

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 永井 康介  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第417号  
学位授与の日付 平成31年3月25日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4  
(自己溶菌に伴い漏出する肺炎球菌のDNA結合タンパク質は、TLR4を介して炎症性サイトカインの産生を促進する)

論文審査委員 主査 教授 寺尾 豊  
副査 教授 山崎 和久  
副査 教授 多田 康一

### 博士論文の要旨

学位申請者 永井康介氏より提出のあった主論文(英語)の要旨(和訳)は、以下の通りである。

わが国の肺炎による年間死者数は、人口動態の高齢化に伴い、11万人を超えて増加している。主たる肺炎起因菌である肺炎球菌は、健康な小児および成人の上気道細菌においても常在しており、免疫力の低い高齢者などで肺炎等を引き起こす。途上国においては、十分な予防処置等を受けることができず、肺炎により年間約100万人が死亡している。肺炎球菌性肺炎の予防策としては、肺炎球菌の血清型に忠じた13価および23価のワクチンが用いられる。しかしながら、肺炎球菌の血清型は94種類が確認されており、既存のワクチンがカバーしない血清型の肺炎球菌による侵襲性感染症が問題となっている。肺炎球菌性肺炎の治療としては、主に抗菌薬の投与が行われるが、近年、薬剤耐性肺炎球菌の出現が世界的な問題となっている。そこで、新潟市内の耳鼻科開業医を受診した患者から分離された約2,600株の肺炎球菌の薬剤感受性を調査した。その結果、およそ4割がペニシリンGに対して非感受性であることが明らかとなった。また、マクロライド系抗菌薬のアジスロマイシンに対しては、約8割の肺炎球菌が非感受性であることも判明した(Nagai, K., et al., J Infect Chemother, 2019, 参考論文2)。これら肺炎予防・治療における課題点を解決し、新規肺炎制御法の開発を行うため、申請者は更なる肺炎研究の推進が必要と考えた。

申請者は、これまでに肺炎球菌の特異的な性質である自己溶菌に着目して研究を行ってきた。その結果、肺炎が重症化する機序として、肺炎球菌が自己溶菌によって自ら溶菌することで、菌体内からプロテアーゼを放出し、肺組織を傷害するという病態進行モデルを明らかにしている。しかしながら、肺炎球菌が自己溶菌依存的に漏出する病原因子は他にも複数あると申請者は推察した。そこで本申請論文では、肺炎球菌が漏出する未知の菌体内病原因子を同定し、機能解析を行うことを目的とした。

まず、自己溶菌した肺炎球菌の培養上清をSDS-PAGEにて展開した。電気泳動にて明瞭に分離された3種類のタンパク質について、LC-MS/MS法による解析を行った。その結果、本来は菌体内に局在するChaperone Protein DnaK (DnaK), Elongation factor Tu (EF-Tu), およびGAPDHが培養上清から同定された。次に、同定した3種類の菌体内タンパク質について、組換えタンパク質を作製した。続いて、自然免疫系受容体であるTLR4に対し低応答性を示すマウス、もしくはコントロールマウスから臍腔マクロファージを採取し、作製した組換えタンパク質を添加した。6時間後の培養上清中の炎症性サイトカイン濃度(IL-6およびTNF $\alpha$ )をELISA法にて解析した。その結果、コントロールマウス由来臍腔マクロファージにおいて、DnaK, EF-Tu, およびGAPDHの組換えタンパク質は炎症性サイトカインの産生量を有意に増加させた。一方、TLR4低応答性マウスから採取した臍腔マクロファージに組換えタンパク質を作用させても、有意なサイトカインの産生は認められなかった。以上より、肺炎球菌は自己溶菌することで、菌体内からDnaK, EF-Tu, およびGAPDHを漏出させ、TLR4を介してマクロファージの炎症性サイトカインを誘導し、肺炎を増悪させる可能性が示唆された(Nagai, K., et al., Cell Immunol, 2018, 主論文)。

現在、肺炎球菌は薬剤耐性化に加え、現行ワクチンがカバーしない血清型(15A型)による侵襲性感染症が頻発している。そこで次に、新規ワクチン抗原候補を探索するため、同定した病原因子のうち、EF-Tuをワクチン抗原として

マウスに接種し、更なる解析を行った。また、コントロール群には、現行のPPSV23個ワクチンをマウスに接種した。その後、現行ワクチンが奏功する血清型である肺炎球菌D39株、またはワクチンが奏功しない血清型の15A株を腹腔に感染し、経時的に生存率を観察した。現行ワクチンで免疫したマウスは、D39株に対してのみ防御反応を示した一方、EF-Tu免疫マウスは、いずれの菌株を感染させた場合でも、有意な防御効果を示した。これらの結果から、EF-Tuによる免疫は肺炎球菌の血清型に関わらず防御効果を示し、EF-Tuが新規肺炎ユニバーサルワクチンの抗原候補となる可能性が示された (Nagai, K., et al., Vaccine, 2019, 参考論文1)。

