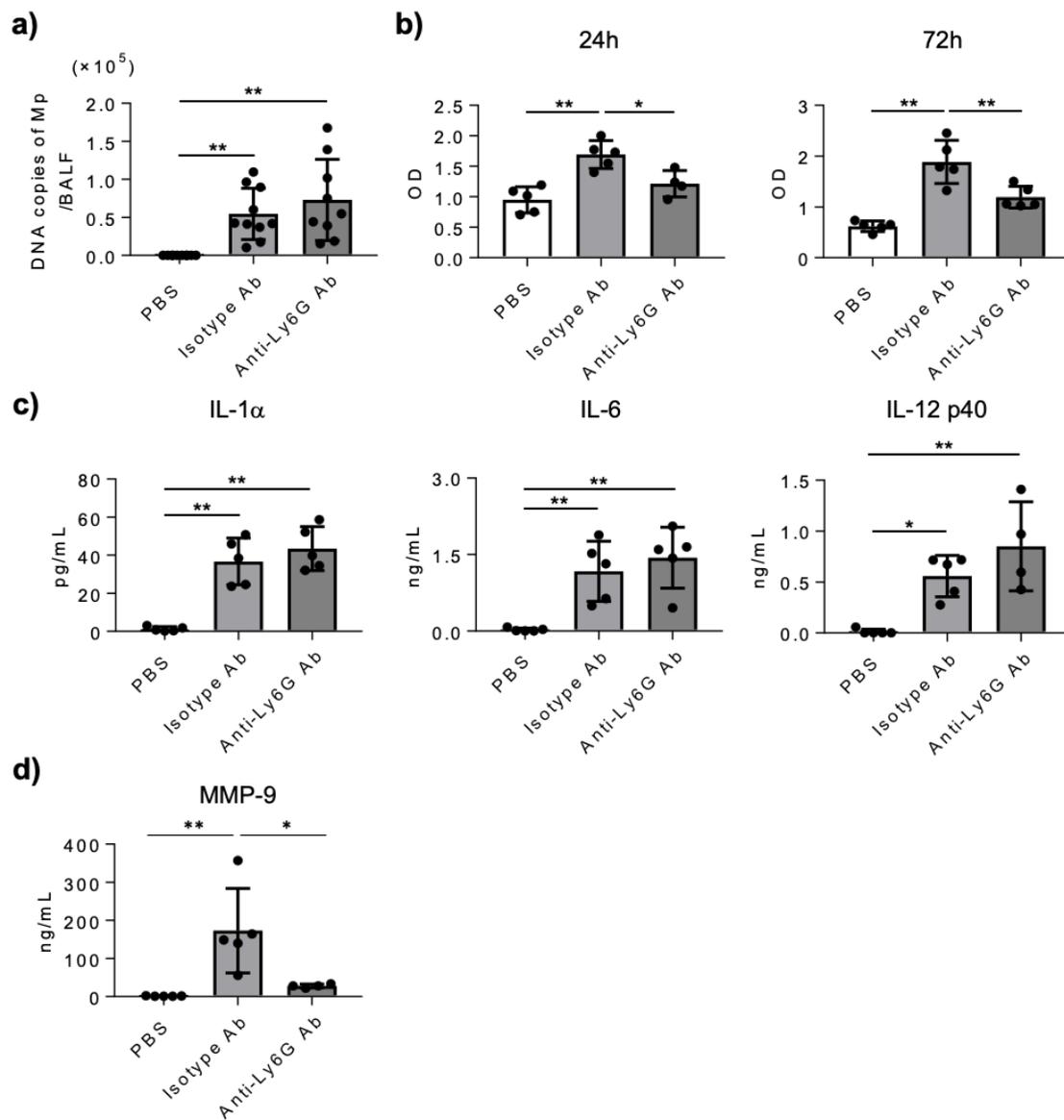


Figure 3. The role of neutrophils in Mp-mediated lung injury. Mice were injected intraperitoneally with an anti-Ly6G antibody (Ab) (100 μ g/mouse) to deplete neutrophils, and infected with Mp (6.0×10^7 CFU) at 24h after Ab injection. (a) DNA copies of Mp in BALF were evaluated by real-time PCR 24h after Mp infection. (b) On 24h and 72h after Mp infection, the lung injury was evaluated by LDH assay. (c, d) On 24h after Mp infection, the levels of IL-1 α , IL-6 and IL-12 p40 (c) and MMP-9 (d) in BALF were evaluated by ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) PBS: $n = 10$, isotype Ab: $n = 10$, anti-Ly6G Ab: $n = 9$; (b) PBS: $n = 5$, isotype Ab: $n = 5$, anti-Ly6G Ab: $n = 4-5$; (c) PBS: $n = 5$, isotype Ab: $n = 5$, anti-Ly6G Ab: $n = 4-5$; (d) PBS: $n = 5$, isotype Ab: $n = 5$, anti-Ly6G Ab: $n = 4$. Tukey's test (a-d) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Mp 感染時における好中球浸潤時期の評価

次に、抑制すべき標的である好中球が、感染後どの時期において浸潤するのかを明確にするために、より感染早期である、感染 1、3、6、9 時間後における肺胞洗浄液中の免疫細胞数をフローサイトメーターで評価した。その結果、好中球は、感染 6 時間後より浸潤し、時間の経過と共に、さらなる浸潤が認められた (Fig. 4a)。一方、肺胞マクロファージ数は、感染 3 時間後において有意な減少が観察された (Fig. 4a)。そこで、Mp 感染 3 時間後における肺胞マクロファージの減少に着目し、肺胞マクロファージの死細胞画分を解析したところ、PBS 投与群と比較して、Mp 感染群において肺胞マクロファージの細胞死が有意に増加していた (Fig. 4b)。また、IL-1 α および IL-6 量は感染 3 時間後から上昇し始め、感染 6 時間後において有意な上昇が観察される一方で、IL-12 p40 量は感染 9 時間後から有意に増加した (Fig. 4c)。さらに、CXCL1 および CXCL2 は共に、感染 3 時間後から有意に増加した (Fig. 4d)。以上の結果より、好中球は感染後早期から浸潤し、感染 1 日後における肺組織傷害に寄与することが示された。また Mp 感染 3 時間後の肺胞マクロファージの細胞死は、3 時間以降の免疫応答に寄与する可能性が示された。

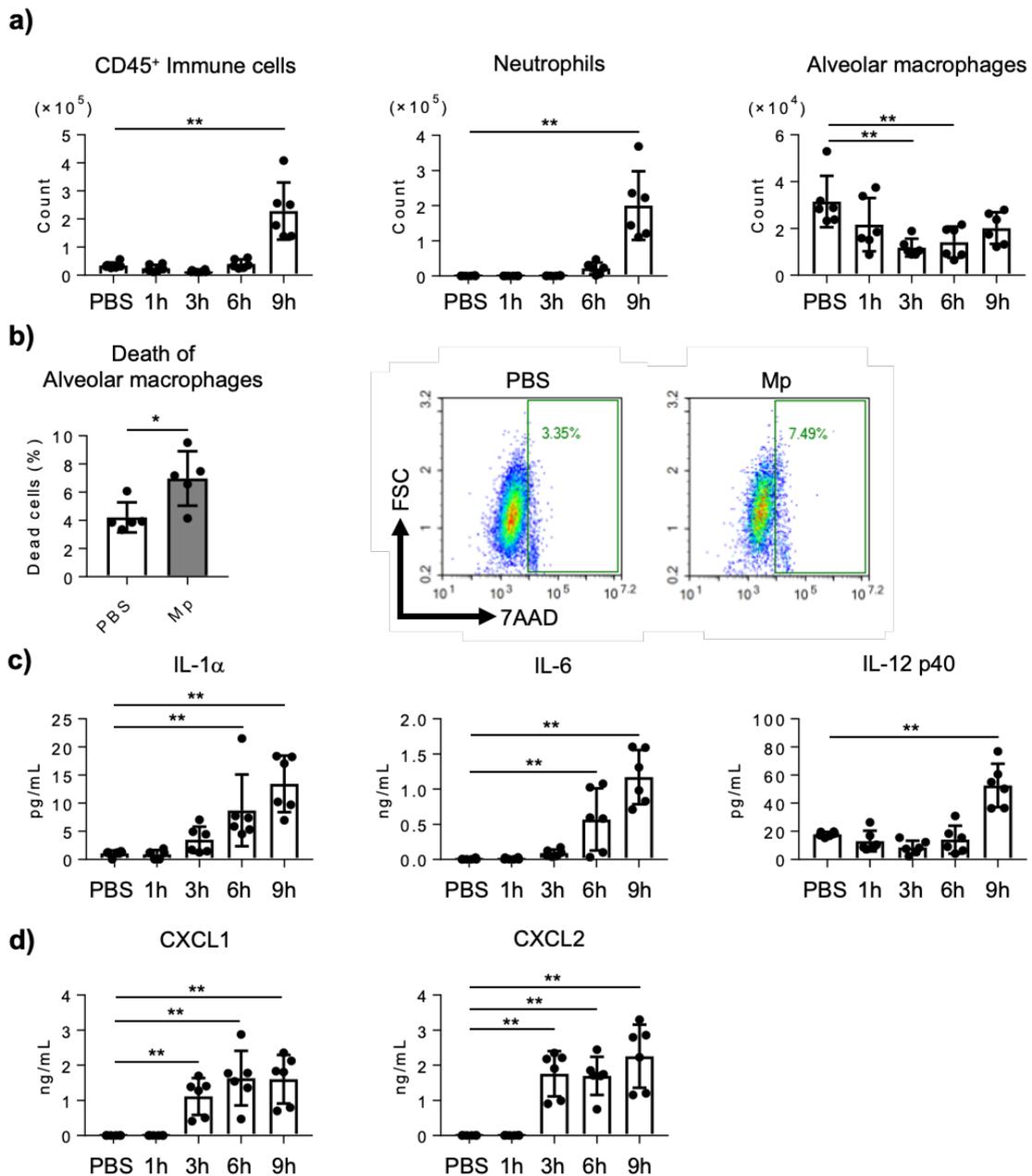


Figure 4. Characterizing airway cellular infiltrate shortly after Mp infection. BALB/c mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). (a) On 1h, 3h, 6h and 9h after Mp infection, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were evaluated by flow cytometry. (b) On 3h after Mp infection, viability of alveolar macrophages in BALF were analyzed by flow cytometry. (c, d) On 1h, 3h, 6h and 9h after Mp infection, the levels of IL-1 α , IL-6 and IL-12 p40 (c) and CXCL1 and CXCL2 (d) in BALF were evaluated by ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) PBS: $n = 6$, 1h: $n = 6$, 3h: $n = 6$, 6h: $n = 6$, 9h: $n = 6$; (b) PBS: $n = 5$, Mp: $n = 5$; (c) PBS: $n = 6$, 1h: $n = 6$, 3h: $n = 6$, 6h: $n = 6$, 9h: $n = 6$; (d) PBS: $n = 6$, 1h: $n = 6$, 3h: $n = 6$, 6h: $n = 6$, 9h: $n = 6$. Student's *t*-test (b) and Dunnett's test (a, c, d) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Mp 感染時の好中球浸潤における TLR2 シグナルの寄与

次に、Mp 感染時における TLR2 シグナルの及ぼす影響を確認するために、TLR2 欠損マウスに Mp を感染させ、肺における炎症および組織傷害を評価した。まず、Mp 感染 1 日後における肺胞洗浄液中の菌量を評価したところ、*TLR2*^{+/-} マウスと比較し、*TLR2*^{-/-} マウスにおいて有意な増加が観察された (Fig. 5a)。次に、肺胞洗浄液中の LDH を評価したところ、Mp 感染 1 日後においては、PBS 投与群と比較して、両マウス共に有意な増加が観察されたが、*TLR2*^{+/-} マウスと *TLR2*^{-/-} マウスの Mp 感染群間には差は認められなかった (Fig. 5b)。一方、Mp 感染 3 日後においては、*TLR2*^{+/-} マウスと比較し、*TLR2*^{-/-} マウスにおいて有意な LDH の減少が観察された (Fig. 5b)。次に、肺胞洗浄液中の免疫細胞数を評価したところ、感染 1 日後および 3 日後において、*TLR2*^{-/-} マウスの肺胞洗浄液中における免疫細胞数および好中球数は、*TLR2*^{+/-} マウスと比較して有意に減少していたことから、TLR2 シグナルが好中球浸潤に重要であることが確認された (Fig. 5c, d)。次に、TLR2 シグナルが炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を評価した。その結果、肺胞洗浄液中における IL-1 α 、IL-6、IL-12 p40、いずれのサイトカインにおいても、*TLR2*^{+/-} マウスと比較し、*TLR2*^{-/-} マウスで有意に減少していた (Fig. 5e)。また、CXCL1 および CXCL2 も、*TLR2*^{+/-} マウスと比較して、*TLR2*^{-/-} マウスにおいて有意な減少が認められた (Fig. 5f)。以上の結果より、TLR2 シグナルは、Mp 感染時において、菌の排除に寄与する反面、菌の排除に寄与しない好中球浸潤を過度に促進することに伴い、肺組織傷害を引き起こす可能性が示された。

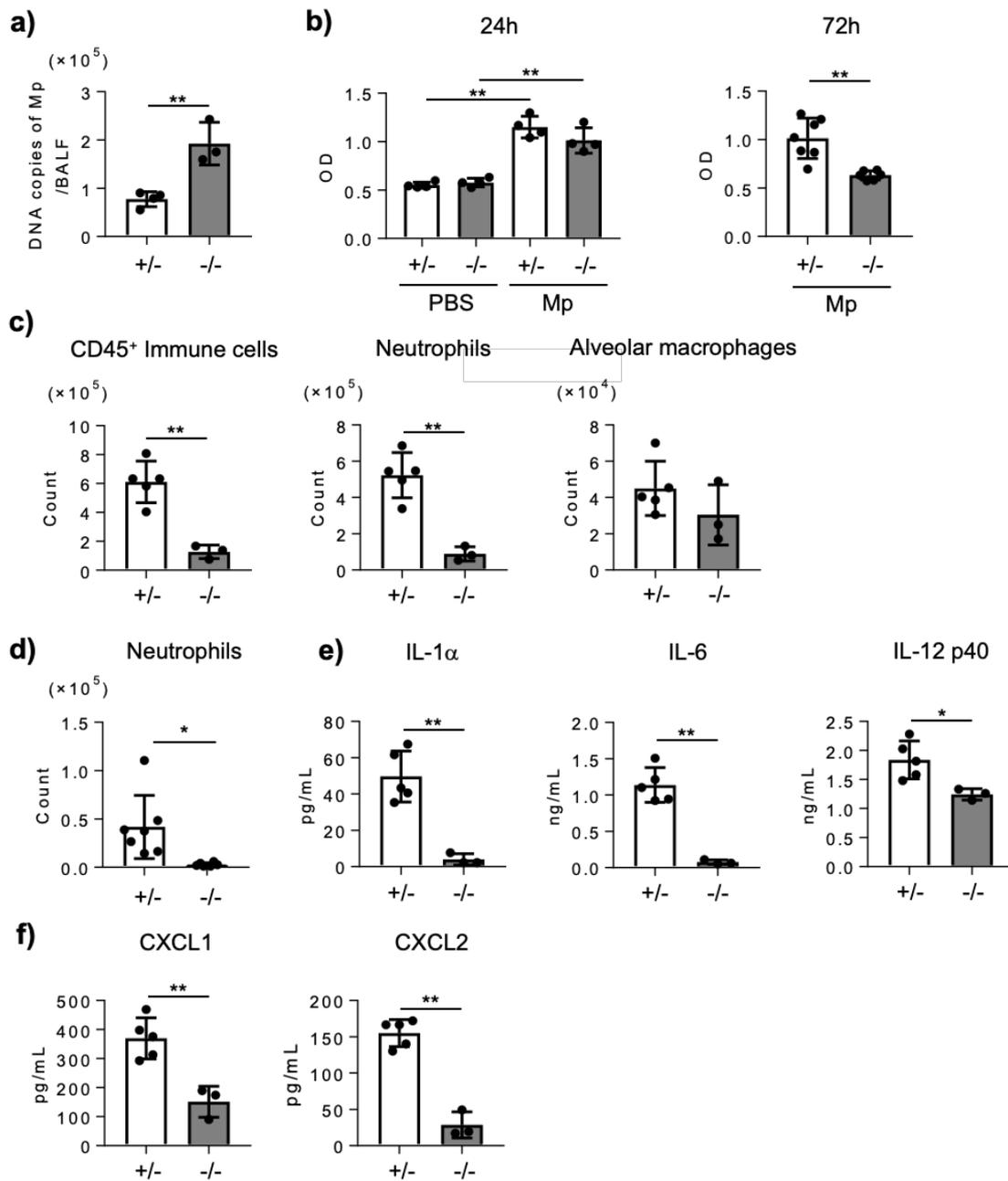


Figure 5. The role of TLR2 in Mp-mediated lung inflammation. Control TLR2^{+/-} (+/-) and TLR2^{-/-} (-/-) mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). (a) On 24h after Mp infection, DNA copies of Mp in BALF were evaluated by real-time PCR. (b) On 24h and 72h after Mp infection, the lung injury in BALF were evaluated by LDH assay. (c) On 24h after Mp infection, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were evaluated by flow cytometry. (d) On 72h after Mp infection, the numbers of neutrophils in BALF were evaluated by flow cytometry. (e, f) On 24h after Mp infection, the levels of IL-1 α , IL-6 and IL-12 p40 (e) and CXCL1 and CXCL2 (f) in BALF were evaluated by ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) +/-: n = 4, -/-: n = 3; (b) +/-: n = 4-7, -/-: n = 4-6; (c) +/-: n = 5, -/-: n = 3; (d) +/-: n = 7, -/-: n = 6; (e) +/-: n = 5, -/-: n = 3; (f) +/-: n = 5, -/-: n = 3. Student's *t*-test (a, b: right panel, c-f) and Tukey's test (b: left panel) were used for statistics analysis. **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

Mp 感染時における好中球浸潤に寄与する因子の探索

次に、*TLR2*^{-/-} マウスにおいて好中球浸潤の減少が認められたこと、さらにその肺胞洗浄液中において、好中球浸潤に重要なケモカインを制御することが報告されている IL-1 α および IL-12 p40 が減少していたことから、IL-1 α および IL-12 p40 に着目し、Mp 感染後のより詳細な好中球浸潤メカニズムの解明を図った。マウスに抗 IL-1 α 抗体もしくは抗 IL-12 p40 抗体を Mp 感染 1 時間前に経鼻投与した後、Mp を感染させ、感染 1 日後における菌量、組織傷害および好中球浸潤を評価した。その結果、肺胞洗浄液中の菌量は、抗 IL-1 α 抗体や抗 IL-12 p40 抗体投与による変化が認められなかった (Fig. 6a)。さらに、抗 IL-1 α 抗体または抗 IL-12 p40 抗体単独投与群の肺胞洗浄液における LDH、好中球数および肺胞マクロファージ数は、各アイソタイプ抗体投与群と差は認められなかった (Fig. 6b, c)。一方で、抗 IL-1 α 抗体と抗 IL-12 p40 抗体を共投与した場合、アイソタイプ抗体投与群と比較して、肺胞洗浄液中の LDH および好中球数の有意な減少が認められた (Fig. 6b, c)。また肺胞マクロファージ数は、抗 IL-1 α 抗体と抗 IL-12 p40 抗体共投与による変化は認められなかった (Fig. 6c)。次に、マウスに抗 IL-1 α 抗体および抗 IL-12 p40 抗体を Mp 感染 1 時間前に経鼻投与した後、Mp を感染させ、感染 3 日後における好中球浸潤を評価した。感染 1 日後の結果と同様に、アイソタイプ抗体投与群と比較し、抗 IL-1 α 抗体および抗 IL-12 p40 抗体共投与群において、肺胞洗浄液中の好中球数の有意な減少が認められた (Fig. 6d)。一方、肺胞マクロファージ数には有意な差は認められなかった (Fig. 6d)。以上の結果より、IL-1 α および IL-12 p40 は単独では好中球浸潤に寄与しない一方で、共存在下において、好中球浸潤に寄与することが示された。さらに、IL-1 α および IL-12 p40 は、Mp 感染時における菌の排除には影響しないことも示された。

