OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	細菌性髄膜炎の発症につながる細菌の新規脳伝播機構の解明
Author(s)	高原, 悠樹
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91847
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　高原　悠樹　）	
論文題名	細菌性髄膜炎の発症につながる細菌の新規脳伝播機構の解明

論文内容の要旨

【研究目的】

細菌性髄膜炎は口腔鼻咽頭粘膜に定着する細菌が重症肺炎を契機として、血行性に血液脳関門を介して、髄膜へ伝播することにより発症すると推察されている。本疾患の治療には、髄液移行性が高い抗菌薬の静脈内投与が推奨されているが、依然として致死率や後遺症発生率は高く、病態生理に基づく感染制御法の確立が求められている。細菌性髄膜炎の臨床病理像に鑑みて、鼻咽腔に定着する *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) は血液脳関門を通過せず、嗅粘膜上皮中の嗅神経の軸索を介して非血行性に脳内へ到達すると仮定した。本研究では、細菌性髄膜炎の発症につながる細菌の新規伝播経路を解析することを目的とした。

【材料および方法】

1.　肺炎球菌性髄膜炎マウスモデルの構築

中耳炎由来の *S. pneumoniae* EF3030 株 (血清型 19F) を 5〜6 週齢の Balb/c 雌マウスの鼻腔内に感染させ、肺炎球菌性髄膜炎マウスモデルを構築した。感染 1、3、7 日後に安楽死させ、鼻粘膜上皮と脳組織 (嗅球、大脳、小脳)、肺、血液を採取し、組織ホモジネート中の菌数測定を行い、細菌の脳組織への伝播を検証した。また、抗 *S. pneumoniae* 莢膜抗体と抗嗅覚マーカー抗体を用いた免疫蛍光染色法により、鼻腔に定着した *S. pneumoniae* が嗅神経を介して脳組織へ伝播する現象を検討した。

2.　肺炎球菌の脳伝播に関与する細菌因子の解析

EF3030 株を親株として、コンピテンス刺激ペプチドを用いた相同組換えにより、細胞溶解毒素の産生を担うニューモライシン (PLY) をコードする *ply* 遺伝子欠失株と再導入株を作製した。上記 1 と同様に、*S. pneumoniae* をマウスの鼻腔内に感染させ、脳組織への各菌株の伝播を検討した。また、PLY の膜傷害活性を有する組換えタンパク質 (rPLY-WT) と膜傷害活性を低下させた PLY の変異体 (rPLY-W433F) を作製し、*ply* 欠失株感染の24 時間前にマウスの鼻腔内へ投与した。感染 3 日後に、鼻粘膜上皮と脳組織を採取し、PLY の膜傷害活性が *ply* 欠失株の脳伝播能へ及ぼす影響を検討した。

3.　鼻粘膜上皮バリアの傷害に関与する宿主因子の解析

S. pneumoniae の野生株、*ply* 欠失株、再導入株をマウスの鼻腔内にそれぞれ感染させ、感染 3 日後に鼻腔洗

浄液を採取した。採取した鼻腔洗浄液から RNA を抽出し、cDNA を合成した後、Gli1 遺伝子、Snail1 遺伝子、ならびに E-カドヘリン遺伝子の転写量を定量的 RT-PCR 法により解析した。

【結果および考察】

1. 本研究で構築した肺炎球菌性髄膜炎マウスモデルでは、感染 1 日後より鼻腔からの距離依存的に脳組織の嗅球、大脳、小脳から細菌が検出された。一方で、感染 1 日後のマウス肺組織では細菌が検出されたが、時間経過とともにこれらの細菌は排除された。また、感染マウスの血液から細菌は検出されなかった。これらの結果から、鼻粘膜に定着した *S. pneumoniae* は重症肺炎を引き起こさず、非血行性に脳組織へ伝播することが示唆された。野生株感染マウスの脳組織の免疫蛍光染色像から、鼻粘膜上皮への細菌の定着と嗅神経への局在、ならびに脳の嗅球、大脳および小脳への伝播が観察された。以上の結果から、鼻粘膜上皮に定着した *S. pneumoniae* は嗅神経を介して脳組織へ伝播することが示唆された。

2. *S. pneumoniae* の脳組織への伝播能は、*ply* 遺伝子の欠失により有意に低下したが、*ply* 欠失株への *ply* 遺伝子の再導入により野生株と同程度にまで回復した。また、組換え PLY (rPLY-WT) の経鼻投与により、*ply* 欠失株の脳伝播能は有意に上昇したが、膜傷害活性を欠失させた rPLY-W433F を投与した場合、非投与群と同程度であった。これらの結果から、PLYの膜傷害活性が鼻粘膜上皮に定着した *S. pneumoniae* の脳組織への伝播に寄与することが示唆された。

3. 野生株感染マウスの鼻粘膜上皮では、非感染群と比較して、細胞間接着分子群の転写を抑制する Gli1 遺伝子と Snail1 遺伝子の発現上昇と上皮バリアの恒常性を担う E-カドヘリン遺伝子の発現低下を認めたが、*ply* 欠失株感染群では非感染群と同程度であった。一方で、*ply* 再導入株を感染させたマウスの鼻腔粘膜上皮における Snail1 遺伝子と E-カドヘリン遺伝子の発現は、野生株と同程度まで回復した。これらの結果から、鼻粘膜上皮に定着した *S. pneumoniae* は、Gli1-Snail1 シグナル伝達依存的に細胞間接着分子である E-カドヘリンの転写を抑制することが明らかとなった。

【結論】

S. pneumoniae が産生する PLY は、Gli1-Snail1 シグナル伝達依存的に E-カドヘリンの転写を抑制することにより鼻粘膜上皮バリアを傷害し、嗅神経を介する細菌の非血行性脳組織伝播に寄与することが示唆された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　高原　悠樹　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主査　教授	川端 重忠
	副査　教授	野田 健司
	副査　准教授	松永 和秀
	副査　講師	竹内 洋輝

論文審査の結果の要旨

細菌性髄膜炎は、口腔鼻咽頭粘膜に定着する細菌が血行性に血液脳関門を突破し、髄膜へ伝播することにより発症すると推察されている。本研究では、上気道に定着する肺炎球菌が血行性だけでなく、嗅上皮中の嗅神経の軸索を介して非血行性に脳内へ伝播するという新たな感染伝播経路を見出した。また、嗅神経を介した細菌の脳伝播には、肺炎球菌が産生する細胞溶解毒素による鼻粘膜上皮バリア傷害が関与することを明らかにした。

よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。