

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10011

研究課題名(和文) 自然免疫異常によるグラム陽性菌感染症の重症化機序についての解析

研究課題名(英文) Contribution of abnormal innate immunity to the severity of symptoms during infection with gram-positive bacteria

研究代表者

伊 敏 (YI, MIN)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：40292007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は宿主自然免疫細胞マクロファージおよび好中球のToll-like receptor (TLR) 2に着目し、TLR2欠損による感染防御反応の異常がStaphylococcus aureusへの易感染性・感染重症化を引き起こすメカニズムの解明を目的とした。感染初期にS. aureusの排除には好中球のTLR2が必須であり、TLR2はマクロファージのみならず、好中球の機能も調節することが判明された。TLR2欠損による好中球からの炎症性サイトカインの過剰産生およびマクロファージからのinterleukin (IL)-10の産生低下は、マウス生存率の低下に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLR2による自然免疫システムの正の応答だけではなく、自然免疫システムの負の制御機構を解明するという視点からグラム陽性菌感染症の重症化機序を検討することが本研究の学術的意義である。感染防御能を維持したまま過度な炎症反応を抑制する免疫標的療法の開発に繋がり、従来の免疫抑制剤の欠点である全体の免疫を抑え感染を重篤化する弊害を回避できるため、細菌感染重症化を防ぐには極めて有効な方法となることが期待できる。モデル動物で得られた知見はヒトの病態にfeed backすることにより感染症の新規治療法の開発の基礎となり、ヒトの易感染性の改善、健康の増進に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of TLR2 on macrophages and neutrophils on regulating the innate immune response to S. aureus infection by using TLR2-deficient mice. In this study, TLR2 deficiency led to an increased susceptibility to the bacterial infection. We find that TLR2 on neutrophils is an essential factor for removal of S. aureus in organs, and that TLR2 regulates the activations of both macrophages and neutrophils in the early phase of infection. TLR2 deficiency results in a significant increase in pro-inflammatory cytokines by neutrophils and a reduction in IL-10 production by macrophages, which contribute the augmented mouse death.

研究分野：感染症学、免疫学、

キーワード：Staphylococcus aureus Toll-like 2 receptor マクロファージ 好中球 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

- (1)黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)をはじめ、グラム陽性菌の多くは弱毒菌であるが、体内に侵入すると発病することが多く、免疫能低下の患者においてはさらに全身へ波及し感染重症化となるケースは臨床上度々見られる。また、グラム陽性菌への易感染性、易感染宿主の増加が問題視されている。重症感染症の治療には発症機序および易感染性要因の解明が求められている。
- (2)生体には病原体の侵入を感知するシステムとして自然免疫細胞の Toll-like receptor (TLR) が備わっている。TLR2 は主にグラム陽性菌の構成成分を認識し、炎症性サイトカインを産生させることにより炎症反応を惹起する。一方、この炎症反応は過剰に増強されると感染重症化へと繋がるため、TLR2 の発現を適切に制御することはグラム陽性菌感染の重症化防止の観点から極めて重要である。
- (3)好中球は自然免疫機構の重要な一員として病原体の貪食、殺傷を行うとともに炎症性サイトカインも放出する。しかし、好中球上の TLR2 の機能をはじめ、シグナル伝達経路、感染防御機構に及ぼす影響は殆ど報告されておらず、詳細な解析が必要である。

2. 研究の目的

- (1) マクロファージにおける TLR2 依存性炎症反応抑制機構の解明
TLR2 による自然免疫システムの正の応答だけではなく、自然免疫システムの負の制御機構を解明するという視点からマクロファージにおける TLR2 から IL-10 発現誘導までのシグナル伝達経路を解析し、TLR2 依存性の炎症反応抑制機構を明らかにする。
- (2)好中球における TLR2 の役割の解明
好中球の機能異常により細菌感染症は重篤な病状を呈することが多いが、好中球上の TLR2 がどのように細胞機能に影響を与えるかはほとんど報告されていない。本研究では TLR2 欠損による好中球機能異常のメカニズムを解析し、グラム陽性菌感染病態の形成における好中球の TLR2 の役割を明らかにする。