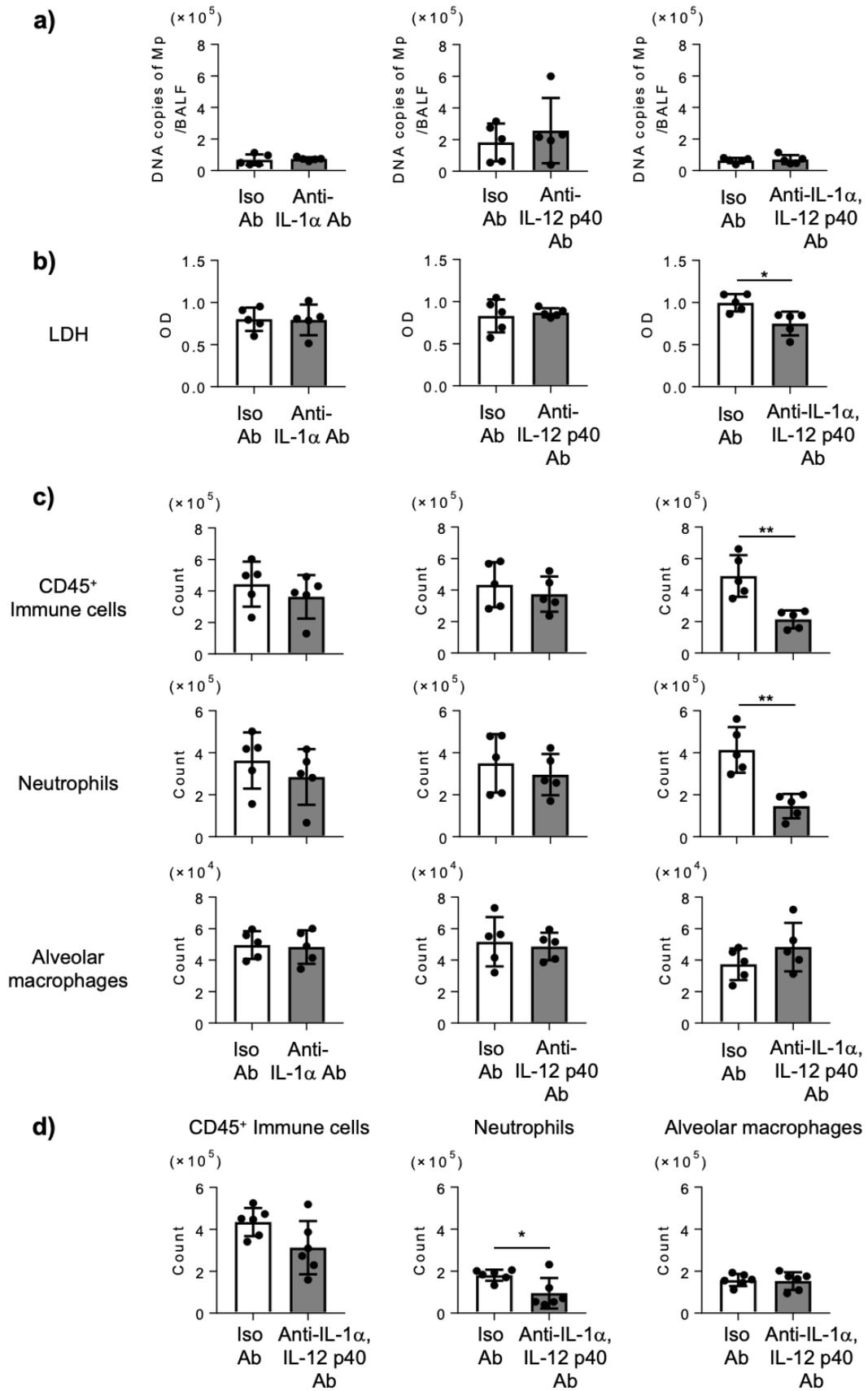


Figure 6. Effect of blocking IL-1 α and/or IL-12 p40 in Mp-mediated lung inflammation. BALB/c mice were treated intranasally with an anti-IL-1 α antibody (Ab) (20 μ g/mouse) and/or an anti-IL-12 p40 Ab (50 μ g/mouse) one hour before intranasal infection of Mp (6.0 \times 10⁷ CFU). (a) On 24h after Mp infection, DNA copies of Mp in BALF were evaluated by real-time PCR. (b) On 24h after Mp infection, the lung injury was evaluated by LDH assay. (c) On 24h after Mp infection, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were evaluated by flow cytometry. (d) On 72h after Mp infection, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils and alveolar macrophages in BALF were evaluated by flow cytometry. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) isotype Ab: *n* = 5, anti-IL-1 α Ab: *n* = 5, anti-IL-12 p40 Ab: *n* = 5, anti-IL-1 α and anti-IL-12 p40 Ab: *n* = 5; (b) isotype Ab: *n* = 5, anti-IL-1 α Ab: *n* = 5, anti-IL-12 p40 Ab: *n* = 5, anti-IL-1 α and anti-IL-12 p40 Ab: *n* = 5; (c) isotype Ab: *n* = 5, anti-IL-1 α Ab: *n* = 5, anti-IL-12 p40 Ab: *n* = 5, anti-IL-1 α and anti-IL-12 p40 Ab: *n* = 5; (d) isotype Ab: *n* = 6, anti-IL-1 α Ab: *n* = 6, anti-IL-12 p40 Ab: *n* = 6, anti-IL-1 α and anti-IL-12 p40 Ab: *n* = 6. Student's *t*-test (a-d) were used for statistics analysis. **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

肺胞マクロファージと炎症性サイトカインの関連性評価

次に、IL-1 α およびIL-12 p40の産生源を明らかとするために、Mpの排除の主体と考えられる肺胞マクロファージに着目し、それらサイトカインの産生メカニズムの解明を図った。まず、肺胞マクロファージと様々な菌量(1.0 \times 10⁸, 1.0 \times 10⁷, 1.0 \times 10⁶ CFU/well)のMpを共培養し、培養上清中のLDHおよびサイトカインを評価した。その結果、コントロール群と比べて、1.0 \times 10⁸ CFU群においてLDHの有意な上昇が観察されたことから、肺胞マクロファージの細胞死が誘導されていると推察された(Fig. 7a)。一方、1.0 \times 10⁶ CFU群および1.0 \times 10⁷ CFU群のLDHは、コントロール群と同程度であったことから、1.0 \times 10⁶ CFU群および1.0 \times 10⁷ CFU群においては、肺胞マクロファージの細胞死は誘導されていないと考えられた(Fig. 7a)。さらに、1.0 \times 10⁸ CFU群において、IL-1 α の顕著な上昇が観察された(Fig. 7b)。また、1.0 \times 10⁶ CFU群および1.0 \times 10⁷ CFU群では、IL-1 α の上昇が認められるだけでなく、IL-6やIL-12 p40の顕著な上昇も観察された(Fig. 7b)。

マクロファージは、異物を貪食した際に、Reactive oxygen species (ROS)を産生し、異物を排除する⁴⁵。一方で、ROSの過剰な産生は、細胞を損傷することで細胞死を誘導することが知られている⁴⁶⁻⁴⁹。そこで、Mp添加時における肺胞マクロファージの細胞死やサイトカイン産生にROSが寄与するのかを評価するため、ROS捕捉剤であるBHAを用いた。肺胞マクロファージと1.0 \times 10⁸ CFUのMpをBHA存在下で共培養した後、培養1日後における上清中のLDHを評価した。その結果、コントロール群と比べ、BHA共添加群において、有意なLDHの減少が認められた(Fig. 7c)。さらに、上清中のIL-1 α を評価すると、LDHの結果と相関し、BHA共添加群で有意な減少が観察された(Fig. 7d)。また、1.0 \times 10⁷ CFU群においても、培養1日後における上清中のIL-1 α 、IL-6およびIL-12 p40は、BHA共添加により、有意に減少した(Fig. 7e)。

Mp 感染による炎症性サイトカインの誘導は、Fig. 5e の結果より、TLR2 シグナルに起因することが明らかとなっている。しかし、サイトカイン誘導に寄与した ROS の産生が、TLR2 シグナル依存的であるかどうかについては不明である。そこで、肺胞マクロファージと TLR2 リガンドである Pam2CKS4 を BHA 存在下で培養した後、培養 1 日後における上清中の炎症性サイトカイン量を評価した。Pam2CKS4 により誘導された IL-1 α 、IL-6 および IL-12 p40 は、BHA 共添加により、有意な減少が認められた (Fig. 8)。以上の結果より、肺胞マクロファージが IL-1 α および IL-12 p40 の産生源であることが明らかとなった。また Mp 感染時において、TLR2 シグナル活性化による ROS の産生上昇に伴い、炎症性サイトカインが誘導されることが明らかとなった。さらに、ROS の産生が肺胞マクロファージの細胞死に一部寄与することが示唆された。

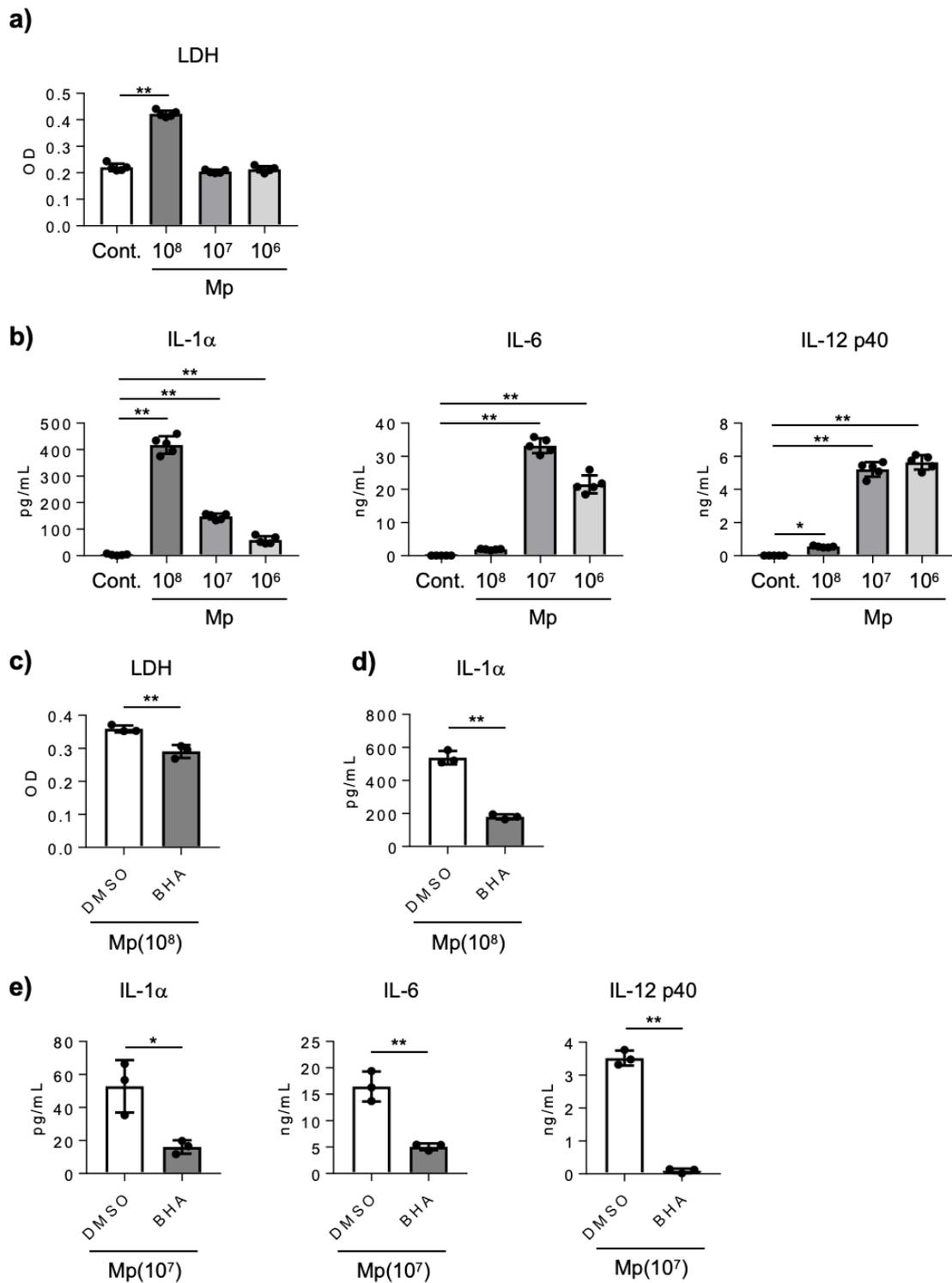


Figure 7. Mechanisms of IL-1 α and IL-12 p40 induction by Mp in alveolar macrophages. Alveolar macrophages (AM) were co-cultured with Mp (1.0×10^8 , 1.0×10^7 , or 1.0×10^6 CFU/well) at 37°C for 24h. (a) The cytotoxic effect of Mp were evaluated by LDH assay. (b) The levels of IL-1 α , IL-6 and IL-12 p40 in the culture supernatant of AM were measured by ELISA. (c-e) A ROS inhibitor BHA was added to the co-culture of AM and Mp (c, d; 1.0×10^8 CFU/well, e; 1.0×10^7 CFU/well). On 24h after incubation at 37°C, the cytotoxic effect of Mp on AM were evaluated by LDH assay (c) and the levels of cytokines in the supernatant were analyzed by ELISA (d, e). Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) Control: $n = 5$, 10⁸: $n = 5$, 10⁷: $n = 5$, 10⁶: $n = 5$; (b) Control: $n = 5$, 10⁸: $n = 5$, 10⁷: $n = 5$, 10⁶: $n = 5$; (c) DMSO: $n = 3$, BHA: $n = 3$; (d) DMSO: $n = 3$, BHA: $n = 3$; (e) DMSO: $n = 3$, BHA: $n = 3$. Student's *t*-test (c-e) and Dunnett's test (a, b) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

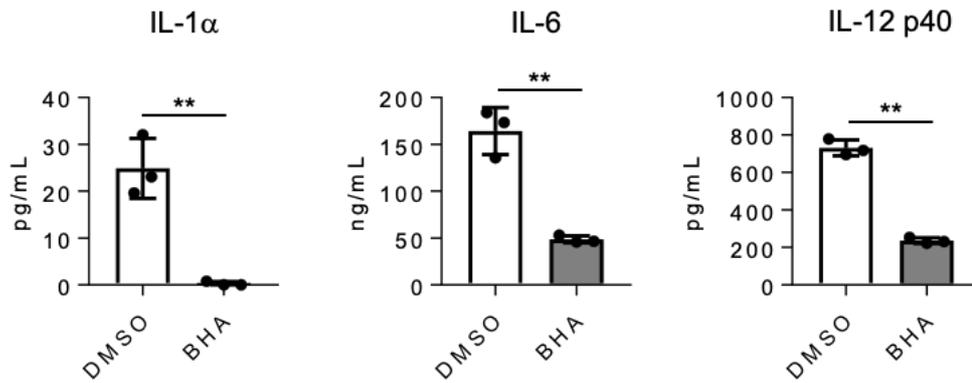


Figure 8. Role of ROS in TLR2-mediated induction of inflammatory cytokines. Cultured alveolar macrophages (AM) were treated with a TLR2 ligand Pam2CKS4, and BHA at 37°C. On 24h after incubation, the levels of IL-1α, IL-6 and IL-12 p40 in supernatant were analyzed with ELISA. Data are shown as means ± SD. Each experiment was performed twice. DMSO: $n = 3$, BHA: $n = 3$. Student's t -test were used for statistics analysis. $**P < 0.01$.

Mp 由来外毒素 CARDS toxin の Mp 感染時における寄与

次に、Mp 感染時における好中球浸潤に CARDS toxin が寄与するのかを明らかとするために、Mp と抗 CARDS toxin 抗体を共に経鼻投与し、感染 1 日後における肺胞洗浄液中の免疫細胞数をフローサイトメーターで評価した (Fig. 9a)。肺胞洗浄液中における免疫細胞数および好中球数は、アイソタイプ抗体投与群と比較し、抗 CARDS toxin 抗体投与群で減少傾向が認められた (Fig. 9b)。一方で、肺胞マクロファージ数は、アイソタイプ抗体投与群と抗 CARDS toxin 抗体投与群で差は認められなかった (Fig. 9b)。次に、感染 3 日後の好中球浸潤における CARDS toxin の寄与を明らかとするために、Mp と抗 CARDS toxin 抗体共投与 2 日後において、再度、同量の抗 CARDS toxin 抗体のみを経鼻投与し、感染 3 日後における肺胞洗浄液中の免疫細胞数をフローサイトメーターで評価した (Fig. 9a)。その結果、抗 CARDS toxin 抗体投与群における肺胞洗浄液中の免疫細胞数および好中球数は、アイソタイプ抗体投与群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 9c)。また、肺胞マクロファージ数は、アイソタイプ抗体投与群と抗 CARDS toxin 抗体投与群で差は認められなかった (Fig. 9c)。以上の結果より、CARDS toxin が、Mp 感染時における好中球浸潤に寄与することが示された。

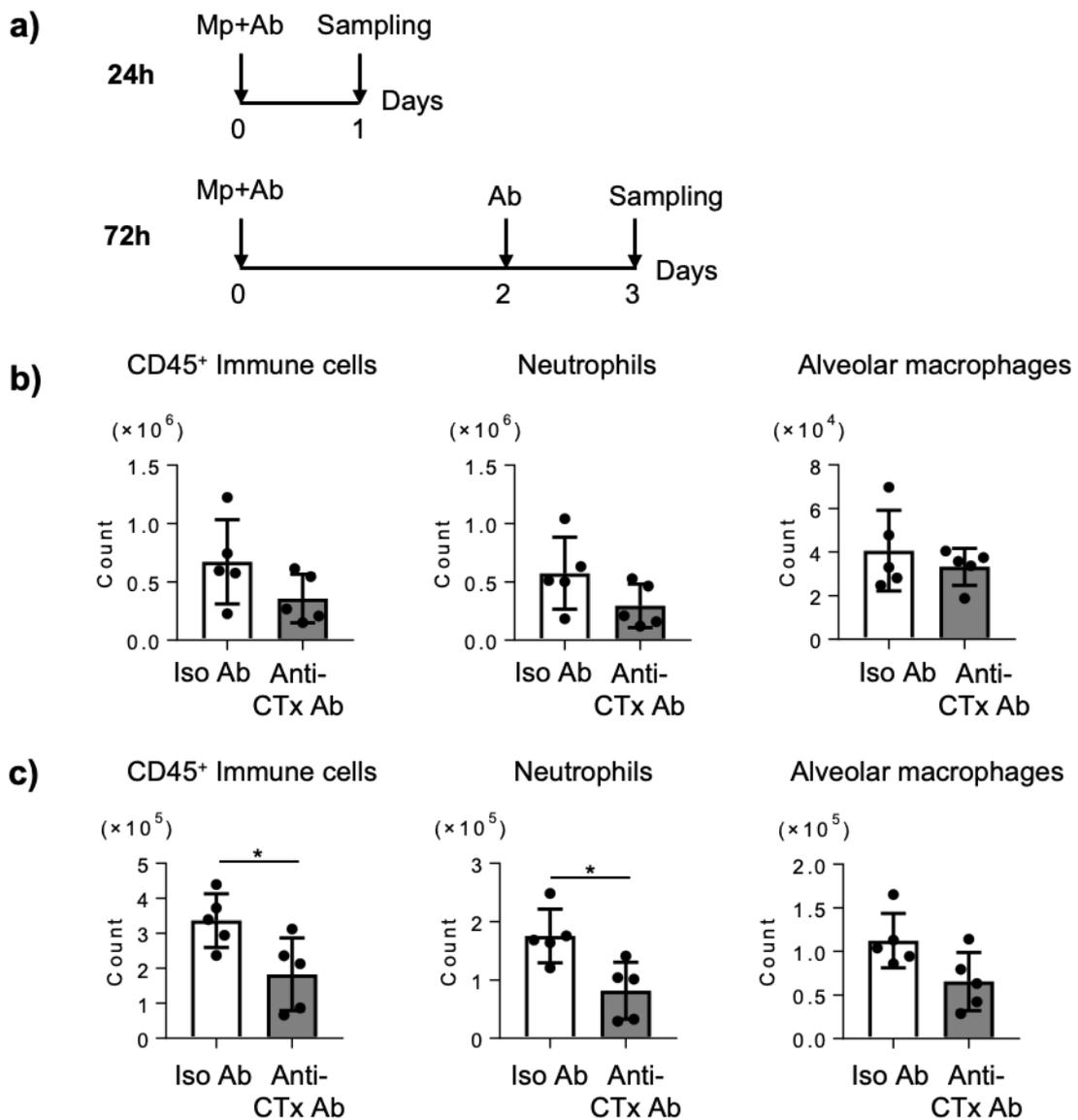


Figure 9. Involvement of CARDS toxin in Mp-mediated lung inflammation. (a) Scheme of the experiment. (b) BALB/c mice were treated intranasally with mixture of Mp (6.0×10^7 CFU) and anti-CARDS toxin antibody (CTx Ab) ($20 \mu\text{g}/\text{mouse}$). On 24h after the treatment, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were evaluated by flow cytometry. (c) BALB/c mice were treated intranasally with 6.0×10^7 CFU of Mp and anti-CTx Ab ($20 \mu\text{g}/\text{mouse}$) followed 48h by additional intranasal anti-CTx Ab ($20 \mu\text{g}/\text{mouse}$). On 72h after Mp infection, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils and alveolar macrophages in BALF were evaluated by flow cytometry. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (b) isotype Ab: $n = 5$, anti-CTx Ab: $n = 5$; (c) isotype Ab: $n = 5$, anti-CTx Ab: $n = 5$. Student's *t*-test were used for statistics analysis. * $P < 0.05$.

組換え CARDS toxin 蛋白質の活性評価

次に、CARDS toxin における好中球浸潤メカニズムを解明するために、組換え CARDS toxin 蛋白質を大腸菌で作製した。過去の報告より、組換え CARDS toxin 蛋白質は、気道上皮細胞に空胞を形成させること³⁹、またマクロファージからの IL-1 β 産生を誘導すること⁵⁰などが明らかとなっている。そこで、作製した組換え CARDS toxin 蛋白質が空胞化活性および IL-1 β 誘導能を有するのかが確認した。ヒト上皮細胞である A549 細胞に CARDS toxin を添加して培養後、顕微鏡を用いて、細胞に空胞が形成することを確認した (Fig. 10a)。また、予め PMA で刺激したヒト単球系細胞である THP-1 細胞に CARDS toxin を添加し、培養上清中の IL-1 β を評価したところ、CARDS toxin 添加群において、有意に上昇した (Fig. 10b)。さらに、カスパーゼ 1 阻害剤である Ac-YVAD-CHO を共添加しておくことで、CARDS toxin による IL-1 β の増加が抑制されたことから、組換え CARDS toxin 蛋白質が IL-1 β 誘導能を有することが示唆された (Fig. 10b)。以上の結果より、作製した組換え CARDS toxin 蛋白質が活性を有することが示された。

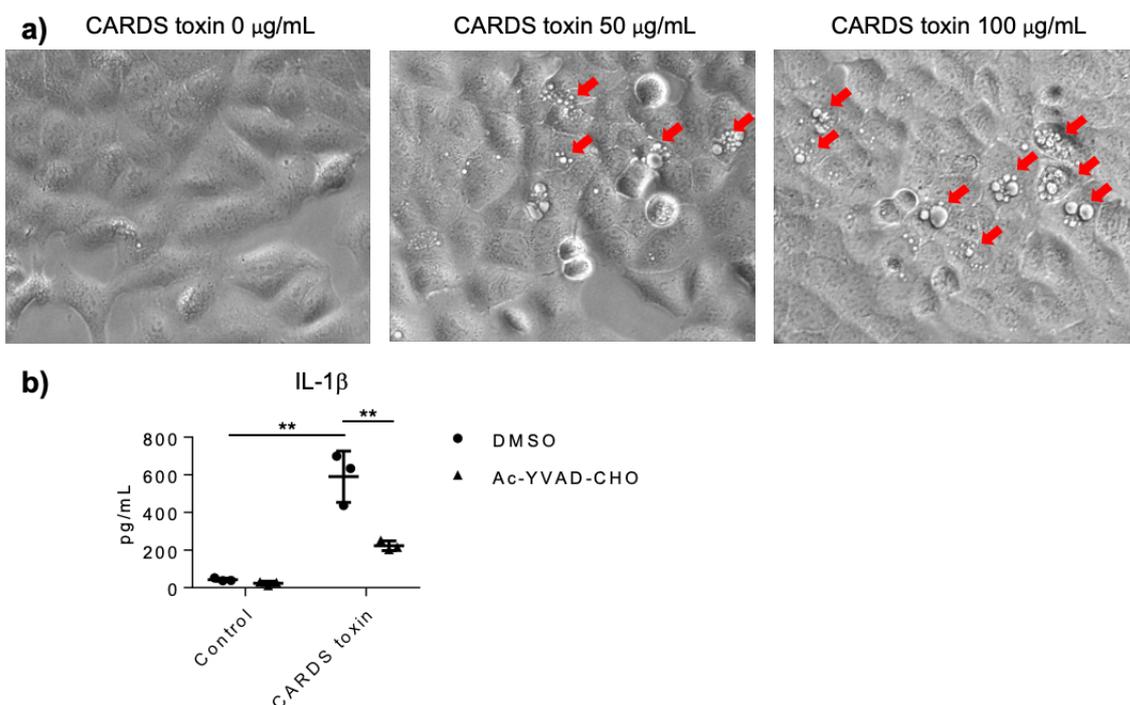


Figure 10. Validation of recombinant CARDS toxin. Recombinant CARDS toxin was generated by using *E.coli* BL21. (a) A549 cells were treated with recombinant CARDS toxin (0, 50, 100 μ g/mL) at 37°C. Vacuolization of A549 cells were evaluated by microscopy at 48h after CARDS toxin treatment. (b) PMA-differentiated THP-1 cells were incubated with a caspase inhibitor Ac-YVAD-CHO, and CARDS toxin (100 μ g/mL) at 37°C. On 24h after incubation, the levels of IL-1 β in supernatant were assessed using ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (b) Control (DMSO: $n = 3$, Ac-YVAD-CHO: $n = 3$), CARDS toxin (DMSO: $n = 3$, Ac-YVAD-CHO: $n = 3$). Tukey's test (b) were used for statistics analysis. ** $P < 0.01$.

