

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09932

研究課題名(和文) 多剤耐性菌感染症を克服するオートファジー機構を介した好中球機能制御

研究課題名(英文) Regulation of neutrophil functions mediated by an autophagy machinery against multi-drug resistant bacterial infection

研究代表者

伊藤 洋志 (Itoh, Hiroshi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：20362387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：好中球は白血球の一種で、細菌感染に対する生体防御の一次機構において中心的な役割を果たしている。感染巣において細菌を貪食した好中球は活性酸素等を産生して強力に殺菌作用を示す。このとき、活性酸素の産生に依存して細胞内蛋白質の分解機構のひとつであるオートファジーが誘導される。本研究の実験結果は誘導されたオートファジーが好中球の細胞死や、細胞質に豊富に含まれるカルシウム結合蛋白質であるS100A8/A9の分解、走化性因子のひとつであるIL-8産生などに影響を及ぼし、好中球が集積する細菌感染巣の病態形成や好中球機能に影響を及ぼしている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は易感染性患者の難治性、重症の細菌感染症に対する治療法として、抗菌薬を主体とした従来の考え方ではなく、生体防御機構を活用する観点から新たな治療戦略に繋げる点に特色がある。好中球機能におけるオートファジーの役割の詳細を明らかにすることにより、オートファジーを介した全く新しい好中球機能の制御法が期待される。これにより、抗菌薬だけでは解決できない易感染性患者の多剤耐性菌感染症に対する新規治療法の開発に繋がり、治療成績の向上が期待される。また、過剰な好中球機能の発現による炎症病態に対する新たな抗炎症の治療法の開発に繋がることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil is a type of leukocyte that plays a central role in the primary machinery of host defense against bacterial infection. Neutrophils exert the bactericidal activity by producing reactive oxygen species (ROS) after engulfing bacteria in infected site. Autophagy which are intracellular protein degradation mechanisms are induced in the neutrophils depending on the production of ROS.

The experimental results of the present study show that induced autophagy affects neutrophil cell death, degradation of S100A8/A9, which is a calcium-binding protein abundant in the cytoplasm, and production of the chemokine IL-8. Therefore, it was suggested that the autophagy affect the pathogenesis at the site of bacterial infection and functions of the neutrophils in the site.

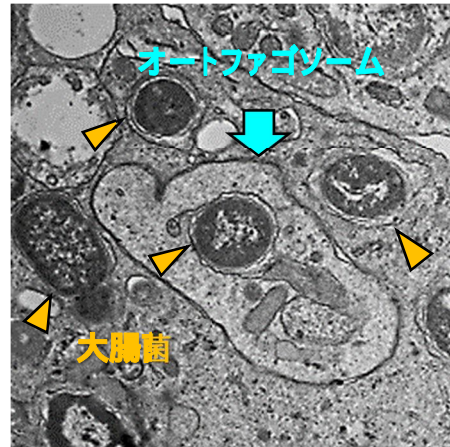
研究分野：生体防御学

キーワード：好中球 オートファジー 感染症 炎症 自然免疫 IL-8 S100A8/A9

1. 研究開始当初の背景

近年、医療の高度先進化や高齢化により易感染性患者が増加し、起炎菌の多剤耐性化とともに感染症の難治化、重症化、および院内感染症等が大きな臨床問題となっている。このような問題に対し、新たな抗菌薬の開発など抗菌薬だけに頼る治療法は限界に達しつつある。易感染性患者は生体防御機構の低下が背景にあることから、宿主の生体防御機構の活用も見据えた治療法が合理的であるが、具体的治療法は依然として限られている。