3. 研究方法

- (1)TLR2依存性自然免疫細胞の活性化制御機構の解析
野生型マウス由来のマクロファージおよび TLR2 欠損マウス由来のマクロファージに *S. aureus* 死菌を投与し、細胞を炎症状態にした上で TNF- α 、IL-6、IL-10 などのサイトカインの発現、とくに IL-10 の発現誘導因子の活性化を Real-time PCR、western blotting、ELISA などにより比較検討した。また、野生型マウスの好中球、TLR2 欠損マウスの好中球を死菌と共培養し、好中球の貪食能をフローサイトメーターにより評価した。また、好中球の TLR2 シグナル経路に着目し、TLR2 下流分子の活性化を western blotting 法、フローサイトメーターにより、サイトカイン産生能を Real-time PCR、ELISA などにより検討した。
- (2)感染病態における TLR2 の役割についての検討
野生型マウス、TLR2欠損マウスに *S. aureus* を尾静脈投与により感染モデルを作製する。生菌中に含まれているスーパー抗原や毒素の免疫系への影響を除外するため、加熱処理した死菌の投与も並行して実施した。感染後経時的にマウスの生存率、臓器内での菌の増殖状況、病理組織学的所見（免疫組織化学染色、HE染色にて）、血中および臓器内のサイトカイン発現（Real-time PCR法、ELISA法により）を比較検討した。これにより重症感染症における TLR2 の病態形成への関与を評価した。

4. 研究成果

- (1) TLR2 欠損マウスは *S. aureus* に対する感受性が非常に高くなり、野生型マウスに比べて明らかに生存率が低く、感染後 4 日目に全マウスが死亡した。また、TLR2 欠損マウスの臓器では排菌能の低下が確認された。さらに調べると、これらのマウスの肝臓マクロファージ、脾臓マクロファージおよび腹腔好中球の貪食能は、野生型マウスの細胞より低下したことが示された。一方、肺マクロファージおよび腹腔マクロファージの貪食能に関しては、野生型マウスと TLR2 欠損マウスの間に有意差が認められなかった。
- (2) 感染後マクロファージおよび好中球の臓器（肝臓、脾臓及び腎臓）への浸潤は、野生型マウス、TLR2 欠損マウスともに観察された。好中球を主体とした炎症細胞浸潤は約感染後 6 時間に、マクロファージを主体とした炎症細胞浸潤は徐々に上昇し約感染後 2 日にピークに達したが、二つの群間に有意差が認められなかった。一方、炎症性細胞の肺への浸潤は観察されなかった。
- (3) 感染初期の TLR2 欠損マウスの臓器、血中では、TNF- α 、IL-6 をはじめ、炎症性サイトカインの産生は野生型マウスより亢進した一方、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生は顕著に低下したことが判明された。in vitro では、*S. aureus* 刺激により TLR2 欠損マウスのマクロファージからの炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの産生は、野生型マウスのマクロファージに比べてともに低下した。一方、TLR2 欠損マウスの好中球から TNF- α などの一部の炎症性サイトカインの産生は野生型マウスの好中球に比べて著しく上昇したことが判明された。
- (4) 炎症細胞における IL-10 の発現誘導を解析したところ、*S. aureus* 刺激によりマクロファージのみならず、好中球における IL-10 の発現誘導も確認された。TLR2 欠損マウスの腹腔マクロファージでは転写因子 C/EBP β の発現変化が IL-10 の産生低下に寄与することが示唆された。現在、各臓器のマクロファージを採取し検証を行うとともに、TLR2、転写因子 C/EBP β 、IL-10 の三者の関連性をより詳しく調べている。また、好中球における IL-10 発現誘導機構も引き続き検討中である。

以上の結果から、マクロファージにおける TLR2 依存性炎症惹起機構とともに TLR2 依存性炎症抑制機構が存在していることが分かった。さらに、TLR2 はマクロファージのみならず、好中球の機能も調節することが判明された。感染初期に *S. aureus* の排除には好中球の TLR2 が必須であること、TLR2 欠損による好中球の炎症性サイトカインの過剰産生およびマクロファージからの IL-10 放出の減少はマウス生存率の低下に寄与することが示唆された。

参考文献

- (1) N Lewkowicz, MP Mycko, P Przygodzka, H Cwiklinska, M Cichalewska, M Matysiak, K Selmaj, P Lewkowicz. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunology*, 9: 364-378. 2016.
- (2) Csóka B, Németh ZH, Virág L, Gergely P, Leibovich SJ, Pacher P, Sun CX, Blackburn MR, Vizi ES, Deitch EA, Haskó G. A2A Adenosine Receptors and C/EBP β Are Crucially Required for IL-10 Production by Macrophages Exposed to *Escherichia Coli*. *Blood*. 110: 2685-2695. 2007.
- (3) Teixeira-Coelho M, Guedes J, Ferreirinha P, Howes A, Pedrosa J, Rodrigues F, Lai WS, Blackshear PJ, O'Garra A, Castro AG, Saraiva M. Differential Post-Transcriptional Regulation of IL-10 by TLR2 and TLR4-activated Macrophages. *Eur J Immunol*. 44: 856-866. 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計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）

1. 発表者名 伊敏
2. 発表標題 Staphylococcus aureus感染におけるTLR2欠損による感染防御反応の異常
3. 学会等名 日本感染症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊敏
2. 発表標題 Staphylococcus aureus感染におけるTLR2欠損による感染防御反応の異常
3. 学会等名 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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