組換え CARDS toxin 蛋白質投与による炎症評価

次に、作製した CARDS toxin をマウスに経鼻投与し、投与 1 日後の肺における炎症および組織傷害を評価した。その結果、投与 1 日後において、CARDS toxin 群における肺胞洗浄液中の LDH は、コントロール群と比較して有意な上昇が認められた (Fig. 11a)。また、肺胞洗浄液中の免疫細胞数および好中球数は、コントロール群と比較し、CARDS toxin 群において有意な増加が認められた一方で、肺胞マクロファージ数は、コントロール群と CARDS toxin 群間に差は認められなかった (Fig. 11b)。さらに、CARDS toxin 投与 12 時間後の肺胞洗浄液中における IL-1 α および IL-12 p40 量は、コントロール群と比較して有意な上昇が認められた (Fig. 11c)。また、CARDS toxin 投与 1 日後の肺胞洗浄液中において、CXCL1 はコントロール群と比べて有意に上昇するものの、CXCL2 は、コントロール群と同程度であった (Fig. 11d)。次に、CARDS toxin に起因した好中球浸潤が TLR2 シグナルに依存するのかを明らかにするために、TLR2^{-/-} マウスに CARDS toxin を経鼻投与し、投与 1 日後の肺胞洗浄液中における免疫細胞数を評価した。その結果、免疫細胞数、好中球数および肺胞マクロファージ数は、TLR2^{+/-} マウスと TLR2^{-/-} マウス間に差は認められなかった (Fig. 12)。以上の結果より、CARDS toxin は、TLR2 非依存的な好中球浸潤に伴う炎症の惹起に寄与していることが示唆された。

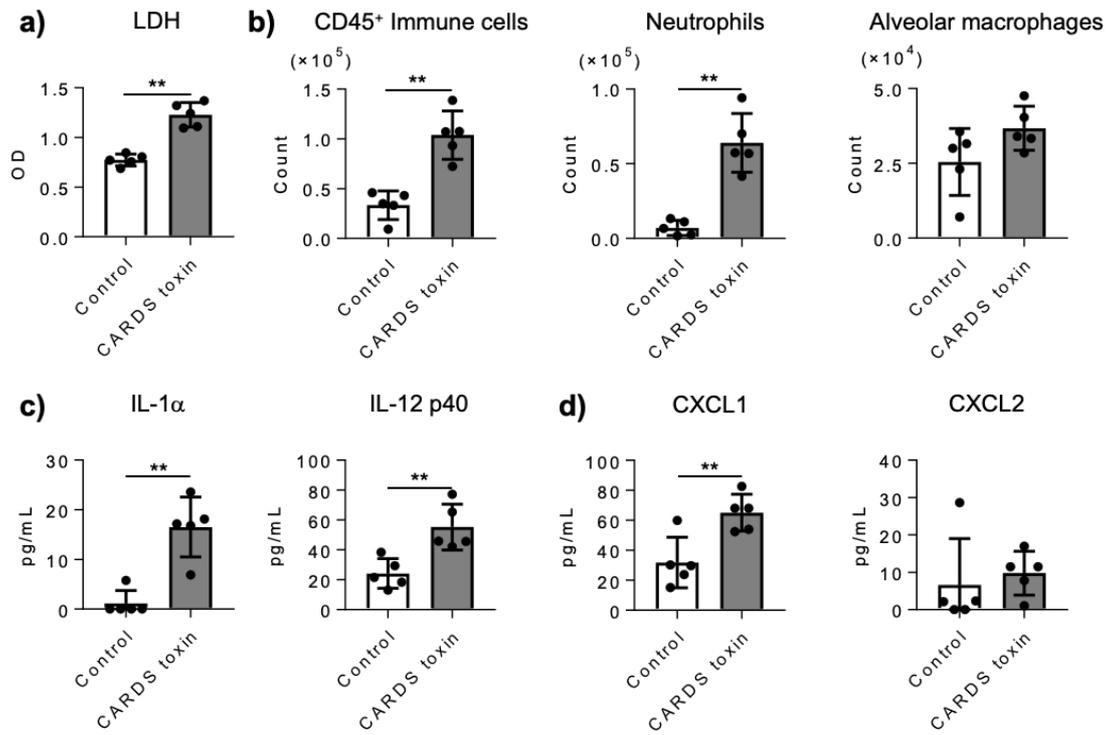


Figure 11. Characterizing CARDS toxin-mediated lung inflammation. BALB/c mice were treated intranasally with CARDS toxin (50 μ g/mouse). (a) BALF was harvested 24h after the treatment and LDH was measured for evaluation of lung injury. (b) On 24h after CARDS toxin treatment, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were evaluated by flow cytometry. (c) On 12h after CARDS toxin treatment, the levels of IL-1 α and IL-12 p40 were evaluated by ELISA. (d) On 24h after CARDS toxin treatment, the levels of CXCL1 and CXCL2 were evaluated by ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) Control: $n = 5$, CARDS toxin: $n = 5$; (b) Control: $n = 5$, CARDS toxin: $n = 5$; (c) Control: $n = 5$, CARDS toxin: $n = 5$; (d) Control: $n = 5$, CARDS toxin: $n = 5$. Student's t -test (a-d) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

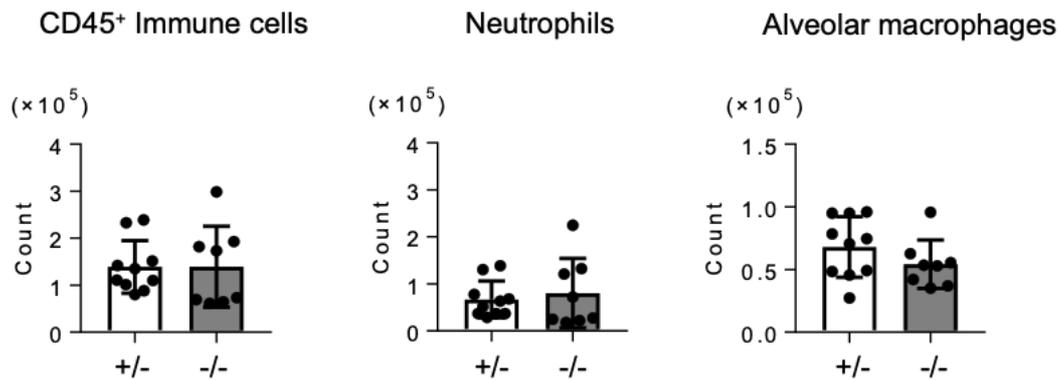


Figure 12. The role of TLR2 in neutrophil recruitment by CARDS toxin. Control TLR2^{+/+} (+/-) and TLR2^{-/-} (-/-) mice were treated intranasally with CARDS toxin (50 μ g/mouse). On 24h after CARDS toxin treatment, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were evaluated by flow cytometry. Each experiment was performed twice. +/-: $n = 10$, -/-: $n = 8$. Student's *t*-test were used for statistics analysis.

組換え CARDS toxin 蛋白質投与時の好中球浸潤に寄与する因子の探索

続いて、CARDS toxin 投与時における好中球浸潤メカニズムの解明を目的として、抗 IL-1 α 抗体または抗 IL-12 p40 抗体を CARDS toxin 投与 1 時間前に経鼻投与した後、CARDS toxin を経鼻投与し、CARDS toxin 投与 1 日後における肺胞洗浄液中の免疫細胞数を評価した。その結果、抗 IL-1 α 抗体投与群における免疫細胞数および好中球数は、アイソタイプ抗体投与群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 13)。一方、抗 IL-12 p40 抗体投与群における免疫細胞数および好中球数は、アイソタイプ抗体投与群と同程度であった (Fig. 13)。また、肺胞マクロファージ数は、抗 IL-1 α 抗体や抗 IL-12 p40 抗体投与による変化が認められなかった (Fig. 13)。以上より、CARDS toxin は、TLR2 非依存的に好中球浸潤を促進し、その浸潤の一部には、IL-1 α が寄与する可能性が示された。

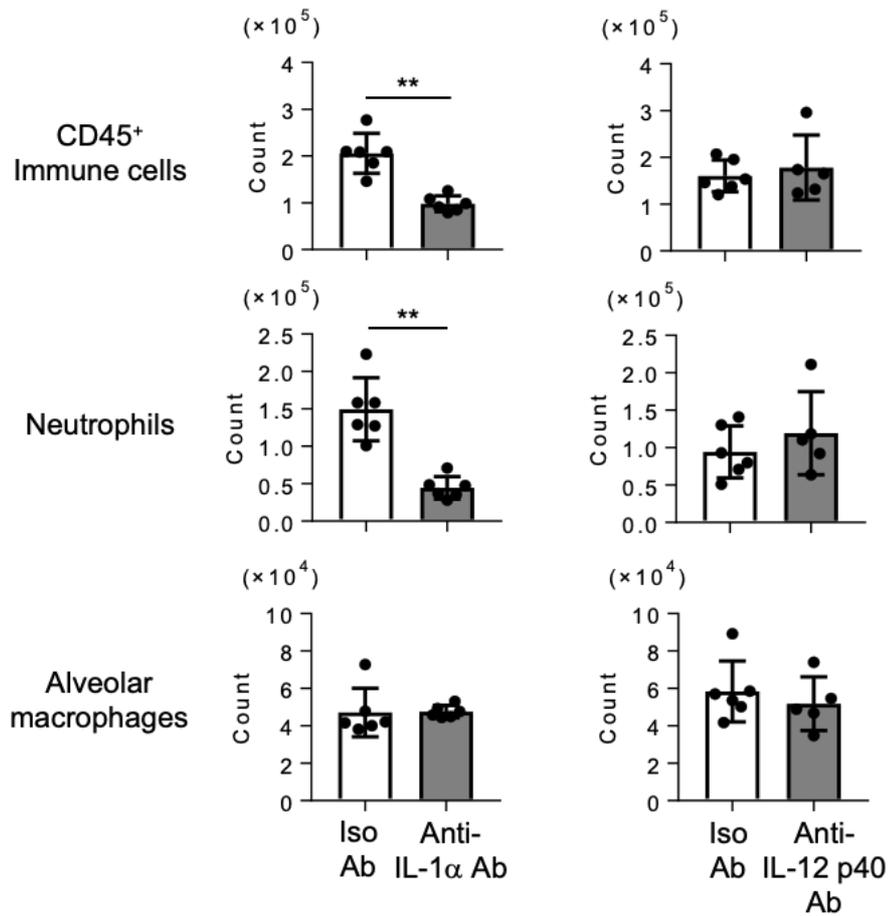


Figure 13. Role of IL-1 α in neutrophil infiltration induced by CARDS toxin. BALB/c mice were injected intranasally with an anti-IL-1 α antibody (Ab) (20 μ g/mouse) or an anti-IL-12 p40 Ab (50 μ g/mouse) followed 1h by intranasal CARDS toxin (50 μ g/mouse). On 24h after the CARDS toxin treatment, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were evaluated by flow cytometry. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. isotype Ab: $n = 6$, anti-IL-1 α Ab: $n = 6$, anti-IL-12 p40 Ab: $n = 5$. Student's t -test were used for statistics analysis. ** $P < 0.01$.

【考察】

Mp 感染時に最も観察される臨床所見は肺炎であるが、その病態形成に寄与する因子は未だ不明であった。本研究で使用した Mp 感染早期のマウスモデルにおける肺胞洗浄液を解析したところ、LDH の上昇 (Fig. 1b) および好中球浸潤 (Fig. 1e) が認められ、Mp 感染による肺の炎症および組織傷害が観察された。さらに、好中球を Mp 感染に先立って除去した場合に、Mp の排除はほとんど影響を受けない一方で (Fig. 3a)、肺組織傷害が抑制されることを明らかとした (Fig. 3b)。本結果は、好中球が Mp 感染防御に重要ではないことを報告した過去の報告と一致する^{36,37}。さらに、Mp 感染後に浸潤した好中球が、ヒトの肺組織の傷害を引き起こす可能性が示されていることから^{27,28}、好中球は Mp 感染早期において、治療により抑制すべき標的であることが推察された。本モデルにおける好中球は TLR2 を介したシグナルにより誘導される一方で (Fig. 5c, d)、TLR2 のシグナルは Mp の排除にも重要であることが示された (Fig. 5a)。すなわち、Mp 感染時における肺炎の抑制を目的として TLR2 シグナルを抑制することは、菌量の増加を誘発してしまう問題が考えられた。そこで、TLR2 の下流のシグナルを追及した結果、興味深いことに、TLR2 依存的に誘導される IL-1 α と IL-12 p40 はそれぞれ単独では好中球浸潤に寄与しないものの、共存することで好中球浸潤に寄与することが明らかとなった (Fig. 6c)。さらに、重要な点として、これらサイトカインが Mp の排除には影響を与えないことも明らかとした (Fig. 6a)。以上の結果より、IL-1 α と IL-12 p40 の両方を標的とした治療戦略が Mp 肺炎をコントロールする上で有効である可能性が考えられた。

IL-1 α および IL-12 p40 の産生は、Mp 添加時において誘導される ROS に依存して肺胞マクロファージから産生される経路が重要である可能性が示された (Fig. 7e)。一方、Mp は、宿主内において生存のためにグリセロールを取り込み、その代謝の過程で活性酸素を放出することが知られており、それら活性酸素は、宿主細胞を傷害することが報告されている⁵¹。そのため、BHA により捕捉した ROS が肺胞マクロファージに由来するのか、Mp に由来するのかは詳細な検討を行っていないので未だ不明である。しかし、Mp 感染による炎症性サイトカインの誘導が TLR2 欠損マウスにおいて減少したこと (Fig. 5e)、TLR2 リガンド添加時における肺胞マクロファージからの炎症性サイトカインの誘導が BHA 共存により減少したこと (Fig. 8) を鑑みると、Mp の保有する TLR2 リガンドに依存した ROS 産生が主であると考えられる。また、ROS 産生には、MyD88⁵² や ASK1⁵³ の関与が報告されており、そのため、TLR2 シグナルによる ROS 産生に MyD88 や ASK1 が寄与する可能性が考えられる。一方で、TLR2^{-/-} マウスにおける肺胞洗浄液中の IL-1 α は、ほぼ全て減少したにも関わらず、IL-12 p40 の減少はわずかだったことから、IL-12 p40 に関しては TLR2 非依存的な経路の存在が示唆される (Fig. 5e)。過去の *in vitro* の研究において、マクロファージと Mp を共培養した際の炎症反応は、TLR2 シグナルのみならず、TLR4 シグナルも寄

与することが報告されており、Mp 感染時において寄与する可能性は十分にあり得る³⁸。本検討では、肺胞マクロファージが IL-12 p40 の産生源であることを示したが、マウス肺内には、樹状細胞など、IL-12 p40 の産生源になり得る細胞が存在するため、今後より詳細に IL-12 p40 の産生細胞および誘導メカニズムを解明する必要がある。これらの解明は、TLR2 非依存的な炎症惹起メカニズムの解明に繋がると考えられる。

肺胞マクロファージは、恒常的に IL-1 α を細胞内に蓄積し、細胞死に伴い、IL-1 α を細胞外に放出することで、炎症を惹起することが知られており⁵⁴⁻⁵⁶、Mp 感染後に上昇した IL-1 α の一部は、肺胞マクロファージの細胞死に由来する可能性が示された (Fig. 4b, c, Fig. 7a, b)。また *in vitro* の検討において、細胞死を誘導しない条件下においても、培養上清中の IL-1 α が上昇したこと (Fig. 7a, b)、Mp 感染後、経時的に IL-1 α の mRNA が上昇すること (Fig. 2b) を鑑みると、IL-1 α は、肺胞マクロファージの細胞死による放出だけでなく、誘導的にも産生されることが考えられる。本検討より、肺胞マクロファージが IL-1 α の主たる産生源であると考えられるが、Mp 感染時において上昇した IL-1 α が肺胞マクロファージ由来であるかについては不明である。IL-1 α は、気道上皮細胞にも蓄積することが知られていることから⁵⁷、産生源となり得る可能性があるため、今後より詳細な検討を行う必要がある。

一方で、IL-1 α および IL-12 p40 がどの細胞に作用し、どのような因子を介して好中球の浸潤を誘導するのか、なぜ片方が欠如すると好中球浸潤を抑制できないのかなど、明らかとすべき課題は多く残されている。また本検討において、*TLR2*^{-/-} マウスにおける肺胞洗浄液中の好中球数が減少していた際に (Fig. 5c)、CXCL1 および CXCL2 が減少していたことから (Fig. 5f)、IL-1 α および IL-12 p40 が肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージもしくは他の細胞を刺激することにより、ケモカインを誘導し、好中球の浸潤を促進していると考えている。過去に、*Aspergillus fumigatus* の感染時において、IL-1 α がケモカインを介して、肺内における好中球の浸潤に寄与すること⁵⁸や、IL-1 α による好中球浸潤が CXCL1 のレセプターである CXCR2 の欠損マウスにおいて顕著に減少すること⁵⁹が報告されている。一方、リコンビナント IL-12 をチンパンジーに静脈内投与することで、ケモカイン誘導を介する好中球浸潤を促進し、*Cryptococcus neoformans* 感染を防御することが報告されている⁶⁰。また、IL-12 p40 のサブユニットを有する IL-23 は、 $\gamma\delta$ T 細胞を刺激することで、IL-17 を産生し、好中球浸潤に寄与することが明らかとなっている⁶¹。しかし、本検討では、PBS 群と Mp 感染群間において、肺胞洗浄液中の IL-23 に差は認められなかった (データ未記載)。過去の報告では、Mp 感染後の肺胞洗浄液中において、IL-23 mRNA の上昇が観察されているものの、ELISA 等を用いた蛋白質量の評価は行っていない⁶²。そのため、IL-23 量は極めて低く、ELISA による評価が困難であると考えられ、本モデルにおいても、IL-23 mRNA の評価や抗 IL-23 抗体を用い、IL-23 が Mp 感染後の好中球浸潤に及ぼす影響を評価する必要がある。今後より詳細な検討を図ることで、Mp 肺炎を抑制可能なより良い標

的因子の発見に繋がると考えられる。

一方で、CARDS toxin による TLR2 非依存的な炎症経路の存在も明らかとした (Fig. 12)。また、Mp 感染早期において観察される好中球浸潤の多くは TLR2 シグナルに依存するものの、一部 TLR2 非依存であることを明らかとしている (Fig. 5c)。さらに、抗 CARDS toxin 抗体投与により感染早期の好中球が減少傾向を示したことから、感染早期における好中球浸潤の一部に CARDS toxin が寄与することが示された (Fig. 9b)。これら結果を総合的に判断すると、感染早期に観察される好中球は、TLR2 依存的な経路と CARDS toxin による TLR2 非依存的な経路の総和であることが示唆された。また、Mp 感染時における好中球浸潤には、IL-1 α と IL-12 p40 が共に存在する必要がある (Fig. 6c) 一方で、CARDS toxin による TLR2 非依存的な好中球浸潤は、IL-1 α のみに起因していることが明らかとなった (Fig. 13)。Mp 感染時においては、TLR2 シグナルを介した IL-1 α と IL-12 p40 が強く誘導される (Fig. 2a)。しかし、CARDS toxin 投与時における IL-1 α と IL-12 p40 は、コントロール群と比較すると有意には増加するものの、特に、IL-12 p40 は Mp 感染時と比較すると、極めて低値である (Fig. 11c)。そのため、Mp 感染時とは異なり、CARDS toxin 投与時の好中球浸潤における IL-12 p40 の寄与は低いと考えているが、その詳細は不明である。また、CARDS toxin が IL-1 β を誘導すること⁵⁰や IL-1 β が IL-1 α の分泌に寄与すること⁶³が明らかとなっていることから、CARDS toxin 投与による IL-1 β の誘導が IL-1 α 分泌を促進し、好中球浸潤に寄与した可能性が考えられる。しかしながら、本検討では、肺胞洗浄液中の IL-1 β は検出することができず、その寄与を明確にすることはできなかった。一方、Mp 感染時において、経時的に IL-1 β の mRNA が上昇するものの (データ未記載)、ELISA による検出が不可能であることから、蛋白質量が極めて低いことが示唆されている。そのため、CARDS toxin 投与時においても、IL-1 β は上昇しているが、蛋白質量が低い可能性が考えられる。

また、Mp 感染 3 日後における好中球浸潤の大部分が *TLR2*^{-/-} マウスにおいて減少することを明らかとした (Fig. 5d)。興味深いことに、TLR2 非依存的な好中球浸潤を誘導する CARDS toxin が感染 3 日後における好中球浸潤に寄与することが明らかとなった (Fig. 9c)。しかし、その詳細なメカニズムを解明するまでには至っていないものの、感染 3 日後の好中球浸潤には、TLR2 シグナルと CARDS toxin が共に存在することが重要であると示唆され、両者が相乗効果を示す可能性も考えられる。本検討では、組換え CARDS toxin 蛋白質を用い、CARDS toxin の TLR2 非依存的な好中球浸潤メカニズムを解明したが、Mp 表面に CARDS toxin が存在するとの報告もあり⁴⁴、分泌型と機能が異なる可能性も考えられる。さらに感染が経過すると共に、CARDS toxin の寄与が大きくなった理由として、①感染後の肺内における CARDS toxin の増加、②肺胞マクロファージの CARDS toxin に対する感受性等の変化、③T 細胞、B 細胞、樹状細胞などの多くの免疫細胞の浸潤が認められる