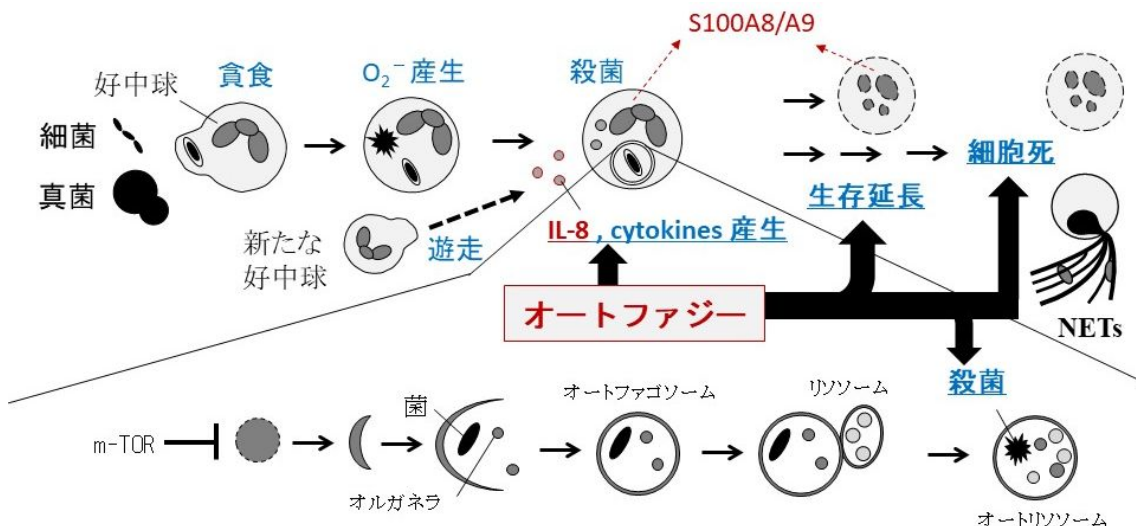
好中球は白血球の一種で、細菌感染に対する生体防御の一次機構において中心的な役割を果たす。研究代表者はこれまでに、重症感染症でしばしば抗菌薬と併用される静注用免疫グロブリン製剤 (IVIG) による好中球の食殺菌能増強効果を多剤耐性菌で示した。このとき、細胞内寄生性のない大腸菌や緑膿菌など非病原性細菌に対する貪食促進によって細胞内蛋白質の分解機構のひとつであるオートファジーが誘導され、菌を内包するオートファゴソーム (図1) 数が増大するとともに、オートファジーを抑制させると殺菌能が低下することを明らかにした (Itoh H, et al. *J. Leukoc. Biol.* 2015)。この所見は、好中球の殺菌能にオートファジーが貢献していることを示している。また、IVIG 製剤が多剤耐性菌に対する好中球の食殺菌能を増強するという研究成果は、感染症治療において生体防御機構の活用が極めて重要であることを示している。



(図1) 大腸菌 (中央) を内包する好中球の細胞質内に形成されたオートファゴソーム

2. 研究の目的

本研究は好中球が果たす諸機能において、オートファジーがどのような役割を果たしているかを明らかにし、オートファジー機構を介した好中球機能の制御によって易感染性患者の新規治療法の開発に繋げることを目的としている。好中球は過剰に働くと自らの組織の傷害を引き起こすことから、その機能は厳密な制御を受けている。好中球が役割を果たす場である感染巣の環境に即応した制御を受けるには、好中球自身に由来する成分による作用機構が合理的といえる。そこで、オートファジーが好中球の細胞質に豊富に含まれるカルシウム結合蛋白質である S100A8、S100A9 蛋白質を介して好中球機能を制御する機構についても検討を行った (図2)。



(図2) オートファジーによる好中球の諸機能に及ぼす影響

3. 研究の方法

(1) 材料

好中球：健常成人の末梢血からパーコール比重遠心法により分離して用いた。

試薬：好中球に活性酸素産生とオートファジーを誘導する刺激物質として、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) を用いた。また、オートファジーの阻害薬として、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害する Bafilomycin A1 を用いた。

(2) 解析法

殺菌能：コロニー法

活性酸素産生能：SOD-inhibitable cytochrome c 還元法

オートファジーの誘導：ウェスタンブロット法による LC3B conversion の解析、および免疫蛍光染色標本の観察

好中球の細胞生存率の評価：XTT 法

好中球の培養上清試料中の S100A 蛋白質 (S100A8、S100A9、S100A8/A9 (Calprotectin)) および Interleukin-8 (IL-8) の測定：ELISA 法