申請者は、これら研究論文の出版やメディアへの発表 (2018年10月02日プレスリリース) を通じて、肺炎球菌の薬剤耐性度の現状、およびその対策を講じる必要性を広く一般社会に発信した。また、一連の研究成果は、肺炎球菌性肺炎の新たな治療法およびワクチン開発の基盤となる可能性を秘めている。

### 審査結果文の要旨

学位審査基準に従い、学術的意義ならびに新規性および創造性に関する試問を実施し、以下の解答を得た。すなわち、厚生労働省「人口動態統計」によると、国内における肺炎および誤嚥性肺炎による死亡者数は、平成26年119,650人、平成27年120,846人、平成28年119,300人、平成29年132,629人であり、昭和55年からの増加傾向が続いている。さらに、厚生労働省「薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会」、および「院内感染対策サーベイランス」によると、国内における肺炎球菌のペニシリン耐性率は、平成25年47.4%、平成27年40.5%、平成29年29.1%と減少傾向が認められる。また、マクロライド耐性率は、平成27年84.9%、平成28年75.5%と同じく減少傾向である。近年、不適切な抗菌薬の使用による薬剤耐性菌の増加が、国際社会で大きな課題となっている。2015年5月の世界保健総会では、薬剤耐性 (AMR) に関するグローバル・アクション・プランが採択され、加盟各国は2年以内に薬剤耐性 (AMR) に対する国家行動計画を策定することが求められた。これを受け、わが国では、「国際的に脅威となる感染症対策閣僚会議」のもとに、薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランが策定され、6つの分野に関する各目標が設定された。この目標に対し、本学位研究では、研究論文の出版やメディアへの発表を通じて、肺炎球菌の薬剤耐性度の現状、およびその対策を講じる必要性を広く一般社会に発信した。また、抗生物質に頼らない新規治療法や予防法の開発を進めることで、薬剤耐性肺炎球菌の拡大を防ぐことに貢献できると考えられた。

数年前に、肺炎球菌に対する予防ワクチンは承認され、臨床的に使用されている。同現行ワクチン (PPSV23) は、23種類の血清型の肺炎球菌から精製した莢膜を抗原として含むワクチンである。本ワクチンの接種により、血清型特異的IgG抗体、および血清型特異的オプソニン活性の上昇が誘導される。その効果は、5年以上持続するとされているが、接種により上昇した特異抗体の濃度は、時間の経過とともに低下し、高齢者や呼吸器、循環器に基礎疾患を有する人では低下しやすい傾向にあることが報告されている。特異的抗体濃度の低下は、肺炎球菌感染症の重症化リスクの増加に繋がるため、抗体水準を維持するために再接種が必要となる。さらに、近年の国内大規模臨床調査から、感染防御効果は約27%と報告されている。以上のことから、抗体誘導能に優れたタンパク質抗原型のワクチン開発が求められている。一方で、本研究で標的とするEF-Tuタンパク質は一般的には細胞内に存在し、各種のタンパク質合成に関与する。肺炎球菌においては、EF-Tuは自己溶菌によって菌体外に放出され、炎症を誘導するとともに、菌体の表面にも発現していることを確認している (主論文、副論文1)。さらに、同主論文の研究から、EF-Tuは全ての肺炎球菌において最も多く発現しているタンパク質の1つであることが明らかになっている。そのため、EF-Tuに対する免疫応答を増強することで、全ての肺炎球菌感染に対して効率的に防御効果を得ることができる。また、タンパク質抗原であることから、現行の莢膜型ワクチンと比較し、より高い抗体誘導能と感染防御効果が期待できる。さらに、近年流行する肺炎球菌の中には、現行ワクチンでは制御困難な定例が激発している。学位申請論文では、現行ワクチンのカバー外の臨床分離株に対する防御効果も示している。そこで、本研究で示した全血清型に共通のタンパク質性ワクチンの開発研究は、社会的にも応用性と貢献性が高いと考えられた。

最後に、博士学位申請論文は、Elsevier社のインパクトファクターを有する国際科学雑誌 (Cellular Immunology) に筆頭著者として受理・掲載されており、さらに3篇の参考副論文もインパクトファクターを有する国際科学雑誌 (Journal of Infection and Chemotherapy, Vaccine, Dental Materials Journal) に全て筆頭著者として受理・掲載されている。それぞれ、専門家によるピアレビュー査読を経て、客観的に質・量・形式および文法・語法が適切であることが担保されている。また、申請論文 (正副) の一連の成果は、国内各種メディアでも報道されており、研究テーマの新規性と波及効果の高さも充分であると評価した。

以上