ことから、それら細胞に CARDS toxin が作用した可能性などが考えられる。また本検討では、CARDS toxin の炎症因子としての機能を評価する目的で比較的に高容量の組換え CARDS toxin 蛋白質 (50 μ g/mouse) をマウスに投与している一方で、Mp 感染時において分泌される CARDS toxin 量は、組換え CARDS toxin 蛋白質を投与した量よりも少ないと考えられる。そのため、組換え CARDS toxin 蛋白質投与時に認められた炎症反応と Mp 感染時において分泌される CARDS toxin が誘導する炎症反応が必ずしも一致するとは考えていない。今後、Mp 感染症による炎症を抑制する上で、Mp 感染時における CARDS toxin の機能をより詳細に評価することが非常に重要であると推察される。

本節では、Mp の排除機構に影響を与えず、好中球浸潤を抑制可能な候補因子として、TLR2 シグナルに依存した IL-1 α および IL-12 p40 を明らかとした。また、CARDS toxin が Mp 肺炎の病態形成に一部寄与することを明らかとした。これら因子を治療標的とすることで、より安全で有効な抗炎症薬となり得るだろう。

本論

第二節 遺伝的背景の異なるマウスを用いた感受性比較および炎症評価

Mp はヒトの肺内で増殖する一方で、我々のマウスモデルでは、速やかに肺胞マクロファージなどにより排除されるため、ヒトにおける感染早期の炎症病態は模倣できているものの、持続する肺の炎症については模倣できていないと考えられる。事実、ヒトにおいて、潜伏期間は 1-3 週間と比較的長いことが知られている¹³。さらに、ヒトにおいて、感染初期には好中球による炎症が主体であるものの、感染後期になると徐々に T 細胞による炎症の寄与が大きくなると考えられていることから^{17,64}、肺内に菌が長期間存在し得る、Mp に対して高感受性のマウスは、感染後期の病態評価モデルとして有用であると考えられる。

本観点より、様々な研究で、遺伝的背景の異なるインブレットマウスを使用して、感染における感受性の違いを評価する手法が用いられてきた⁶⁵⁻⁷⁰。本手法は、各系統のマウスで遺伝的背景が均一であること、実験的曝露に対する反応のブレが小さいことから汎用されている。例えば、過去の報告において、遺伝的背景の異なる 5 種類のマウスを用い、*Mycoplasma pulmonis* に対する感受性の違いを評価している⁶⁸。また高感受性マウスと低感受性マウスに *Mycoplasma pulmonis* を感染させ、感染後における、肺の菌量、肺組織傷害、炎症性サイトカイン発現、抗体産生能などを比較検討し、*Mycoplasma pulmonis* による病態の評価を試みている⁶⁸⁻⁷⁰。さらに、Mp を用いた検討においても、感染後の肺胞洗浄液中の菌量が、C57BL/6 マウスと比較して BALB/c マウスにおいて高値を示すことから、C57BL/6 マウスと BALB/c マウスの Mp に対する感受性の違いが報告されている³⁷。そのため、Mp に対するマウスの感受性を比較することは、Mp 感染時における免疫反応を評価する上で有用である可能性がある。

そこで本節では、遺伝的背景の異なる 8 種類のマウス (A/J マウス、BALB/c マウス、C3H/HeJ マウス、C3H/HeN マウス、C57BL/6J マウス、CBA/N マウス、DBA/1 マウス、DBA/2 マウス) を用いて、Mp に対する感受性の違いを比較した。さらに、高感受性を示した DBA/2 マウスと、第一節で使用した BALB/c マウスを用いて、Mp 感染後の獲得免疫系への影響の違いについても評価した。

【実験材料と方法】

試薬

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA-2Na)、Ammonium chloride (NH₄Cl)、Potassium hydrogen carbonate (KHCO₃) は Nacalai Tesque より購入した。Horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG は Merck Millipore より購入した。2-mercaptoethanol は、Sigma より購入した。P1(アミノ酸残基:60-1525)蛋白質は、一般財団法人阪大微生物病研究会より譲渡を受けた。

実験動物

6-7 週齢の A/J マウス、BALB/c マウス、C3H/HeJ マウス、C3H/HeN マウス、C57BL/6J マウス、CBA/N マウス、DBA/1 マウス、DBA/2 マウス (雄) は、日本エスエルシー株式会社より購入した。これらマウスの飼育方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

Mp 培養

Mp の培養方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

Mp ストックのタイター確認

Mp ストックのタイター確認方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

Mp 感染

Mp の感染方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

肺胞洗浄液の回収

肺胞洗浄液の回収方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

肺胞洗浄液中における免疫細胞数評価

肺胞洗浄液中における免疫細胞数評価方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

血漿中抗体価

BALB/c マウス、DBA/2 マウスに、麻酔下で Mp (1.5×10^9 CFU/mL) を片鼻 20 μ L、計 40 μ L (6.0×10^7 CFU/mouse) で経鼻投与した (Day 0)。Day 14 で、ヘパリン処理ヘマトクリット毛細管 (ASONE) を用いて眼底より血漿を回収し、Mp 特異的抗体価および P1 蛋白質特異的抗体価を ELISA により評価した。Mp は 10 μ g/mL、P1(60-1525)蛋白質は 1 μ g/mL となるように、それぞれ PBS で希釈し、96 well half area microplates

(Corning Inc.) に添加し、4°C で一晩静置し固相化した。固相化したプレートを PBST (0.05% Tween 20 添加 PBS) で洗浄後、1% Block Ace (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を添加し、1 時間室温で静置しブロッキングした。次にプレートを PBST で洗浄後、0.4% Block Ace で希釈した血漿サンプルをブロッキングしたプレートに添加し、2 時間室温で静置した。2 時間後、プレートを PBST で洗浄し 0.4% Block Ace で 5000 倍希釈した horseradish-peroxidase 標識 goat anti-mouse IgG を添加し、1 時間室温で静置した。プレートを PBST で洗浄後、終濃度 0.8 mM の tetramethyl benzidine (Nacalai Tesque) を用いて発色させ、2 N H₂SO₄ により発色反応を停止後、microplate reader を用いて OD₄₅₀₋₅₇₀ を測定した。

肺胞洗浄液中における菌量評価

肺胞洗浄液中における菌量評価方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

脾細胞の再刺激によるサイトカイン産生評価

BALB/c マウス、DBA/2 マウスに、麻酔下で Mp (1.5×10^9 CFU/mL) を片鼻 20 μ L ずつ、計 40 μ L (6.0×10^7 CFU/mouse) で経鼻投与した (Day 0)。Day 14 で脾臓を回収し、細胞調製メディウム 10 mL 中で、5 mL シリンジのプランジャー部を用い、群ごとに脾臓をまとめてすり潰し、70 μ m セルストレーナーに通し、脾細胞を回収した。すり潰した脾臓は 50 mL チューブに回収し、600 \times g、4°C、5 分遠心後、上清を吸引し ACK lysis buffer (0.1 mM EDTA-2Na、10 mM KHCO₃、150 mM NH₄Cl 溶解水) を 10 mL 添加し、混和後、室温で 5 分静置し溶血させた。その後、細胞調製メディウムを 10 mL 加え、溶血反応を止め、600 \times g、4°C、5 分遠心した。上清を吸引後、培養用メディウム (10 vol% FCS、1 vol% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、4 ppm 2-mercaptoethanol 添加 RPMI1640) で懸濁し、再度 70 μ m セルストレーナーに通して細胞塊を除き、細胞数を測定した。2.0 $\times 10^7$ cells/mL に調製した脾細胞 50 μ L (1.0×10^6 cells/well) を 96 well flat-bottomed culture plate に播種し、1.0 $\times 10^8$ CFU/mL に調製した Mp 50 μ L (5×10^6 CFU/well) を添加し、計 100 μ L で培養した。脾細胞の培養は、37°C、5% CO₂、飽和蒸気圧下で行い、培養から 3 日で上清を回収した。培養上清中のサイトカイン産生評価は ELISA kit を用い、IFN- γ (BioLegend)、IL-17A (BioLegend) を測定した。プロトコールは各 kit に準じた。

Mp 再感染

BALB/c マウス、DBA/2 マウスに、麻酔下で Mp (1.5×10^9 CFU/mL) を片鼻 20 μ L ずつ、計 40 μ L (6.0×10^7 CFU/mouse) で経鼻投与した (Day 0)。Day 14 に、Day 0 と

同様、麻酔条件下で、Mp を経鼻投与した。

CD4⁺ T 細胞除去

BALB/c マウス、DBA/2 マウスに、麻酔下で Mp (1.5×10^9 CFU/mL) を片鼻 20 μ L ずつ、計 40 μ L (6.0×10^7 CFU/mouse) で経鼻投与した (Day 0)。Day 13 において、CD4⁺ T 細胞を除去するため、anti-CD4 antibody (100 μ g/mouse, clone: GK1.5, ハイブリドーマより精製)、コントロール抗体として、rat IgG2b, k Isotype Ctrl (100 μ g/mouse, clone: RTK4530, BioLegend) を 300 μ L/mouse で腹腔内投与した。Day 14 において、Mp を感染させ、翌日 (Day 15) に肺胞洗浄液を回収し、免疫細胞数はフローサイトメーターを用いて解析した。

統計解析

統計解析方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

【実験結果】

各マウスの Mp 感染に対する感受性評価

8 種類のマウス (A/J マウス、BALB/c マウス、C3H/HeJ マウス、C3H/HeN マウス、C57BL/6J マウス、CBA/N マウス、DBA/1 マウス、DBA/2 マウス) の Mp に対する感受性を評価するために、Mp 感染 1 日後における肺胞洗浄液中の菌量を real-time PCR で測定した。その結果、補体 C5 を欠損している DBA/2 マウスにおける肺胞洗浄液中の菌量は、BALB/c マウスや DBA/1 マウスと比較して、有意に高値を示した (Fig. 14a)。また、同じく補体 C5 を欠損している A/J マウスにおける菌量は、BALB/c マウスと同等であった (Fig. 14a)。さらに、DBA/2 マウスの肺胞洗浄液中の菌量は、感染 3 日および 5 日後においても BALB/c マウスと比較して高値を示した (Fig. 14b)。次に、標準平板菌数測定法を用い、Mp 感染 1 日後における肺胞洗浄液中の生菌数を評価したところ、real-time PCR の結果と同様に、BALB/c と比較し、DBA/2 マウスにおいて生菌数が高値を示した (Fig. 14c)。

次に、Mp 感染 1 日後における肺胞洗浄液中の免疫細胞数 (CD45⁺)、好中球数 (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻)、肺胞マクロファージ数 (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) をフローサイトメーターにより評価した。その結果、C57BL/6J マウスや CBA/N マウスにおける免疫細胞数および好中球数は、BALB/c マウスと比較して、有意に低値を示した (Fig. 15a)。また肺胞マクロファージ数は、BALB/c マウスと比較し、A/J マウス、CBA/N マウスおよび C3H/HeJ マウスにおいて有意に低値を示した (Fig. 15a)。しかし、DBA/2 マウスにおける肺胞洗浄液中の菌量は、BALB/c マウスと比較して高値である一方で (Fig. 14)、肺胞洗浄液中の免疫細胞数、好中球数および肺胞マクロファージ数は、両系統間に差が認められなかった (Fig. 15a)。また、ナイーブな BALB/c マウスと DBA/2 マウスの肺胞洗浄液中における免疫細胞数、好中球数および肺胞マクロファージ数も同様に、両系統間に差が認められなかった (Fig. 15b)。

次に、Mp 感染 1 日後の肺胞洗浄液中において、炎症性サイトカインである IL-1 α 、IL-6 および IL-12 p40 量を ELISA により評価した。免疫細胞数および好中球数の結果と同様に、C57BL/6J マウス、DBA/1 マウスおよび CBA/N マウスにおける IL-1 α 、IL-6 および IL-12 p40 は、BALB/c マウスと比較して、減少傾向もしくは有意な減少を示した (Fig. 16)。一方で、DBA/2 マウスにおける IL-1 α や IL-6 は、BALB/c マウスと比較して変化がないものの、IL-12 p40 は有意に高値を示した (Fig. 16)。また、A/J マウスにおける IL-12 p40 も BALB/c マウスと比較して、高値の傾向が認められた (Fig. 16)。以上の結果より、DBA/2 マウスは、他のマウスと比較して、感染後における肺内の菌量が長期間観察されたことから、Mp 感染症に対して高感受性であることが示された。

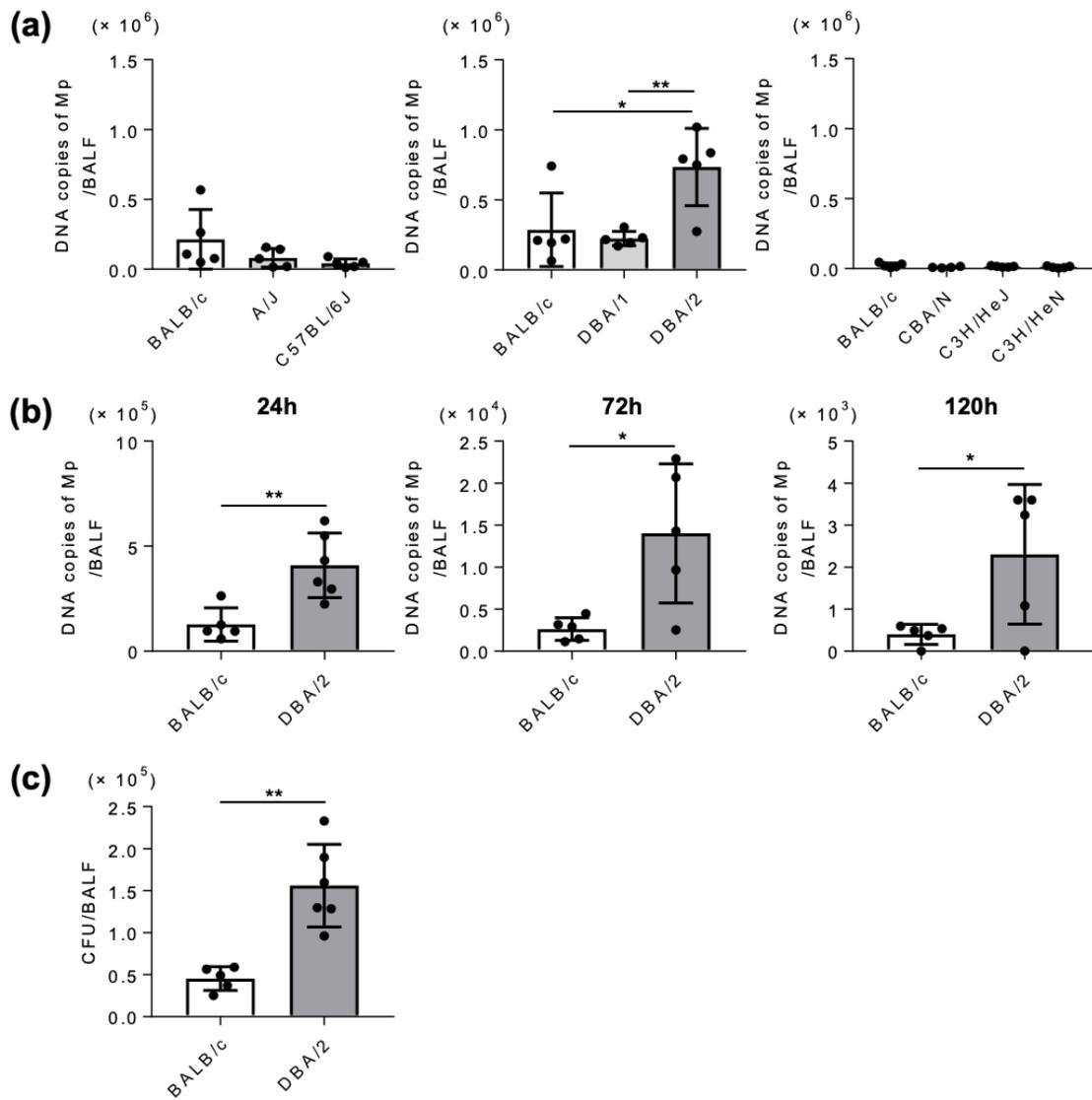


Figure 14. Mp bacterial load in BALF after infection in several inbred mouse strains. Mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). (a) On 24h after infection, DNA copies of Mp in BALF was determined using real-time PCR. (b) On 24h, 72h and 120h post-infection, DNA copies of Mp in BALF from BALB/c and DBA/2 mice was determined using real-time PCR. (c) On 24h post-infection, Mp bacterial load in BALF from BALB/c and DBA/2 mice was analyzed by bacterial culture assay. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) $n = 4$ or 5 per group; (b) BALB/c: $n = 5$, DBA/2: $n = 5-6$; (c) BALB/c: $n = 5$, DBA/2: $n = 6$. Student's *t*-test (b, c) and Tukey's test (a) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

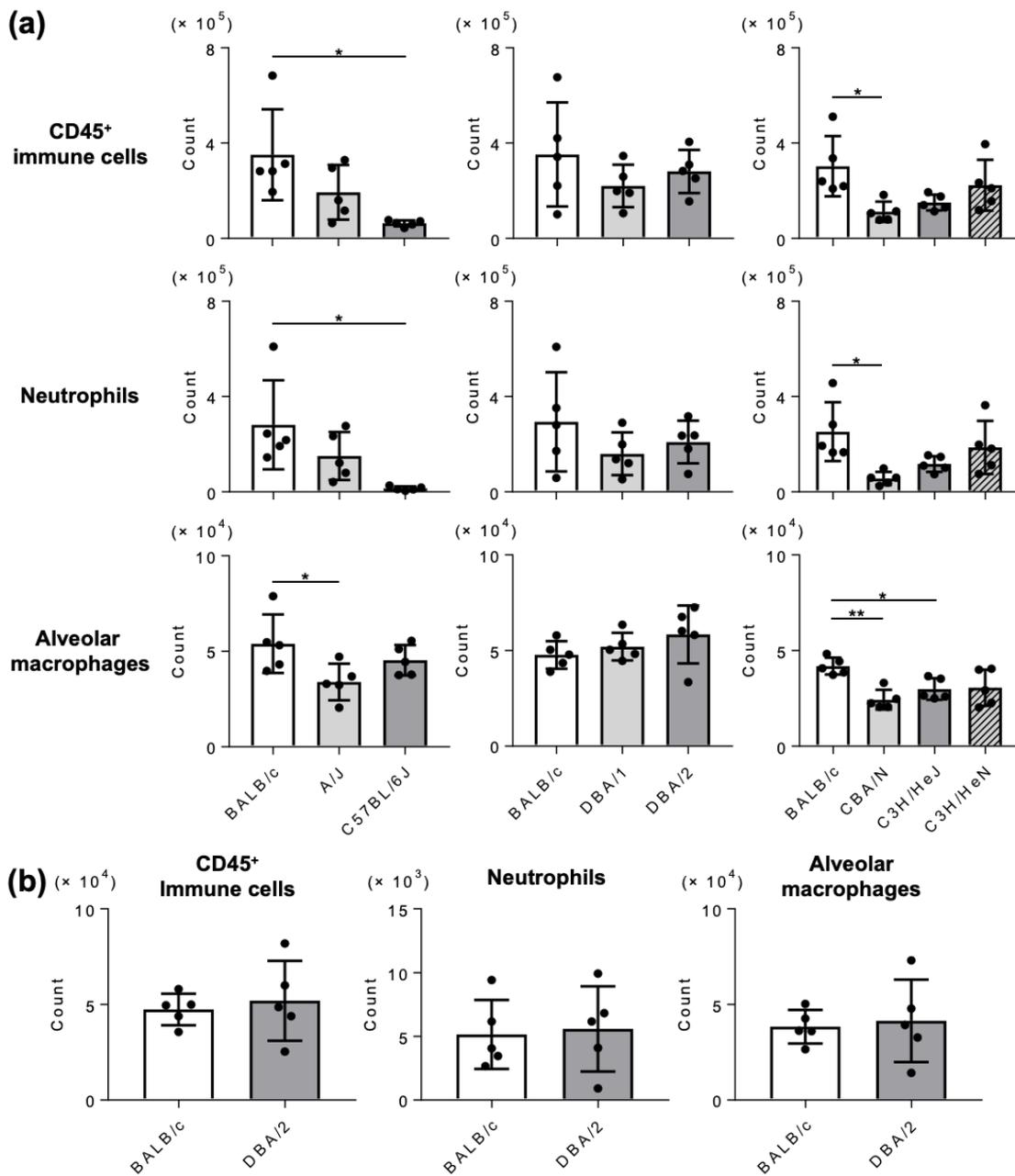


Figure 15. Immune cell numbers in BALF after Mp infection in several inbred mouse strains. (a) Mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). On 24h post-infection, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻), and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were determined by flow cytometry. (b) The numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils, and alveolar macrophages in BALF from naive BALB/c mice and naive DBA/2 mice were determined by flow cytometry. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (a) $n = 5$ per group; (b) BALB/c: $n = 5$, DBA/2: $n = 5$. Student's *t*-test (b) and Tukey's test (a) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