4. 研究成果

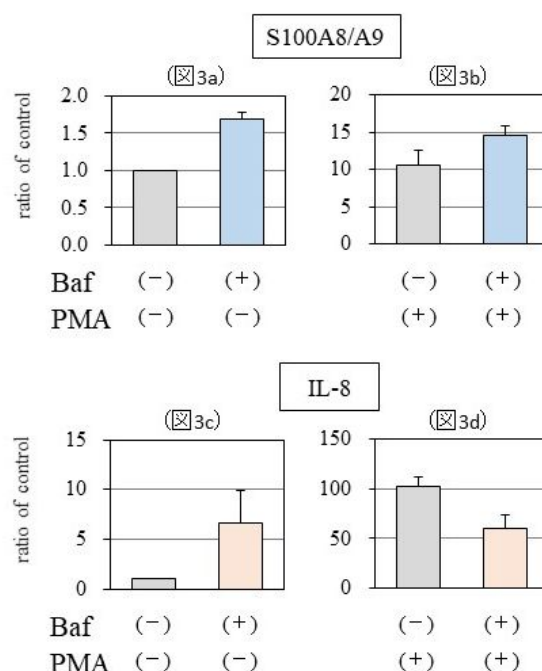
(1) S100A 蛋白質の解析

ヒト好中球に PMA を加えて活性酸素産生とオートファジーを誘導する刺激を与え、培養上清中の S100A8、S100A9、および S100A8/A9 ヘテロダイマー（以下、S100A8/A9）の濃度を比較検討した結果、大部分が S100A8/A9 であった。また、培養後の好中球生存率の実験結果などから、好中球の細胞死に伴う細胞内 S100A8/A9 の細胞外放出が考えられた。

オートファジー阻害薬として Bafilomycin A1 を好中球に作用させると、無刺激および PMA 刺激とも培養上清中の S100A8/A9 濃度が上昇した（図 3a, b）。このことは、好中球の細胞内 S100A8/A9 のオートファジーによる分解を示唆している。S100A8/A9 は、好中球の遊走など種々の生理活性が報告されていることから、オートファジーによって感染巣における好中球由来の S100A8/A9 量を調節し、好中球が集積する細菌感染巣の病態形成や好中球機能に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

(2) IL-8 の解析

好中球の代表的な走化性因子のひとつである IL-8 について解析を行った。20 時間培養後のヒト好中球培養上清中の IL-8 濃度は、Bafilomycin A1 の存在下で上昇し（図 3c）、また好中球の生存率の低下も示した。これは、オートファジーの阻害によって細胞死が亢進し、細胞内の IL-8 が細胞外へ放出されたことによるものと考えられる。好中球を PMA で刺激すると 20 時間後の培養上清中の IL-8 が著増した。PMA 刺激によって IL-8 の産生が誘導されたと考えられる。このとき、Bafilomycin A1 の存在下では培養上清中の IL-8 の減少を示した。PMA 刺激を受けた好中球は数時間以内に大半が細胞死に至り、Bafilomycin A1 による有意差はみられなかった。このことは、オートファジー阻害による好中球の IL-8 産生の抑制を示唆している。



(図3) ヒト好中球 (2×10^6 cells/ml) を20時間培養後の培養上清中の S100A8/A9 (図3a,b) および IL-8 (図3c,d)。

Baf: Bafilomycin A1 (500nM)

PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (100nM)

好中球は感染病巣において細菌を貪食すると活性酸素等を産生して強力に殺菌作用を示す。このとき、活性酸素の産生に依存してオートファジーが誘導されるが、本研究の実験結果は誘導されたオートファジーが好中球の細胞死や細胞内 S100A8/A9 の分解、IL-8 産生などに影響を及ぼし、好中球が集積する細菌感染巣の病態形成や好中球機能に影響を及ぼしている可能性を示す。

した。好中球機能におけるオートファジーの役割の詳細をさらに明らかにすることにより、オートファジーを介した全く新しい好中球機能の制御法が期待される。これにより、抗菌薬だけでは解決できない易感染性患者の多剤耐性菌感染症に対する新規治療法の開発に繋がると期待される。また、過剰な好中球機能発現による炎症病態に対する新たな炎症制御法の開発に繋がるとも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長浜バイオ大学 教員の紹介（伊藤 洋志） https://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/%e6%95%99%e5%93%a1%e3%81%ae%e7%b4%b9%e4%bb%8b%ef%bc%88%e4%bc%8a%e8%97%a4-%e6%b4%8b%e5%bf%97%ef%bc%89/	
長浜バイオ大学 第129回バイオセミナー（2016.6.28）「生体防御における実力部隊の在り方を考える 好中球機能に関する研究と臨床検査」	
「かけはし」Vol.288, 2018 秋号「身体を守る白血球 その動きの制御を目指す」知の泉（滋賀の研究最前線）発行：滋賀銀行	

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	池本 正生 (Ikemoto Masaki) (80144385)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・客員教授 (34204)	
連携研究者	岡田 光貴 (Okada Kohki) (80747569)	京都橘大学・健康科学部・助教 (34309)	