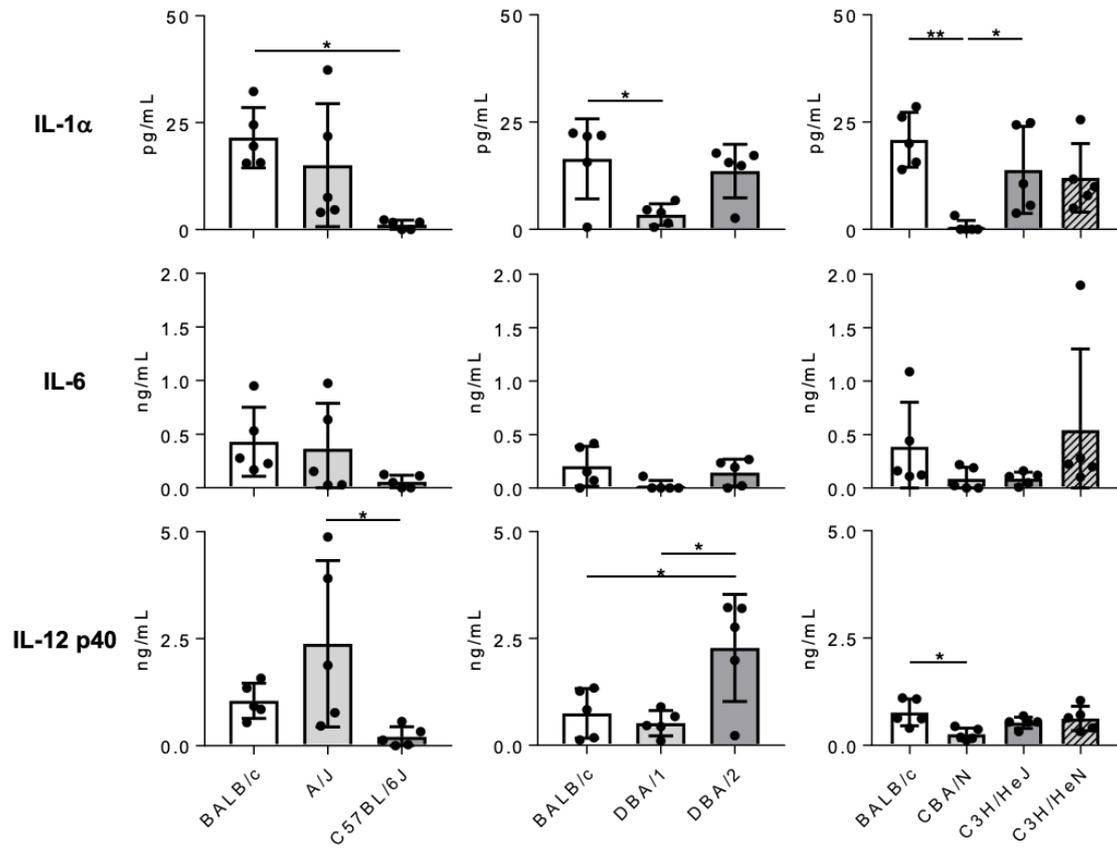


Figure 16. Cytokine levels in BALF after *Mp* infection in several inbred mouse strains. Mice were infected intranasally with *Mp* (6.0×10^7 CFU). On 24h post-infection, the concentrations of cytokines in BALF were determined by ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. $n = 5$ per group. Tukey's test were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Mp 感染後における Mp 特異的抗体価および T 細胞応答評価

獲得免疫系の誘導に重要な因子として知られている IL-12 p40 が、BALB/c マウスと DBA/2 マウスの肺胞洗浄液中において有意な差が認められたことから (Fig. 16)、これらマウスの Mp 感染後における獲得免疫反応に差異があるのかを評価した。まず、Mp 感染 14 日後において、血漿中における Mp 特異的抗体価を評価した (Fig. 17a)。ナイーブ BALB/c マウスとナイーブ DBA/2 マウスにおいても Mp 特異的 total IgG はバックグラウンドとして高値を示しているものの、Mp 感染により、BALB/c マウスと DBA/2 マウスにおける血漿中の Mp 特異的 total IgG は有意に増加した (Fig. 17b)。バックグラウンドが高い理由として、Mp 表面に存在する免疫グロブリン結合蛋白質に対し、非特異的に二次抗体が結合している可能性が考えられた⁷¹。そのため、Mp 表面に存在する P1 蛋白質に着目し、血漿中における P1 蛋白質特異的抗体価を評価した (Fig. 17a)。その結果、バックグラウンドが低く抑えられ、Mp 特異的 total IgG と同様に、Mp 感染により BALB/c マウスと DBA/2 マウスにおける血漿中の P1 特異的 total IgG は有意に増加した (Fig. 17c)。一方で、Mp 感染により増加した Mp 特異的 total IgG および P1 特異的 total IgG は、両系統間に差が認められなかった (Fig. 17b, c)。次に、Mp 感染 14 日後のマウスより脾臓を回収し、Mp で再刺激後の上清中サイトカイン量を解析することで、Mp 特異的な T 細胞応答を評価した。Th1 型サイトカインである IFN- γ および Th17 型サイトカインである IL-17A は、ナイーブ BALB/c マウスおよびナイーブ DBA/2 マウスと比較して、Mp 感染後の BALB/c マウスおよび DBA/2 マウスで有意な上昇が認められた (Fig. 17d)。また興味深いことに、Mp 感染後の BALB/c マウスと DBA/2 マウスを比較したところ、培養上清中の IFN- γ および IL-17A は、DBA/2 マウスで有意に高値を示した (Fig. 17d)。以上の結果より、Mp 感染時において DBA/2 マウスは、Mp 特異的 Th1 および Th17 免疫応答を強く誘導することが明らかとなった。

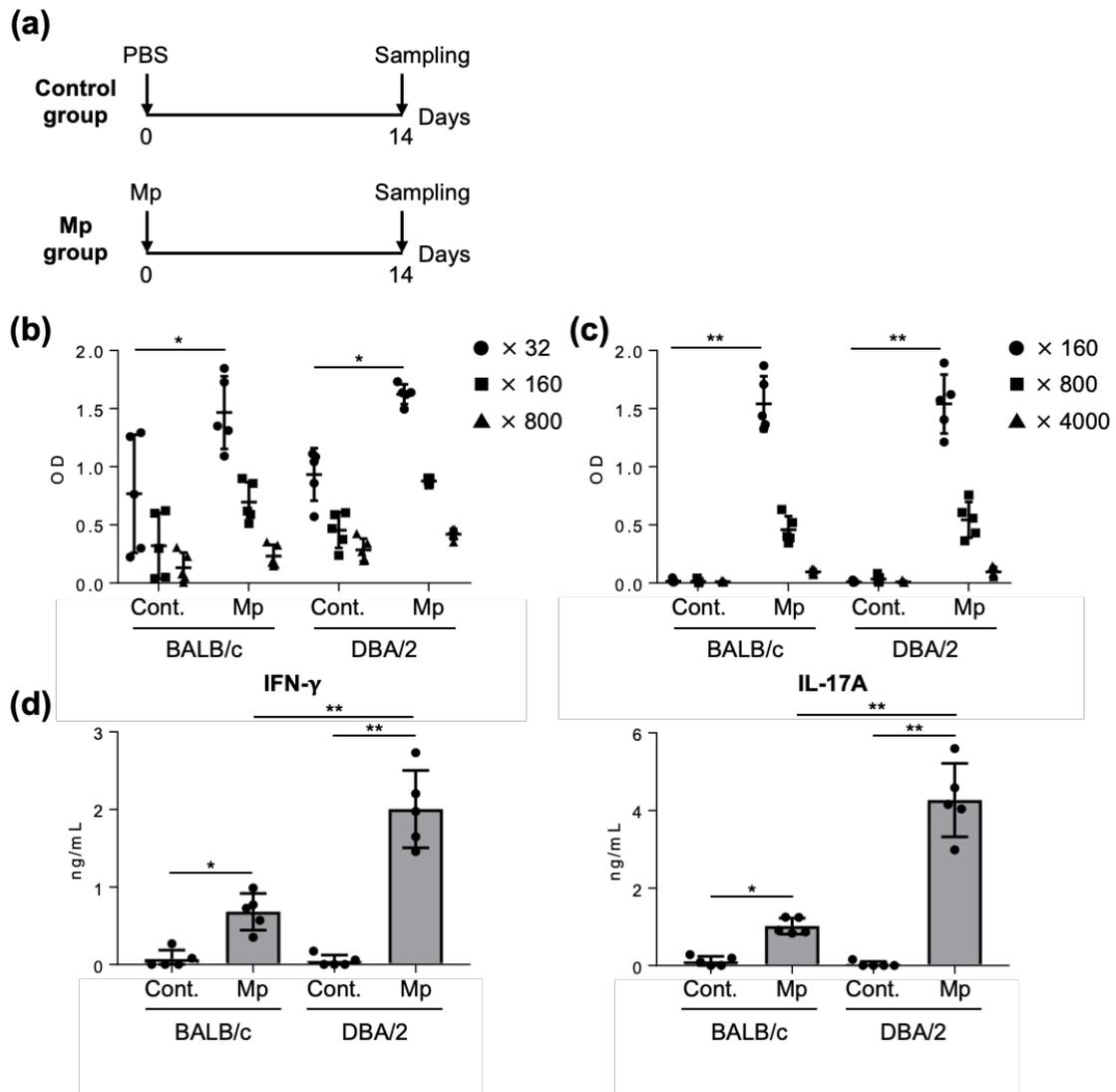


Figure 17. Immune responses after Mp infection. (a) Schematic representation of the experiment. (b-d) BALB/c and DBA/2 mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). (b, c) On day 14 post-infection, the levels of (b) Mp-specific total IgG in 32-, 160-, and 800-fold diluted plasma, and (c) recombinant P1-specific total IgG in 160-, 800-, and 4000-fold diluted plasma were determined using ELISA. (d) On day 14 post-infection, splenocytes were cultured with Mp for 72h and the levels of IFN- γ and IL-17A in the culture supernatant were determined by ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (b) $n = 5$ per group; (c) $n = 5$ per group. (b, c) Significant differences were observed only in the (b) 32-fold- and (c) 160-fold-diluted plasma samples. Tukey's test (b-d) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Mp 再感染後における肺胞洗浄液中の免疫細胞数評価

DBA/2 マウスの Mp 感染により、Mp 特異的 Th1 および Th17 応答が強く誘導されたことから (Fig. 17d)、次に、これら T 細胞応答が Mp 再感染時に及ぼす影響を評価した。まず、BALB/c マウスと DBA/2 マウスに Mp を感染させ、14 日後に再度 Mp を感染し、再感染 1 日後における肺胞洗浄液中の菌量および免疫細胞数を評価した (Fig. 18a)。その結果、BALB/c マウスおよび DBA/2 マウスの Mp 再感染群における菌量は、それぞれの Mp 初回感染群と比較して、有意な減少が認められた (Fig. 18b)。また、BALB/c マウスの肺胞洗浄液中の免疫細胞数および好中球数は、初回感染時と再感染時に差が認められない一方で、DBA/2 マウスの肺胞洗浄液中の免疫細胞数および好中球数は、初回感染時と比較し、再感染時において有意に増加した (Fig. 18c)。また肺胞マクロファージ数は、どちらの系統においても同程度であった (Fig. 18c)。以上の結果より、DBA/2 マウスに Mp を再感染させた際、初回感染と比較し、肺内の炎症が増悪することが示された。

次に、DBA/2 マウスの再感染時に認められた肺への好中球浸潤に Th1 および Th17 応答が寄与するのかを評価するために、Mp 再感染前に抗 CD4 抗体を処置し、CD4⁺ T 細胞を除去した。その後、Mp 再感染 1 日後における肺胞洗浄液中の免疫細胞数、好中球数および肺胞マクロファージ数をフローサイトメーターにより評価した (Fig. 19a)。その結果、アイソタイプ抗体投与群と比較し、抗 CD4 抗体投与群において、どちらの系統でも免疫細胞数および好中球数の有意な減少が認められた (Fig. 19b)。一方で、肺胞マクロファージ数には変化が認められなかった (Fig. 19b)。これらの結果より、Th1 や Th17 免疫応答が DBA/2 マウスの再感染時に認められた肺への好中球浸潤の亢進に寄与していることが示された。

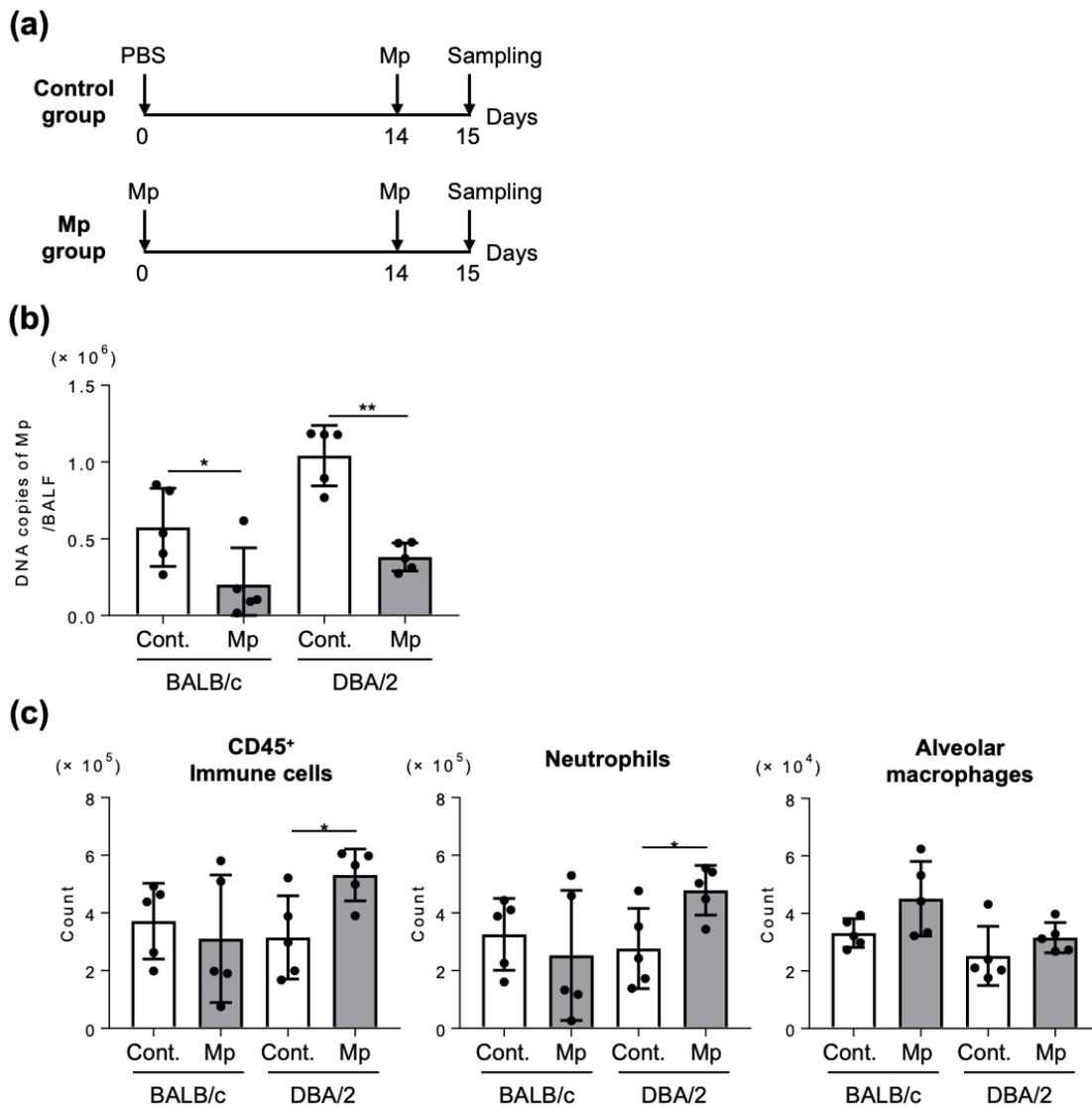


Figure 18. Mp bacterial load and immune cell numbers in BALF after Mp reinfection in BALB/c and DBA/2 mice. (a) Schematic representation of the experiment. (b, c) BALB/c and DBA/2 mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). On day 14 post-infection, mice were intranasally reinfected with Mp (6.0×10^7 CFU). On the day after reinfection, (b) DNA copies of Mp and (c) the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻), and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were determined by real-time PCR (b) and flow cytometry (c). Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (b) $n = 5$ per group; (c) $n = 5$ per group. Student's *t*-test (b, c) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

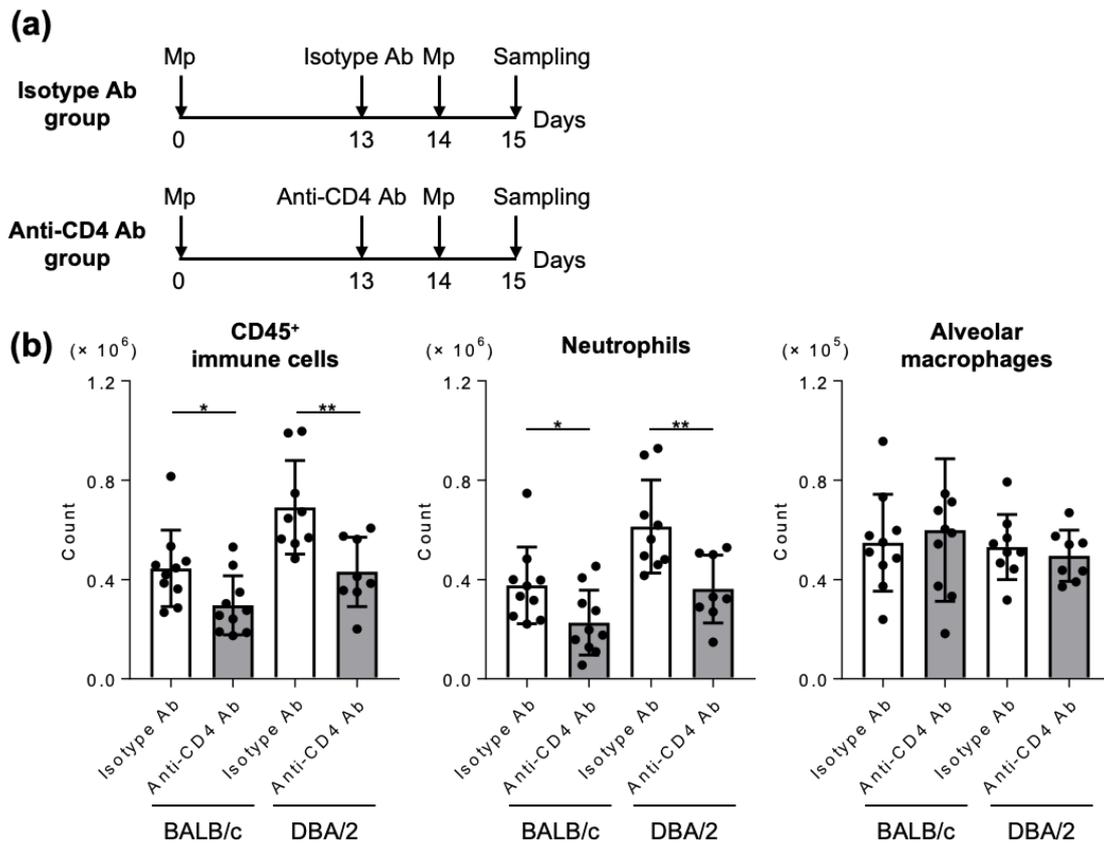


Figure 19. CD4⁺ T cell-dependent neutrophil infiltration in reinfected mice. (a) Schematic representation of the experiment. (b) BALB/c and DBA/2 mice were infected intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). On day 13 post-infection, mice were injected intraperitoneally with anti-CD4 or isotype-control antibody (Ab). On day 14, mice were intranasally reinfected with Mp. The day after Mp reinfection, the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻), and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were determined by flow cytometry. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice. (b) BALB/c (isotype Ab: $n = 10$, anti-CD4 Ab: $n = 10$), DBA/2 (isotype Ab: $n = 9$, anti-CD4 Ab: $n = 8$). Student's *t*-test (b) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

【考察】

本検討では、Mp 感染 1 日後の DBA/2 マウスにおける肺胞洗浄液中の菌量が、異なる遺伝子背景を持つ 7 種類のマウス (A/J, BALB/c, C3H/HeJ, C3H/HeN, C57BL/6J, CBA/N, DBA/1) と比較して、最も高値を示すことを明らかとした (Fig. 14a)。過去の報告において、DBA/2 マウスは、*Pseudomonas aeruginosa*、*Bacillus anthracis* や *Staphylococcus aureus* など、他の病原体に対して感受性が高いことが知られている⁷²⁻⁷⁵。本結果は、過去の報告と類似しており、DBA/2 マウスは Mp 感染に対しても感受性が高いことが示された。

補体は 30 種以上の蛋白質からなり、自然免疫および獲得免疫の活性化などを担う生体防御システムである⁷⁶。補体の主な機能として、病原体をオプソニン化し、好中球やマクロファージによる貪食を促進させることで、病原体を排除する。それに加え、肥満細胞、マクロファージ、顆粒球、血小板および内皮細胞を含む、多くの細胞を活性化させる補体フラグメント (C3a, C5a) を誘導する⁷⁷。様々な補体フラグメントの中でも、C5a は、好中球表面に存在する C5a 受容体を介し、好中球の活性化および浸潤を促進することが知られている⁷⁷⁻⁷⁹。DBA/2 マウスと A/J マウスは、共に補体フラグメント C5 を欠損している⁸⁰。一方で、A/J マウスの肺胞洗浄液中の菌量は他のマウスと同程度であったことから、補体カスケードが DBA/2 マウスで観察された菌量の増加に寄与しないことが示唆された (Fig. 14a)。一般的に、肺内に侵入した異物および病原体等の排除は、肺胞に常在する組織マクロファージである肺胞マクロファージが主体であることが知られている⁸¹⁻⁸³。Wilson らは、DBA/2 マウスにおけるマクロファージの殺菌能が、C57BL/6 のマクロファージと比較して低いことを報告している⁷³。そのため、DBA/2 マウスにおける菌量の増加は、肺胞マクロファージの殺菌能が低いことに起因する可能性が考えられる。しかし、DBA/2 マウスが Mp に高感受性を示す明確なメカニズムについては未だ不明なままである。

また、Mp 感染時における肺胞洗浄液中の好中球数は、DBA/2 マウスおよび A/J マウス間で差が認められなかったことから、Mp 感染時の好中球浸潤における C5 の寄与は低いと考えられる (Fig. 15a)。また、C57BL/6J マウスや CBA/N マウスにおける免疫細胞数や好中球数は、BALB/c マウスと比較して、有意に低値を示している (Fig. 15a)。さらに、これら結果と相関し、C57BL/6J マウスや CBA/N マウスにおける肺胞洗浄液中の IL-1 α 、IL-6 および IL-12 p40 においても、有意に低値もしくは低下傾向を示していた (Fig. 16)。Liu らは、BALB/c マウスの樹状細胞において、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 の mRNA の発現量が、C57BL/6 マウスの樹状細胞と比較して、非常に高いことを示しており⁸⁴、マウス系統間で TLR 発現が異なることを示唆している。第一節の結果でも示しているように、IL-1 α 、IL-6 および IL-12 p40 は、主に TLR2 シグナル依存的であることから (Fig. 5e)、C57BL/6J マウスおよび CBA/N マウスにおける TLR2 発現が他のマウスと比較して低値であるかもしれない。

一方で、DBA/2 マウスおよび A/J マウスの肺胞洗浄液中における IL-12 p40 は、BALB/c マウスと比較して、有意に上昇もしくは上昇傾向が認められた (Fig. 16)。IL-12 p40 は、ナイーブ T 細胞から Th1 細胞に分化するために必須である IL-12 p70 と Th17 細胞への分化に寄与する IL-23 に共通するサブユニットである⁸⁵。そのため、Mp 感染後における、DBA/2 マウスの Mp 特異的 Th1 および Th17 免疫応答の有意な上昇は、Mp 感染 1 日後に上昇した IL-12 p40 に起因している可能性がある (Fig. 17d)。過去の報告より、エンドトキシンショック状態で、C5a が IL-17A および IL-23 の産生を抑制し、抗炎症作用を発揮することが明らかとなっている⁸⁶。また喘息モデルにおいて、C5a が IL-23 依存的な Th17 免疫応答を抑制することも報告されている⁸⁷。これらの報告を考慮すると、感染後に上昇する IL-12 p40 は、IL-23 であると考えられる。そのため、C5 を欠損している DBA/2 マウスは、感染後の IL-23 が上昇している可能性が高く、その上昇が Th1 および Th17 免疫応答の促進に寄与しているのかもしれない。

次に、Th1 および Th17 免疫応答が、Mp の再感染時に与える影響を評価したところ、感染後における好中球浸潤の亢進に寄与することが明らかとなった (Fig. 19b)。本結果は、マウスやハムスターに Mp を再感染させた際に、肺炎の増悪が観察されたという報告と一致する^{88,89}。それに加え、ヒトにおいても再感染で悪化することが報告されている⁹⁰。すなわち、Mp の初回感染は、再感染時における炎症をより強く惹起する免疫応答を誘導する可能性がある。そのため、再感染時に認められた好中球の上昇は、初回感染時に誘導された免疫応答に起因する可能性が考えられた。過去に、Mp 特異的な CD4⁺ T 細胞が、肺炎の悪化に寄与するという報告がなされている⁹¹。例えば、Yang らは、ヒトにおける Mp 肺炎時において、Th1/Th2 比の上昇が病態の重篤化に関連することを示している⁹²。また、IL-17 の産生による好中球浸潤に寄与する Th17 細胞の増加⁹³ および IL-17A の上昇は、難治性 Mp 肺炎患者において観察されている^{94,95}。これらの報告は、Mp 感染後の DBA/2 マウスにおいて誘導された CD4⁺ T 細胞が、再感染時において好中球浸潤を促進し、肺炎を悪化させる可能性を支持するものである。しかし本検討では、CD4⁺ T 細胞のサブセットを明確にするまでには至らなかった。今後、CD4⁺ T 細胞のサブセットを同定すると共に、IL-12 p40 の中和抗体を用いて、IL-12 p40 の上昇と CD4⁺ T 細胞の誘導との関連性を明らかとすることで、再感染時における肺炎の悪化を予防可能であると考えられる。

以上、本検討では、DBA/2 マウスが Mp 感染後の病態を評価する上で有用なモデルマウスであると共に、遺伝子背景の異なるマウスを用いることで、Mp の病原性を評価可能であることを示した。

本論

第三節 ワクチン接種による肺炎悪化メカニズムの解明

ワクチンは、Mp 感染による肺炎や二次的に誘発する合併症を予防するために有用であると考えられる。特に、治療薬の選択が困難となる薬剤耐性 Mp も予防可能であることから、ワクチンの開発が待望されている。

Mp は、ヒト気道上皮細胞に接着することで増殖し、感染が成立することから、Mp 表面に存在する付着因子である P1 や P30、もしくはホルマリンで不活化した Mp を抗原としたワクチン開発が試みられている。例えば、P1 と P30 を結合させた融合蛋白質を免疫して得られた抗体が、ヒト気道上皮細胞への Mp の接着を 95%抑制することが報告されている⁹⁶。また、接着に寄与する P1 の C 末端である P1C をコードするプラスミドベクターをマウスに投与することで、Mp 感染を防御することも示されている⁹⁷。さらに、ヒトを対象とした研究において、ホルマリンを用いて不活化した Mp と免疫賦活化剤としてアルミニウムアジュバントを用いたワクチンが、気管支炎の発症率を 36~37%減少、咽頭炎の発症率を 11.9%減少させることが報告されており^{98,99}、ワクチン開発は順調であるかのように思われていた。一方で、ヒトにおいて、ワクチン接種により逆に、Mp 感染後の炎症の増悪が観察されている^{29,30}。例えば、1967 年の報告において、不活化 Mp をヒトにワクチンし、生菌 Mp を感染させ、その後の肺炎病態を評価している。その結果、ワクチン群で Mp 特異的抗体が誘導されている被験者においては、プラセボ投与群と比較して、肺炎抑制効果が認められる一方、ワクチン群で Mp 特異的抗体が誘導されていない被験者では、プラセボ投与群と比較し、肺炎の悪化が観察されている²⁹。これら結果は、Mp に対する抗体が肺炎予防に重要であることを示しているものの、ワクチン接種が逆に肺炎を悪化させることも示唆している。その後、ハムスター^{89,100}やマウス¹⁰¹を用いた検討によって、ヒト同様に、ワクチン接種により逆に Mp 肺炎の悪化が観察されている。また、P1 を抗原に用いたハムスターにおける検討においても、ワクチン接種による感染防御効果が認められないだけでなく、逆に肺炎が悪化することが報告されている⁸⁹。現在に至るまで、これらワクチン接種による肺炎悪化メカニズムは解明されておらず、ワクチン開発の大きな障壁となっていた。そのため、新規 Mp ワクチン開発には、ワクチン接種により肺炎が悪化するメカニズムの解明が必須であると考えられた。

本観点について、筆者の前節までの検討により、Mp 感染により誘導される Th1 および Th17 免疫応答が、Mp 再感染時に、好中球浸潤を伴う肺炎を悪化させることが明らかとなった (Fig. 19b)。これらの結果から、Mp ワクチン接種による肺炎の悪化が、ワクチンによる Th1 や Th17 の誘導を介して引き起こされている可能性が考えられた。そこで本節では、

ヒトの Mp 肺炎を悪化させ大きな問題となった不活化 Mp とアルミニウムアジュバント (alum) をマウスにワクチン接種し、Mp を感染させるモデルを用いて、ワクチン接種による肺炎悪化メカニズムの解明を図った。

【実験材料と方法】

試薬

4%-パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液は、Nacalai Tesque より購入した。Aluminium hydroxide gel (alum) は InvivoGen より購入した。

実験動物

6-7 週齢の BALB/c マウス (雄) は、日本エスエルシー株式会社より購入した。遺伝的バックグラウンドを BALB/c とする TLR2 欠損マウスは、Oriental Bio Service より購入した。これらマウスの飼育方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

Mp 培養

Mp の培養方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

Mp ストックのタイター確認

Mp ストックのタイター確認方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

不活化 Mp の作製

-80℃で保管している Mp を室温で溶解し、6000 × g、3 分で遠心、上清を回収した後、ペレットを PBS で 2 回洗浄した。さらに遠心後、PBS を取り除き、Mp を不活化するために、PBS を用いて希釈した 0.16% パラホルムアルデヒドを加え、37℃で 1 日間静置した。静置後、パラホルムアルデヒドを取り除くために遠心し、PBS で 2 回洗浄した。遠心後、PBS を加え、25G 針を用いて、再懸濁した。不活化 Mp の蛋白質量は、a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。

血漿中抗体価

BALB/c マウスの尾根部皮下に、Day 0, 10 で不活化 Mp (4 μg/mouse) を alum (250 μg/mouse) と共投与した。投与試料は PBS で調製し、29G マイジエクター (Terumo Corporation) を用いて左右の皮下に 25 μL ずつ、計 50 μL/mouse で投与した。Day 17 で眼底より血漿を回収し、Mp 特異的抗体価を ELISA により評価した。血漿中抗体価方法は、第二節の実験材料と方法に準じた。

Mp 感染

Mp の感染方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

肺胞洗淨液の回収

不活化 Mp を免疫したマウスに Mp を感染させ、1 日後の肺胞洗淨液を回収した。肺胞洗淨液の回収方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

肺胞洗淨液中における菌量評価

肺胞洗淨液中における菌量評価方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

肺胞洗淨液中における免疫細胞数評価

肺胞洗淨液中における免疫細胞数評価方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

肺胞洗淨液のケモカイン評価

肺胞洗淨液を 6000 × g、5 分で遠心し、上清を回収した後、ELISA kit を用い、CXCL1(MKC00B, R&D Systems)、CXCL2(MM200, R&D Systems)、CXCL5 (MX000, R&D Systems) を測定した。プロトコールは各 kit に準じた。

脾細胞の再刺激によるサイトカイン産生評価

BALB/c マウスの尾根部皮下に、Day 0, 10 で不活化 Mp (4 µg/mouse) を alum (250 µg/mouse) と共投与した。投与試料は PBS で調製し、マイジェクターを用いて左右の皮下に 25 µL ずつ、計 50 µL/mouse で投与した。Day 22 で Mp を経鼻投与した後、Day 23 で脾臓を回収し、細胞調製メディウム 10 mL 中で、5 mL シリンジのプランジャー部を用い、群ごとに脾臓をまとめてすり潰し、70 µm セルストレーナーに通し、脾細胞を回収した。脾細胞の再刺激によるサイトカイン産生評価方法は、第二節の実験材料と方法に準じた。培養上清中のサイトカイン産生評価は ELISA kit を用い、IFN-γ (BioLegend)、IL-17A (BioLegend)、IL-13 (eBioscience, San Diego, CA, USA) を測定した。プロトコールは各 kit に準じた。

CD4⁺ T 細胞除去

BALB/c マウスの尾根部皮下に、Day 0, 10 で不活化 Mp (4 µg/mouse) を alum (250 µg/mouse) と共投与した。Day 34 において、CD4⁺ T 細胞を除去するため、anti-CD4 antibody (100 µg/mouse, clone: GK1.5, ハイブリドーマより精製)、コントロール抗体として、rat IgG2b, k Isotype Ctrl (100 µg/mouse, clone: RTK4530, BioLegend) を 300 µL/mouse で腹腔内投与した。Day 35 において、Mp を感染させ、翌日 (Day 36) に肺胞洗淨液を回収した。肺胞洗淨液中における免疫細胞数評価方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

統計解析

統計解析方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

【実験結果】

不活化 Mp ワクチン接種による好中球浸潤促進

まず、パラホルムアルデヒドを用いて不活化した Mp と免疫賦活化剤である alum を共に皮下投与し、血漿中の Mp 特異的抗体価を評価した。その結果、非免疫群と比較し、不活化 Mp 免疫群において Mp 特異的 total IgG の有意な増加が認められた (Fig. 20a)。そこで、Mp 感染 1 日後において、肺胞洗浄液中における菌量を評価したところ、非免疫群と比較し、不活化 Mp 免疫群で顕著な菌量の減少が認められた (Fig. 20b)。次に、肺胞洗浄液中の免疫細胞数 (CD45⁺)、好中球数 (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻) および肺胞マクロファージ数 (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) をフローサイトメーターで評価した。非免疫群において、Mp 感染 1 日後の肺胞洗浄液中における免疫細胞数および好中球数は、コントロール群と比較し、有意な増加が観察された (Fig. 20c)。一方で、肺胞マクロファージ数は、コントロール群と非免疫群で変化は認められなかった (Fig. 20c)。菌量の減少が認められている不活化 Mp 免疫群において、肺胞洗浄液中の免疫細胞数および好中球数は、非免疫群と同程度であった (Fig. 20c)。次に、好中球の浸潤に重要な因子であるケモカイン (CXCL1、CXCL2、CXCL5) を評価した。その結果、非免疫群では、コントロール群と比べ、肺胞洗浄液中における CXCL1、CXCL2 および CXCL5 の有意な増加が観察された (Fig. 20d)。一方、不活化 Mp 免疫群では、非免疫群と比較し、CXCL2 および CXCL5 には変化がないものの、CXCL1 の有意な減少が認められた (Fig. 20d)。以上より、不活化 Mp ワクチン接種は、感染後における肺胞洗浄液中の菌量は抑制可能である一方で、肺内における好中球浸潤は抑制できないことが示された。

次に、菌量の減少が好中球浸潤に及ぼす影響を評価するために、ナীবマウスに様々な菌量の Mp (6.0×10^7 、 2.0×10^7 、 6.0×10^6 CFU/mouse) を感染させ、肺胞洗浄液中における好中球数が菌量に依存するのかを評価した。Mp 感染 1 日後における菌量を real-time PCR により測定したところ、感染させた Mp 量依存的に肺胞洗浄液中における菌量の増加が認められた (Fig. 21a)。また、肺胞洗浄液中における免疫細胞数、好中球数および肺胞マクロファージ数をフローサイトメーターにより評価したところ、感染させた Mp 量依存的に肺胞洗浄液中の免疫細胞数および好中球数が増加した (Fig. 21b)。一方で、肺胞洗浄液中の肺胞マクロファージ数には変化はなかった (Fig. 21b)。以上より、菌量依存的な好中球の浸潤が確認されたことから、不活化 Mp ワクチン接種が、Mp 感染時の好中球浸潤を促進させる免疫応答を誘導する可能性が示された。

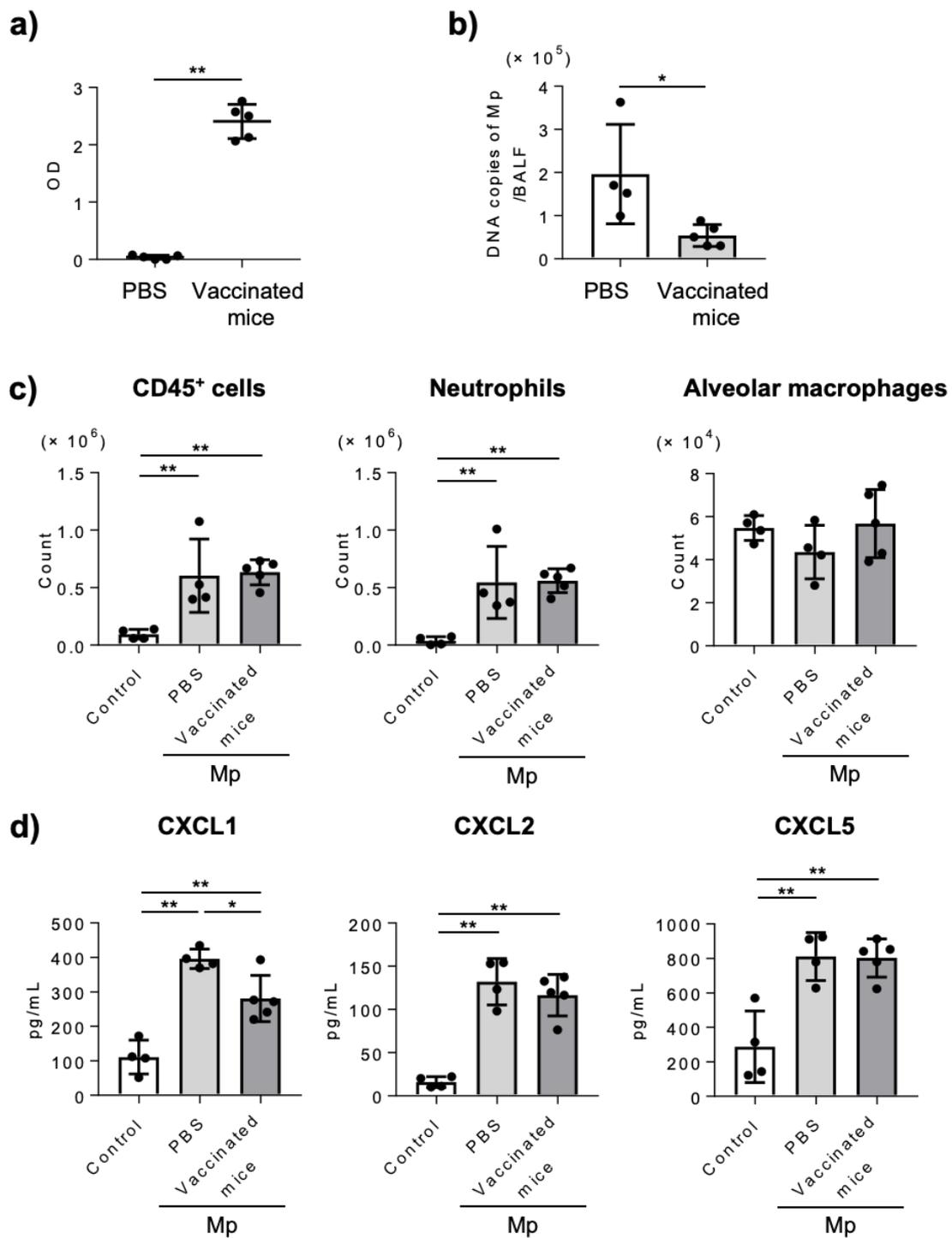


Figure 20. Neutrophil infiltration after vaccination with inactivated Mp plus alum. BALB/c mice were vaccinated with PBS only or with inactivated Mp plus alum. After the last dose, mice were challenged intranasally with Mp (6.0×10^7 CFU). (a) The levels of Mp-specific total IgG in plasma (dilution, 1:160) were evaluated by using ELISA after the last vaccination. (b-d) In BALF harvested 24h after Mp infection, (b) DNA copies of Mp; (c) CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻), and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺); and (d) the levels of CXCL1, CXCL2, and CXCL5 in BALF were evaluated by using real-time PCR (b), flow cytometry (c), and ELISA (d). Uninfected mice were used as controls (c, d). Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice (d) or three times (a-c). (a) PBS: $n = 5$, inactivated Mp: $n = 5$; (b) PBS: $n = 4$, inactivated Mp: $n = 5$; (c) uninfected control: $n = 4$, PBS: $n = 4$, inactivated Mp: $n = 5$, (d) uninfected control: $n = 4$, PBS: $n = 4$, inactivated Mp: $n = 5$. Student's *t*-test (a, b) and Tukey's test (c, d) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

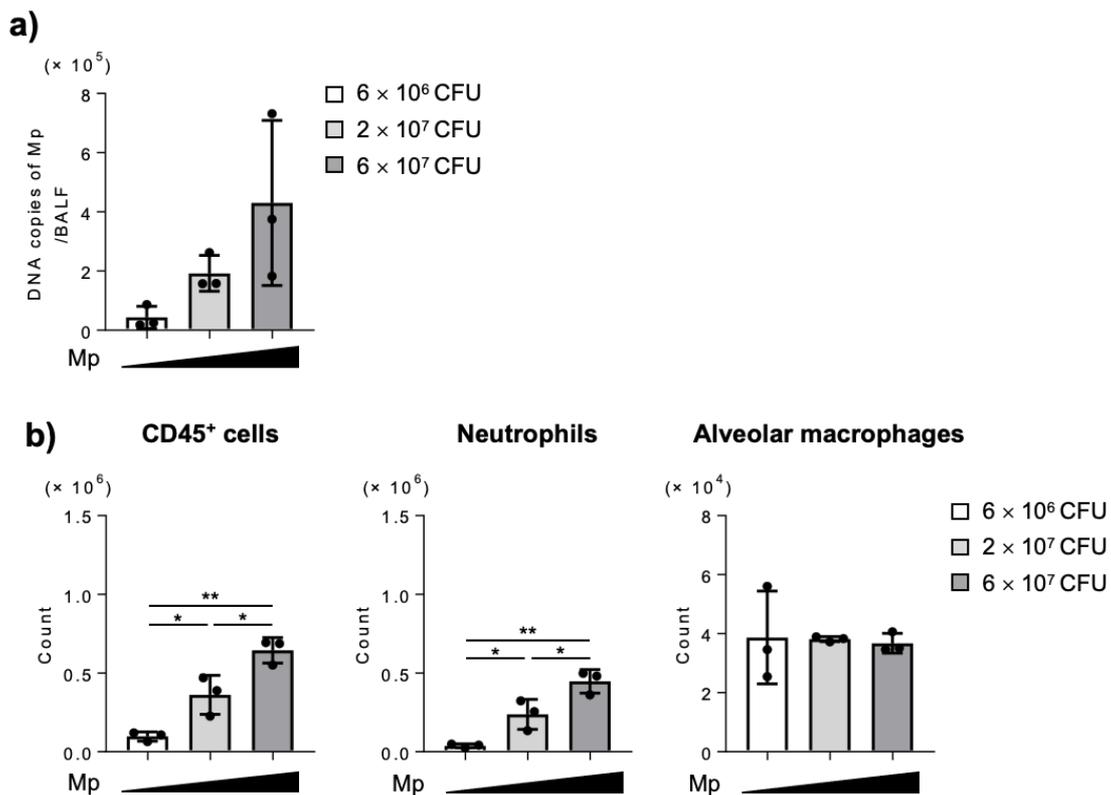


Figure 21. Differences in neutrophil infiltration in naive mice according to the infected dose of Mp. BALB/c mice were infected with various amounts of Mp (6.0×10^7 , 2.0×10^7 , or 6.0×10^6 CFU per mouse). At 24 h after Mp infection, (a) DNA copies of Mp in BALF was evaluated by using real-time PCR, and (b) the numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻), and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF were measured by flow cytometry. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice (a, b). (a) $n = 3$ per group; (b) $n = 3$ per group. Tukey's test (b) were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

不活化 Mp ワクチン接種後における Mp 特異的 T 細胞応答評価

次に、不活化 Mp と alum を共に皮下ワクチン接種し、T 細胞応答を評価した。2 回免疫後、脾臓を回収し、脾細胞を Mp で再刺激し、培養上清中の IL-13、IFN- γ 、IL-17A を ELISA により測定した。IL-13 は、Th2 型免疫の誘導に伴い産生され、IFN- γ は、Th1 型免疫に伴い産生される。また IL-17A は、Th17 型免疫に伴い産生され、好中球の浸潤に寄与することが報告されている⁹³。その結果、培養上清における IL-13 は、非免疫群、不活化 Mp 免疫群に関わらず、検出不可能であった（データ未記載）。一方で、培養上清における IFN- γ および IL-17A は、非免疫群と比べ、不活化 Mp 免疫群において有意な上昇が認められた (Fig. 22)。以上より、不活化 Mp ワクチン接種は、Mp 特異的 Th1 および Th17 免疫応答の誘導を促進することが示唆された。

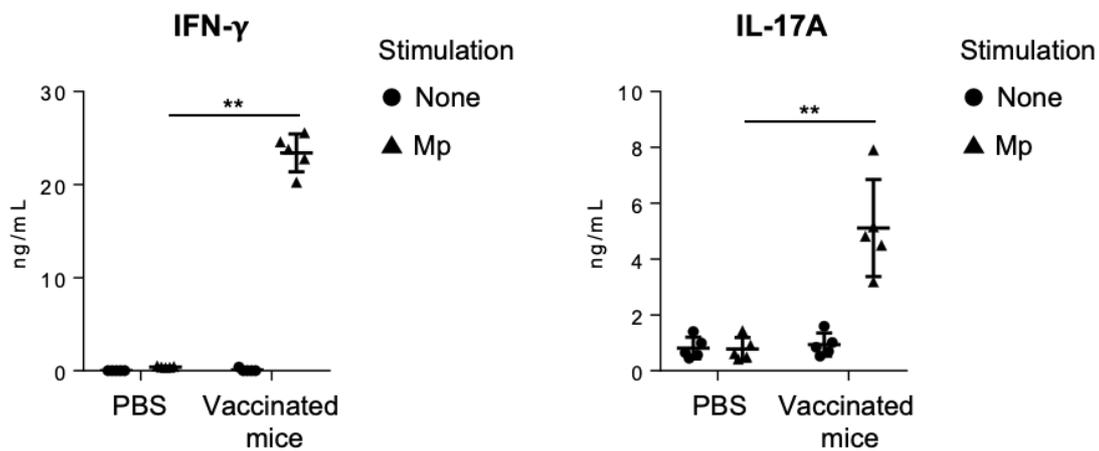


Figure 22. Mp-specific CD4⁺ T-cell response after vaccination. BALB/c mice were vaccinated with PBS or inactivated Mp plus alum. After the last vaccination, splenocytes were cultured in the presence or absence of Mp for 72h, after which the levels of IFN- γ and IL-17A in the supernatant were measured by using ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed three times. $n = 5$ per group. **, Student's t -test were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

不活化 Mp ワクチン接種後の免疫応答における TLR2 の寄与

次に、不活化 Mp ワクチン接種による Mp 特異的 T 細胞応答に TLR2 シグナルが寄与するのかを評価した。まず、 $TLR2^{-/-}$ マウスに不活化 Mp と alum を共に皮下投与し、血漿中における Mp 特異的抗体価を評価した。比較対象として、 $TLR2^{+/+}$ マウスを用いた。その結果、不活化 Mp ワクチン接種により上昇する、血漿中における total IgG は、 $TLR2^{+/+}$ 群と比較して $TLR2^{-/-}$ 群において有意に減少した (Fig. 23a)。さらに、脾細胞を Mp で再刺激したところ、培養上清における IL-17A は、 $TLR2^{+/+}$ 群と比較し、 $TLR2^{-/-}$ 群で有意に低値を示した一方で、 $TLR2^{-/-}$ 群において IFN- γ が高値を示した (Fig. 23b)。以上の結果より、TLR2 シグナルは、不活化 Mp ワクチン接種後の Mp 特異的 Th1 免疫応答の誘導には関与せず、Mp 特異的 Th17 免疫応答の誘導に寄与することを示している。

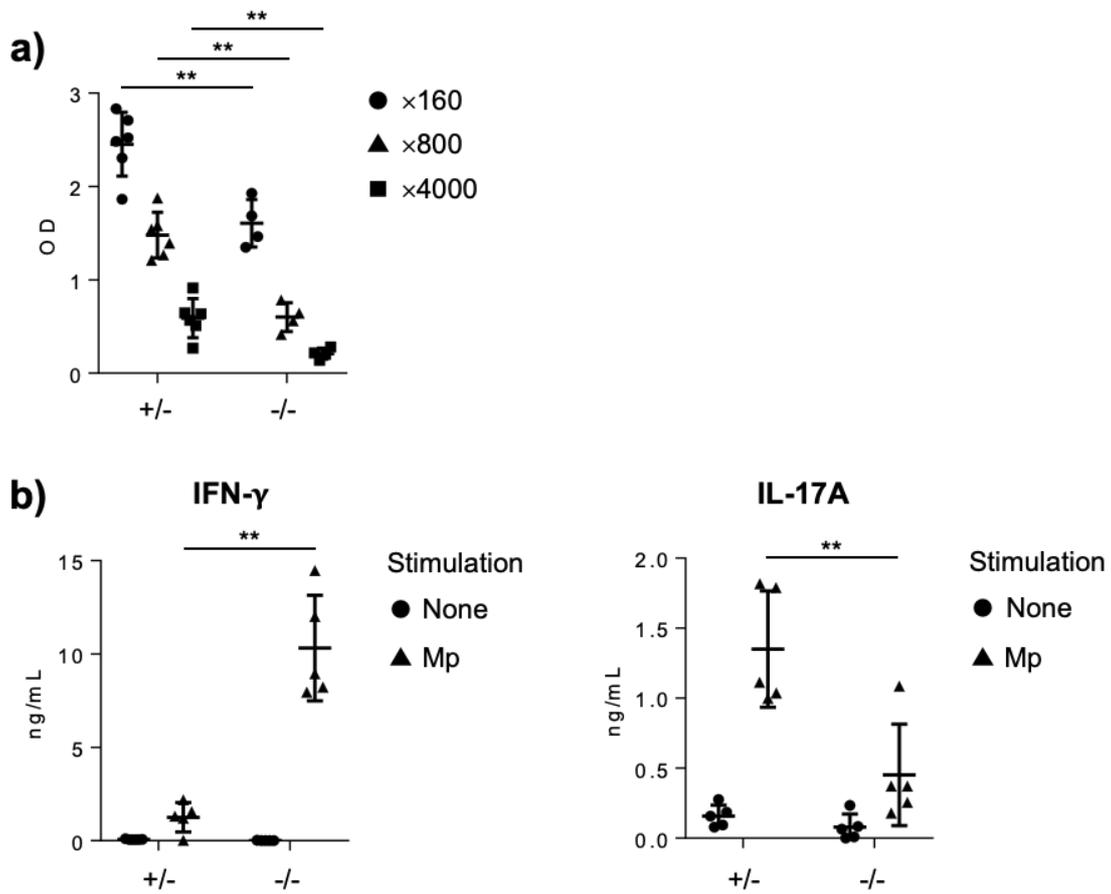


Figure 23. TLR2-mediated immune responses after vaccination. Control TLR2^{+/-} (+/-) and TLR2^{-/-} (-/-) mice were vaccinated with inactivated Mp plus alum. (a) After the last vaccination, the levels of Mp-specific total IgG in plasma were evaluated by using ELISA. We used plasma samples diluted 160- (●), 800- (▲), and 4000- (■) fold. (b) Splenocytes were cultured in the presence or absence of Mp for 72h, after which the levels of IFN- γ and IL-17A in the supernatant were measured by using ELISA. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed four times (a, b). (a) +/-: $n = 6$, -/-: $n = 4$; (b) +/-: $n = 5$, -/-: $n = 5$. Student's t -test (a, b) were used for statistics analysis. ** $P < 0.01$.

不活化 Mp ワクチン接種後の免疫応答における CD4⁺ T 細胞の寄与

次に、不活化 Mp ワクチン接種後の Mp 感染時に認められる好中球浸潤の促進が、Mp 特異的 Th1 および Th17 免疫応答に起因するのかを評価した。不活化 Mp ワクチン接種マウスの CD4⁺ T 細胞 (Th1 および Th17) を除去するため、Mp 感染前に抗 CD4 抗体を腹腔内投与した。その後、Mp を経鼻投与し、肺における炎症を評価した。その結果、アイソタイプ抗体投与群と比較し、抗 CD4 抗体投与群において、不活化 Mp ワクチン接種による免疫細胞数および好中球数の増加が有意に抑制された (Fig. 24a)。一方で、肺胞マクロファージ数には変化がなかった (Fig. 24a)。さらに、肺胞洗浄液中におけるケモカイン量を評価したところ、CXCL5 には変化がなかったものの、CXCL1 および CXCL2 は抗 CD4 抗体投与により有意に減少した (Fig. 24b)。これらの結果は、不活化 Mp ワクチン接種による CD4⁺ T 細胞の誘導が、その後の感染時において好中球浸潤を亢進させることを示唆している。最後に、ナイーブマウスの Mp 感染時における好中球浸潤に CD4⁺ T 細胞が寄与しているのかを評価した。不活化 Mp ワクチン接種マウスとは対照的に、ナイーブマウスにおける肺胞洗浄液中の免疫細胞数、好中球数および肺胞マクロファージ数は、アイソタイプ抗体投与群と抗 CD4 抗体投与群に差は認められなかった (Fig. 25)。以上の結果は、不活化 Mp ワクチン接種により誘導された CD4⁺ T 細胞が好中球の浸潤に寄与することを示している。

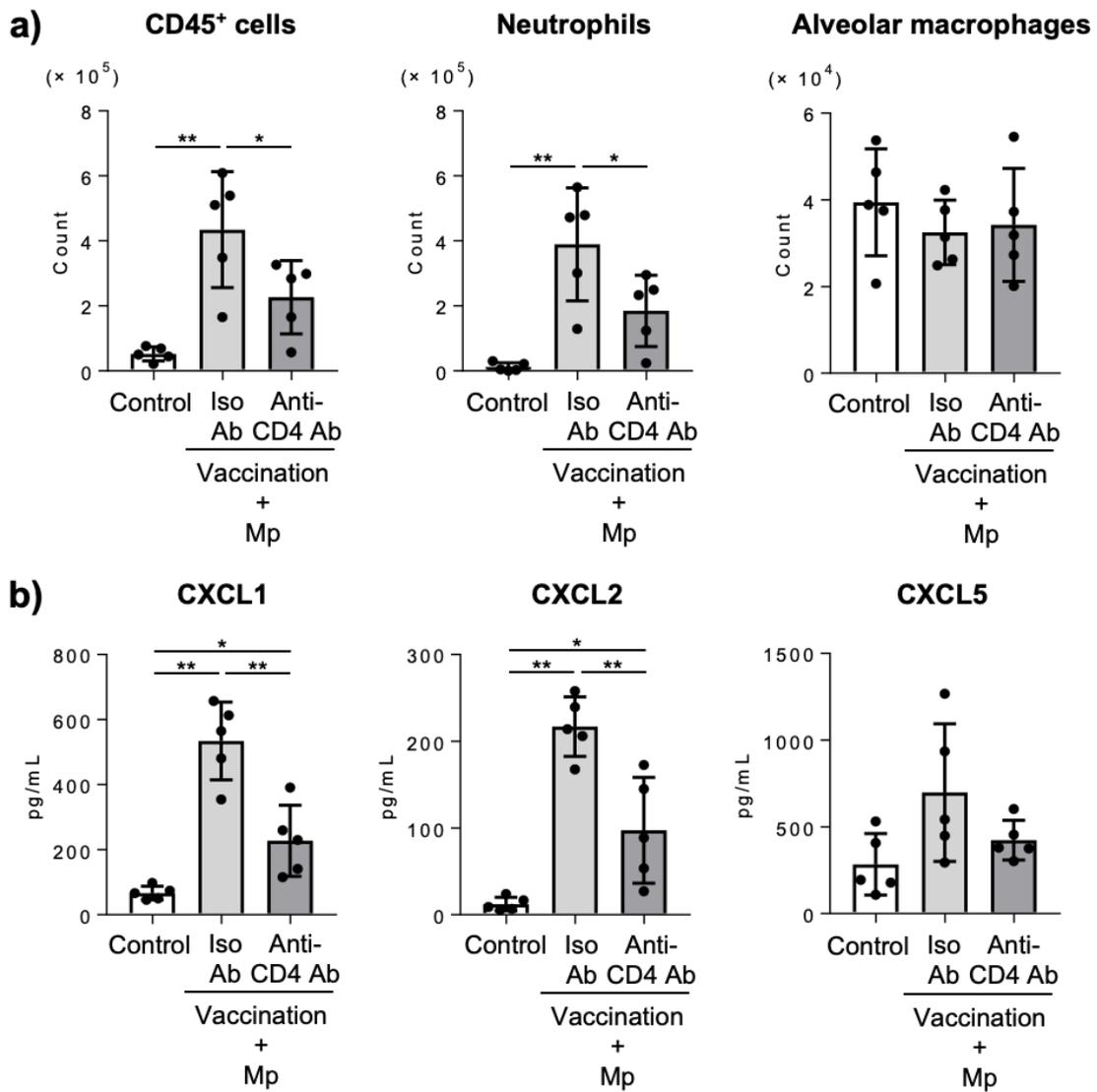


Figure 24. CD4⁺ T cell-dependent neutrophil infiltration in vaccinated mice after subsequent Mp infection. BALB/c mice vaccinated with inactivated Mp plus alum were treated with anti-CD4 or isotype-control antibody (Ab) before Mp infection. (a) The numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻), and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) and (b) the levels of CXCL1, CXCL2, and CXCL5 in BALF harvested the day after Mp infection were evaluated by using flow cytometry (a) and ELISA (b). Mice without Mp challenge were used as controls. Data are shown as means \pm SD. Each experiment was performed twice (b) or three times (a). (a) $n = 5$ per group; (b) $n = 5$ per group. Tukey's test were used for statistics analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

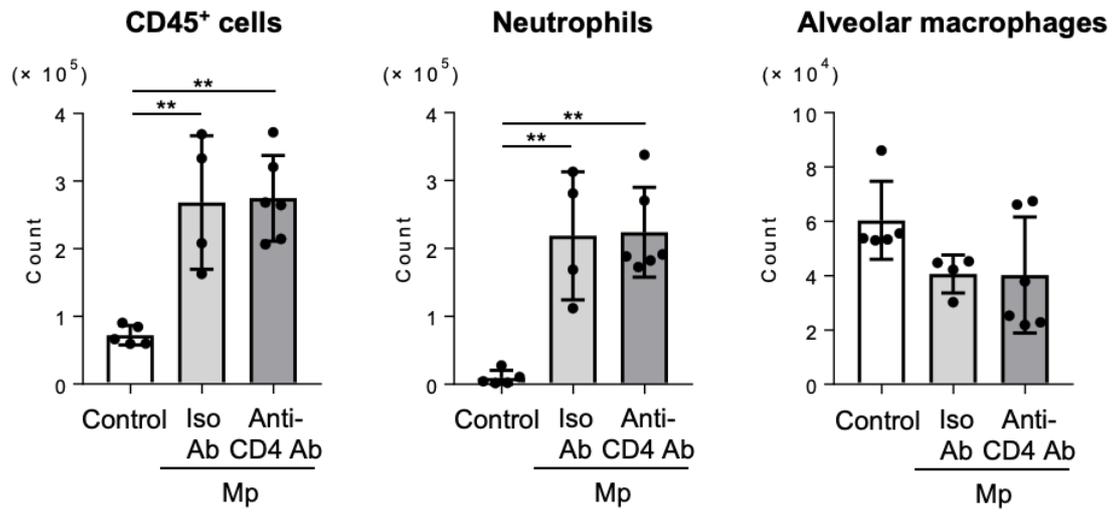


Figure 25. CD4⁺ T-cell-independent neutrophil infiltration in naive mice. Naive BALB/c mice were treated with an anti-CD4 or isotype-control antibody (Ab) before Mp infection. The numbers of CD45⁺ immune cells, neutrophils (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ Siglec-F⁻), and alveolar macrophages (CD45⁺ Ly6G⁻ CD11c⁺ Siglec-F⁺) in BALF harvested the day after Mp infection were evaluated by using flow cytometry. Data are shown as means \pm SD. The experiment was performed twice. Uninfected control: $n = 5$, isotype Ab: $n = 4$, anti-CD4 Ab: $n = 6$. Tukey's test were used for statistics analysis. $**P < 0.01$.

【考察】

一般的にワクチン接種は、抗原特異的な免疫応答を誘導し、病原体の効率的な排除を可能とすることで、病態の重症化を防いだり、あるいは感染の予防を目指せるため重要である。当然、ワクチンに期待される効果は、感染そのものの予防や、より迅速な病原体の排除に基づく重症化の予防、あるいはそれに付随すべき病態（炎症反応を含む）の軽減である。本研究においても、不活化 Mp ワクチン接種により Mp 特異的抗体の誘導を確認し (Fig. 20a)、その後の Mp 感染時における菌量を減少させることが確認できた (Fig. 20b)。一方で、ナイーブマウスへの Mp 感染では、菌量依存的に好中球浸潤が誘導されるものの (Fig. 21b)、ワクチン接種マウスでは、菌量が減少するにも関わらず (Fig. 20b)、好中球浸潤の減少は認められなかった (Fig. 20c)。更なる検討の結果、不活化 Mp ワクチン接種による CD4⁺ T 細胞の誘導が、好中球を誘導するという興味深い知見を得た (Fig. 22, Fig. 24a)。すなわち、このワクチンによる Th1 および Th17 の誘導が、ヒトにおいて観察されたワクチン接種による肺炎悪化の機序の一つであることが考えられた。

Th17 細胞は、IL-17A、IL-17F、IL-21 および IL-22 を誘導することが知られている⁹³。そして、これらサイトカインは、GM-CSF、CXCL1 および CXCL2 を誘導することで、好中球の浸潤や活性化に関連している⁹³。一般に好中球は、感染部位に浸潤することで、細胞外の病原体を排除するため、感染防御に重要な細胞である^{35,102}。すなわち、好中球により排除される *Klebsiella pneumoniae* や *Staphylococcus aureus* を含む病原体に対しては、Th17 細胞は生体内防御に必須であると言える^{103,104}。しかし、Fig. 3a で示したように、好中球が Mp の排除には寄与しないことから、好中球浸潤を促進する Th17 細胞の誘導は、Mp 感染症において有用ではないことが示唆された。これらの報告および結果を総合的に判断すると、不活化 Mp ワクチン接種時において Mp 特異的 Th17 細胞が誘導されたと推察している。しかしながら、本検討では、CD4⁺ T 細胞のサブセットを同定するまでには至っておらず、更なる検討を行う必要がある。また、遺伝子背景の異なるマウスを用いた第二節の検討において、遺伝子背景の差異が後の免疫応答に影響を与えることを示している。そのため、遺伝子背景の異なるマウスを用いて、不活化 Mp ワクチン接種による免疫応答の違いを比較検討することで、不活化 Mp ワクチン接種に起因した肺炎悪化メカニズムをより詳細に解明することができるかもしれない。

結論

過去の流行期におけるマクロライド耐性 Mp の出現は、医療現場における診断を混乱させ、治療薬の選択を限局させた。日本においては、2001年に検出されたことを皮切りに¹⁰⁵、年々徐々に増加し続け、2011年の流行時において、マクロライド耐性 Mp の割合が検査検体の約70%を超えていたものの²¹、現在では減少傾向にある^{21,106}。Mp は、気道上皮細胞に接着する際に重要な役割を果たす P1 の遺伝子型により、1型と2型に大別され¹⁰⁷、流行期における P1 の遺伝子型が数年間隔で交代する現象が日本のみならず、世界各国で報告されている^{108,109}。また、1型はマクロライド抗菌薬に対して耐性化しやすく、逆に2型の耐性率は低いことが知られており、マクロライド耐性 Mp が出現、流行した年において、ほとんどの検体から1型が分離されている^{21,106}。一方で、近年、1型の減少に伴い、2型の増加が確認されており²¹、マクロライド耐性 Mp の割合が減少傾向にあることと一致する。現在、我が国におけるマクロライド耐性 Mp の検出率は減少傾向にはあるものの、数年間隔での流行や P1 の遺伝子型の交代など、Mp 特有の特徴を考慮すると、今後、マクロライド耐性 Mp が猛威を振るう可能性は大いにあり得る。その際、第二選択薬の安易な使用は、副作用の観点のみならず、新たな耐性菌を生み出すことにも繋がるため、適切な抗菌薬の使用が望まれる。さらに、*in vitro* の検討ではあるものの、Mp がキノロン系抗菌薬に対する耐性を獲得する可能性があることが報告されており¹¹⁰、さらに治療薬の選択が限局されることが予想されるため、新規抗炎症薬やワクチンの開発が待望される。そこで本研究では、それら開発の障壁となっている Mp 肺炎の炎症惹起メカニズムの解明を図ると共に、ワクチン接種による肺炎悪化メカニズムの解明を試み、以下の結論を得た。

1. Mp 感染時における炎症惹起に IL-1 α 、IL-12 p40 および CARDS toxin が寄与することを示し、Mp 肺炎の治療標的として有用である可能性を明らかとした。
2. DBA/2 マウスは、Mp 感染症に対して高感受性であり、Mp 感染時の病態を評価する上で有用なモデルマウスとなり得る。
3. Mp に対するワクチン開発を遂行する上で、Mp 特異的 Th17 免疫応答を誘導するワクチン抗原およびアジュバントは回避する必要があることを明らかとした。

以上、本結果は、Mp に対する安全で有効な新規抗炎症薬やワクチンの開発に向けた基盤情報となり得るものと期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院 薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野 特任教授 吉岡靖雄先生には、御指導、御鞭撻を賜ると共に、終始御配慮賜りました。ここに、衷心より感謝の意を表します。

大阪大学大学院 薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野 特任講師 平井敏郎先生には、研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導と御助言を賜り、大変お世話になりました。この場をお借りして、心より御礼申し上げます。

本稿を纏めるにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました、大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 教授 藤尾 慈先生、および同研究科 生体応答制御学分野 教授 齊藤達哉先生に心より御礼申し上げます。

研究に際し、様々な専門的技術指導と共に、温かいサポートをいただきました兵庫医科大学 免疫学講座 教授 黒田悦史先生、一般財団法人阪大微生物病研究会 研究員 鈴木孝一郎先生に心より御礼申し上げます。

加えて、本研究を遂行するにあたり、昼夜共に汗を流しました、吉川英佑学士に厚く御礼申し上げます。

加えて、本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂きました、大阪大学微生物病研究所 事務員 稲中雅子様心より御礼申し上げますと共に、研究生活を送るにあたり、終始共に励まし合い、支え合った松田鉄平学士、河合惇志修士をはじめとする大阪大学大学院 薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野の院生、学生の皆様に謹んで感謝申し上げます。

最後に、在学中の経済的援助を賜りました、日本薬学会（長井記念薬学研究奨励支援事業）、また、常に温かく見守り支えてくれた妻、子、両親に心から感謝致します。

参考文献

- 1 Wilson, M. H. & Collier, A. M. Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. *Journal of bacteriology* **125**, 332-339, doi:10.1128/JB.125.1.332-339.1976 (1976).
- 2 Waites, K. B., Xiao, L., Liu, Y., Balish, M. F. & Atkinson, T. P. *Mycoplasma pneumoniae* from the Respiratory Tract and Beyond. *Clinical microbiology reviews* **30**, 747-809, doi:10.1128/CMR.00114-16 (2017).
- 3 Lindsey, J. R. & Cassell, H. Experimental *Mycoplasma pulmonis* infection in pathogen-free mice. Models for studying mycoplasmosis of the respiratory tract. *The American journal of pathology* **72**, 63-90 (1973).
- 4 Lin, J. H., Chen, S. P., Yeh, K. S. & Weng, C. N. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Veterinary microbiology* **115**, 111-116, doi:10.1016/j.vetmic.2006.02.004 (2006).
- 5 Parker, A. M., Sheehy, P. A., Hazelton, M. S., Bosward, K. L. & House, J. K. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of veterinary internal medicine* **32**, 1241-1252, doi:10.1111/jvim.15135 (2018).
- 6 Horner, P. J. & Martin, D. H. *Mycoplasma genitalium* Infection in Men. *The Journal of infectious diseases* **216**, S396-S405, doi:10.1093/infdis/jix145 (2017).
- 7 Mardh, P. A. *Mycoplasma hominis* infection of the central nervous system in newborn infants. *Sexually transmitted diseases* **10**, 331-334 (1983).
- 8 Parrott, G. L., Kinjo, T. & Fujita, J. A Compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in microbiology* **7**, 513, doi:10.3389/fmicb.2016.00513 (2016).
- 9 Foy, H. M., Kenny, G. E., Cooney, M. K. & Allan, I. D. Long-term epidemiology of infections with *Mycoplasma pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases* **139**, 681-687, doi:10.1093/infdis/139.6.681 (1979).
- 10 Jain, S. *et al.* Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *The New England journal of medicine* **372**, 835-845, doi:10.1056/NEJMoa1405870 (2015).
- 11 Zhao, C., Liu, J., Yang, H., Xiang, L. & Zhao, S. *Mycoplasma pneumoniae*-Associated Bronchiolitis Obliterans Following Acute Bronchiolitis. *Scientific reports* **7**, 8478, doi:10.1038/s41598-017-08861-7 (2017).
- 12 Tanaka, H. Correlation between Radiological and Pathological Findings in Patients with *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia. *Frontiers in microbiology* **7**, 695, doi:10.3389/fmicb.2016.00695 (2016).

- 13 Waites, K. B. & Talkington, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clinical microbiology reviews* **17**, 697-728, table of contents, doi:10.1128/CMR.17.4.697-728.2004 (2004).
- 14 Atkinson, T. P., Balish, M. F. & Waites, K. B. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS microbiology reviews* **32**, 956-973, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00129.x (2008).
- 15 Lamoth, F. & Greub, G. Fastidious intracellular bacteria as causal agents of community-acquired pneumonia. *Expert review of anti-infective therapy* **8**, 775-790, doi:10.1586/eri.10.52 (2010).
- 16 Ozel, C. *et al.* [*Mycoplasma Pneumoniae*-Induced Meningoencephalitis]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* **83**, 392-396, doi:10.1055/s-0035-1553233 (2015).
- 17 Atkinson, T. P. & Waites, K. B. *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Childhood. *The Pediatric infectious disease journal* **33**, 92-94, doi:10.1097/INF.0000000000000171 (2014).
- 18 Fan, Q. *et al.* Pathogenesis and association of *Mycoplasma pneumoniae* infection with cardiac and hepatic damage. *Microbiology and immunology* **59**, 375-380, doi:10.1111/1348-0421.12267 (2015).
- 19 Meyer Sauter, P. M. *et al.* Infection with and Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in Children. *Frontiers in microbiology* **7**, 329, doi:10.3389/fmicb.2016.00329 (2016).
- 20 Zhao, F. *et al.* Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China, from 2008 to 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 1521-1523, doi:10.1128/AAC.02060-12 (2013).
- 21 Katsukawa, C., Kenri, T., Shibayama, K. & Takahashi, K. Genetic characterization of *Mycoplasma pneumoniae* isolated in Osaka between 2011 and 2017: Decreased detection rate of macrolide-resistance and increase of p1 gene type 2 lineage strains. *PloS one* **14**, e0209938, doi:10.1371/journal.pone.0209938 (2019).
- 22 Sanchez, A. R., Rogers, R. S., 3rd & Sheridan, P. J. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *International journal of dermatology* **43**, 709-715, doi:10.1111/j.1365-4632.2004.02108.x (2004).
- 23 Adefurin, A., Sammons, H., Jacqz-Aigrain, E. & Choonara, I. Ciprofloxacin safety in paediatrics: a systematic review. *Archives of disease in childhood* **96**, 874-

- 880, doi:10.1136/adc.2010.208843 (2011).
- 24 Oishi, T. *et al.* Clinical implications of interleukin-18 levels in pediatric patients with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* **17**, 803-806, doi:10.1007/s10156-011-0265-7 (2011).
- 25 Shimizu, T. Inflammation-inducing Factors of *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in microbiology* **7**, 414, doi:10.3389/fmicb.2016.00414 (2016).
- 26 Takeuchi, O. *et al.* Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of immunology* **164**, 554-557, doi:10.4049/jimmunol.164.2.554 (2000).
- 27 Chen, Z. *et al.* Role of the *Mycoplasma pneumoniae*/Interleukin-8/Neutrophil Axis in the Pathogenesis of Pneumonia. *PloS one* **11**, e0146377, doi:10.1371/journal.pone.0146377 (2016).
- 28 Mashimoto, H. *et al.* [Acute bronchiolitis due to *Mycoplasma pneumoniae* and successfully treated with steroids]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai zasshi* **34**, 1277-1282 (1996).
- 29 Smith, C. B., Chanock, R. M., Friedewald, W. T. & Alford, R. H. *Mycoplasma pneumoniae* infections in volunteers. *Annals of the New York Academy of Sciences* **143**, 471-483, doi:10.1111/j.1749-6632.1967.tb27691.x (1967).
- 30 Smith, C. B., Friedewald, W. T. & Chanock, R. M. Inactivated *Mycoplasma pneumoniae* vaccine. Evaluation in volunteers. *Jama* **199**, 353-358 (1967).
- 31 Chiang, W. C. *et al.* Epidemiology, clinical characteristics and antimicrobial resistance patterns of community-acquired pneumonia in 1702 hospitalized children in Singapore. *Respirology* **12**, 254-261, doi:10.1111/j.1440-1843.2006.01036.x (2007).
- 32 Okada, T. *et al.* A practical approach estimating etiologic agents using real-time PCR in pediatric inpatients with community-acquired pneumonia. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* **18**, 832-840, doi:10.1007/s10156-012-0422-7 (2012).
- 33 Oishi, T. *et al.* Comparing Antimicrobial Susceptibilities among *Mycoplasma pneumoniae* Isolates from Pediatric Patients in Japan between Two Recent Epidemic Periods. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **63**, doi:10.1128/AAC.02517-18 (2019).
- 34 Saraya, T. *et al.* Identification of a mechanism for lung inflammation caused by

- Mycoplasma pneumoniae using a novel mouse model. *Results in immunology* **1**, 76-87, doi:10.1016/j.rinim.2011.11.001 (2011).
- 35 Looney, M. R. & Matthay, M. A. Neutrophil sandwiches injure the microcirculation. *Nature medicine* **15**, 364-366, doi:10.1038/nm0409-364 (2009).
- 36 Yamamoto, T., Kida, Y., Sakamoto, Y. & Kuwano, K. Mpn491, a secreted nuclease of Mycoplasma pneumoniae, plays a critical role in evading killing by neutrophil extracellular traps. *Cellular microbiology* **19**, doi:10.1111/cmi.12666 (2017).
- 37 Lai, J. F. et al. Critical role of macrophages and their activation via MyD88-NFkappaB signaling in lung innate immunity to Mycoplasma pneumoniae. *PloS one* **5**, e14417, doi:10.1371/journal.pone.0014417 (2010).
- 38 Shimizu, T. et al. Cytadherence of Mycoplasma pneumoniae induces inflammatory responses through autophagy and toll-like receptor 4. *Infection and immunity* **82**, 3076-3086, doi:10.1128/IAI.01961-14 (2014).
- 39 Kannan, T. R. & Baseman, J. B. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of Mycoplasma pneumoniae represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6724-6729, doi:10.1073/pnas.0510644103 (2006).
- 40 Li, G. et al. High co-expression of TNF-alpha and CARDS toxin is a good predictor for refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia. *Molecular medicine* **25**, 38, doi:10.1186/s10020-019-0105-2 (2019).
- 41 Hardy, R. D. et al. Analysis of pulmonary inflammation and function in the mouse and baboon after exposure to Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin. *PloS one* **4**, e7562, doi:10.1371/journal.pone.0007562 (2009).
- 42 Medina, J. L. et al. Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **46**, 815-822, doi:10.1165/rcmb.2011-0135OC (2012).
- 43 Kannan, T. R. et al. Synthesis and distribution of CARDS toxin during Mycoplasma pneumoniae infection in a murine model. *The Journal of infectious diseases* **204**, 1596-1604, doi:10.1093/infdis/jir557 (2011).
- 44 Kannan, T. R. et al. Mycoplasma pneumoniae Community Acquired Respiratory Distress Syndrome toxin expression reveals growth phase and infection-dependent regulation. *Molecular microbiology* **76**, 1127-1141, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07092.x (2010).
- 45 Forman, H. J. & Torres, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory

- burst in macrophage signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine* **166**, S4-8, doi:10.1164/rccm.2206007 (2002).
- 46 Prasad, S., Gupta, S. C. & Tyagi, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer letters* **387**, 95-105, doi:10.1016/j.canlet.2016.03.042 (2017).
- 47 Camhi, S. L., Lee, P. & Choi, A. M. The oxidative stress response. *New horizons* **3**, 170-182 (1995).
- 48 Sato, N. *et al.* Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *Journal of immunology* **154**, 3194-3203 (1995).
- 49 Jabs, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical pharmacology* **57**, 231-245, doi:10.1016/s0006-2952(98)00227-5 (1999).
- 50 Bose, S. *et al.* ADP-ribosylation of NLRP3 by *Mycoplasma pneumoniae* CARD8 toxin regulates inflammasome activity. *mBio* **5**, doi:10.1128/mBio.02186-14 (2014).
- 51 He, J. *et al.* Insights into the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* (Review). *Molecular medicine reports* **14**, 4030-4036, doi:10.3892/mmr.2016.5765 (2016).
- 52 Ichikawa, S., Miyake, M., Fujii, R. & Konishi, Y. MyD88 associated ROS generation is crucial for *Lactobacillus* induced IL-12 production in macrophage. *PloS one* **7**, e35880, doi:10.1371/journal.pone.0035880 (2012).
- 53 Yang, C. S. *et al.* ASK1-p38 MAPK-p47phox activation is essential for inflammatory responses during tuberculosis via TLR2-ROS signalling. *Cellular microbiology* **10**, 741-754, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01081.x (2008).
- 54 Kuroda, E. *et al.* Inhaled Fine Particles Induce Alveolar Macrophage Death and Interleukin-1alpha Release to Promote Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation. *Immunity* **45**, 1299-1310, doi:10.1016/j.immuni.2016.11.010 (2016).
- 55 Garlanda, C., Dinarello, C. A. & Mantovani, A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39**, 1003-1018, doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010 (2013).
- 56 Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F. & Kono, H. The sterile inflammatory response. *Annual review of immunology* **28**, 321-342, doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101311 (2010).

- 57 Suwara, M. I. *et al.* IL-1alpha released from damaged epithelial cells is sufficient and essential to trigger inflammatory responses in human lung fibroblasts. *Mucosal immunology* **7**, 684-693, doi:10.1038/mi.2013.87 (2014).
- 58 Caffrey, A. K. *et al.* IL-1alpha signaling is critical for leukocyte recruitment after pulmonary *Aspergillus fumigatus* challenge. *PLoS pathogens* **11**, e1004625, doi:10.1371/journal.ppat.1004625 (2015).
- 59 Eigenbrod, T., Park, J. H., Harder, J., Iwakura, Y. & Nunez, G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *Journal of immunology* **181**, 8194-8198, doi:10.4049/jimmunol.181.12.8194 (2008).
- 60 Lauw, F. N. *et al.* Interleukin-12 induces sustained activation of multiple host inflammatory mediator systems in chimpanzees. *The Journal of infectious diseases* **179**, 646-652, doi:10.1086/314636 (1999).
- 61 Roark, C. L., Simonian, P. L., Fontenot, A. P., Born, W. K. & O'Brien, R. L. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Current opinion in immunology* **20**, 353-357, doi:10.1016/j.coi.2008.03.006 (2008).
- 62 Wu, Q. *et al.* IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes and infection* **9**, 78-86, doi:10.1016/j.micinf.2006.10.012 (2007).
- 63 Fettelschoss, A. *et al.* Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18055-18060, doi:10.1073/pnas.1109176108 (2011).
- 64 Guo, L., Liu, F., Lu, M. P., Zheng, Q. & Chen, Z. M. Increased T cell activation in BALF from children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Pediatric pulmonology* **50**, 814-819, doi:10.1002/ppul.23095 (2015).
- 65 De Simone, M. *et al.* Host genetic background influences the response to the opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* infection altering cell-mediated immunity and bacterial replication. *PloS one* **9**, e106873, doi:10.1371/journal.pone.0106873 (2014).
- 66 Spagnuolo, L. *et al.* The host genetic background defines diverse immune-reactivity and susceptibility to chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection. *Scientific reports* **6**, 36924, doi:10.1038/srep36924 (2016).
- 67 Lore, N. I., Cigana, C., Sipione, B. & Bragonzi, A. The impact of host genetic

- background in the *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **29**, 550-557, doi:10.1007/s00335-018-9753-8 (2018).
- 68 Davis, J. K. *et al.* Strain differences in susceptibility to murine respiratory mycoplasmosis in C57BL/6 and C3H/HeN mice. *Infection and immunity* **50**, 647-654, doi:10.1128/IAI.50.3.647-654.1985 (1985).
- 69 Boonyarattanasoonthorn, T., Elewa, Y. H. A., Tag-El-Din-Hassan, H. T., Morimatsu, M. & Agui, T. Profiling of cellular immune responses to *Mycoplasma pulmonis* infection in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **73**, 55-65, doi:10.1016/j.meegid.2019.04.019 (2019).
- 70 Faulkner, C. B. *et al.* Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute *Mycoplasma pulmonis* disease. *Infection and immunity* **63**, 4084-4090, doi:10.1128/IAI.63.10.4084-4090.1995 (1995).
- 71 Blotz, C., Singh, N., Dumke, R. & Stulke, J. Characterization of an Immunoglobulin Binding Protein (IbpM) From *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in microbiology* **11**, 685, doi:10.3389/fmicb.2020.00685 (2020).
- 72 Gosselin, D. *et al.* Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* **63**, 3272-3278, doi:10.1128/IAI.63.9.3272-3278.1995 (1995).
- 73 Wilson, K. R., Napper, J. M., Denvir, J., Sollars, V. E. & Yu, H. D. Defect in early lung defence against *Pseudomonas aeruginosa* in DBA/2 mice is associated with acute inflammatory lung injury and reduced bactericidal activity in naive macrophages. *Microbiology* **153**, 968-979, doi:10.1099/mic.0.2006/002261-0 (2007).
- 74 Yadav, J. S. *et al.* Multigenic control and sex bias in host susceptibility to spore-induced pulmonary anthrax in mice. *Infection and immunity* **79**, 3204-3215, doi:10.1128/IAI.01389-10 (2011).
- 75 Cerquetti, M. C., Sordelli, D. O., Ortegon, R. A. & Bellanti, J. A. Impaired lung defenses against *Staphylococcus aureus* in mice with hereditary deficiency of the fifth component of complement. *Infection and immunity* **41**, 1071-1076, doi:10.1128/IAI.41.3.1071-1076.1983 (1983).
- 76 Whaley, K. & Schwaeble, W. Complement and complement deficiencies. *Seminars in liver disease* **17**, 297-310, doi:10.1055/s-2007-1007206 (1997).

- 77 Wood, A. J. T., Vassallo, A., Summers, C., Chilvers, E. R. & Conway-Morris, A. C5a anaphylatoxin and its role in critical illness-induced organ dysfunction. *European journal of clinical investigation* **48**, e13028, doi:10.1111/eci.13028 (2018).
- 78 Czermak, B. J. *et al.* Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nature medicine* **5**, 788-792, doi:10.1038/10512 (1999).
- 79 Rittirsch, D. *et al.* Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nature medicine* **14**, 551-557, doi:10.1038/nm1753 (2008).
- 80 Wetsel, R. A., Fleischer, D. T. & Haviland, D. L. Deficiency of the murine fifth complement component (C5). A 2-base pair gene deletion in a 5'-exon. *The Journal of biological chemistry* **265**, 2435-2440 (1990).
- 81 Fels, A. O. & Cohn, Z. A. The alveolar macrophage. *Journal of applied physiology* **60**, 353-369, doi:10.1152/jappl.1986.60.2.353 (1986).
- 82 Arredouani, M. *et al.* The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *The Journal of experimental medicine* **200**, 267-272, doi:10.1084/jem.20040731 (2004).
- 83 Arredouani, M. S. *et al.* MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. *Journal of immunology* **175**, 6058-6064, doi:10.4049/jimmunol.175.9.6058 (2005).
- 84 Liu, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Yajima, T. & Yoshikai, Y. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infection and immunity* **70**, 6638-6645, doi:10.1128/iai.70.12.6638-6645.2002 (2002).
- 85 Croxford, A. L., Kulig, P. & Becher, B. IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine & growth factor reviews* **25**, 415-421, doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.017 (2014).
- 86 Bosmann, M., Sarma, J. V., Atefi, G., Zetoune, F. S. & Ward, P. A. Evidence for anti-inflammatory effects of C5a on the innate IL-17A/IL-23 axis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 1640-1651, doi:10.1096/fj.11-199216 (2012).
- 87 Lajoie, S. *et al.* Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nature immunology* **11**, 928-935, doi:10.1038/ni.1926 (2010).
- 88 Chu, H. W. *et al.* Repeated respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infections in mice: effect of host genetic background. *Microbes and infection* **8**, 1764-1772,

- doi:10.1016/j.micinf.2006.02.014 (2006).
- 89 Cimolai, N., Mah, D. G., Taylor, G. P. & Morrison, B. J. Bases for the early immune response after rechallenge or component vaccination in an animal model of acute *Mycoplasma pneumoniae* pneumonitis. *Vaccine* **13**, 305-309, doi:10.1016/0264-410x(95)93318-4 (1995).
- 90 Fernald, G. W., Collier, A. M. & Clyde, W. A., Jr. Respiratory infections due to *Mycoplasma pneumoniae* in infants and children. *Pediatrics* **55**, 327-335 (1975).
- 91 Dobbs, N. A., Odeh, A. N., Sun, X. & Simecka, J. W. The Multifaceted Role of T Cell-Mediated Immunity in Pathogenesis and Resistance to *Mycoplasma* Respiratory Disease. *Current trends in immunology* **10**, 1-19 (2009).
- 92 Yang, M., Meng, F., Gao, M., Cheng, G. & Wang, X. Cytokine signatures associate with disease severity in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Scientific reports* **9**, 17853, doi:10.1038/s41598-019-54313-9 (2019).
- 93 Way, E. E., Chen, K. & Kolls, J. K. Dysregulation in lung immunity - the protective and pathologic Th17 response in infection. *European journal of immunology* **43**, 3116-3124, doi:10.1002/eji.201343713 (2013).
- 94 Wang, X. *et al.* Increased Frequency of Th17 Cells in Children With *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia. *Journal of clinical laboratory analysis* **30**, 1214-1219, doi:10.1002/jcla.22005 (2016).
- 95 Zhao, J., Ji, X., Wang, Y. & Wang, X. Clinical Role of Serum Interleukin-17A in the Prediction of Refractory *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia in Children. *Infection and drug resistance* **13**, 835-843, doi:10.2147/IDR.S240034 (2020).
- 96 Hausner, M., Schamberger, A., Naumann, W., Jacobs, E. & Dumke, R. Development of protective anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies after immunization of guinea pigs with the combination of a P1-P30 chimeric recombinant protein and chitosan. *Microbial pathogenesis* **64**, 23-32, doi:10.1016/j.micpath.2013.07.004 (2013).
- 97 Zhu, C. *et al.* Protective immune responses in mice induced by intramuscular and intranasal immunization with a *Mycoplasma pneumoniae* P1C DNA vaccine. *Canadian journal of microbiology* **58**, 644-652, doi:10.1139/w2012-041 (2012).
- 98 Mogabgab, W. J. Efficacy of inactivated *Mycoplasma pneumoniae* vaccine demonstrated by protection in large field trials. *Annals of the New York Academy of Sciences* **225**, 453-461, doi:10.1111/j.1749-6632.1973.tb45669.x (1973).
- 99 Mogabgab, W. J. Acute respiratory illnesses in university (1962-1966), military and industrial (1962-1963) populations. *The American review of respiratory*

- disease **98**, 359-379, doi:10.1164/arrd.1968.98.3.359 (1968).
- 100 Cimolai, N., Cheong, A. C., Morrison, B. J. & Taylor, G. P. Mycoplasma pneumoniae reinfection and vaccination: protective oral vaccination and harmful immunoreactivity after re-infection and parenteral immunization. *Vaccine* **14**, 1479-1483, doi:10.1016/s0264-410x(96)00068-0 (1996).
- 101 Szczepanek, S. M. *et al.* Vaccination of BALB/c mice with an avirulent Mycoplasma pneumoniae P30 mutant results in disease exacerbation upon challenge with a virulent strain. *Infection and immunity* **80**, 1007-1014, doi:10.1128/IAI.06078-11 (2012).
- 102 Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 103 Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of experimental medicine* **194**, 519-527, doi:10.1084/jem.194.4.519 (2001).
- 104 Kudva, A. *et al.* Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *Journal of immunology* **186**, 1666-1674, doi:10.4049/jimmunol.1002194 (2011).
- 105 Okazaki, N. *et al.* Characteristics of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiology and immunology* **45**, 617-620, doi:10.1111/j.1348-0421.2001.tb01293.x (2001).
- 106 Suzuki, Y. *et al.* Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis of Mycoplasma pneumoniae Isolates between 2004 and 2014 in Yamagata, Japan: Change in Molecular Characteristics during an 11-year Period. *Japanese journal of infectious diseases* **70**, 642-646, doi:10.7883/yoken.JJID.2017.276 (2017).
- 107 Sasaki, T. *et al.* Epidemiological study of Mycoplasma pneumoniae infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. *Journal of clinical microbiology* **34**, 447-449, doi:10.1128/JCM.34.2.447-449.1996 (1996).
- 108 Kawai, Y. *et al.* Nationwide surveillance of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae infection in pediatric patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 4046-4049, doi:10.1128/AAC.00663-13 (2013).
- 109 Dumke, R., Catrein, I., Pirkil, E., Herrmann, R. & Jacobs, E. Subtyping of

Mycoplasma pneumoniae isolates based on extended genome sequencing and on expression profiles. *International journal of medical microbiology : IJMM* **292**, 513-525, doi:10.1078/1438-4221-00231 (2003).

- 110 Gruson, D. *et al.* In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma hominis, respectively. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 1190-1193, doi:10.1128/AAC.49.3.1190-1193.2005 (2005).