

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15692

研究課題名(和文) ヒト早発性老化症候群モデルマウスを用いたアシネトバクター感染症の重症化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of severe infection with *Acinetobacter baumannii* using klotho mice model

研究代表者

佐藤 義則 (SATO, YOSHINORI)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：90455402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高齢宿主における *Acinetobacter baumannii* 感染症の重症化機構を明らかにするため、老化症状を示すヒト早発性老化症候群モデルマウス(klothoマウス)を用いて、感染に対する免疫応答を解析した。klotho knockout(KO)マウスでは、感染に対する高い感受性を示し、免疫細胞の誘導は肺において klotho wild-type(WT)マウスとは異なる誘導が認められ、炎症性サイトカインの強い誘導も明らかになった。老化に伴う免疫応答の変化が、高齢宿主の肺における感染重症化と関係してい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

高齢宿主におけるアシネトバクター感染症では、急速に重症化し致死率も高い。本研究では、老化症状を示すヒト早発性老化症候群モデルマウス(klothoマウス)を用いた *A. baumannii* 感染に対する免疫応答の解析から、高齢宿主では感染に対して誘導される免疫細胞の割合や機能が肺で特に変化しており、さらに強い炎症が誘導されることが明らかとなり、感染に伴う急速な肺炎の悪化が示唆された。高齢者におけるアシネトバクター感染症では、特に肺炎の急速な悪化に注意し、早期に肺に移行性の高い抗菌薬による治療によって、感染の重症化を抑制することができるかと期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of severe infection with *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) in aged hosts, we investigated immune responses in klotho KO mice after infection with *A. baumannii*. klotho KO mice demonstrated high susceptibility to the infection. Additionally, the proportion of immune cells in the lungs of klotho KO mice infected with *A. baumannii* was altered compared with that in klotho WT mice infected with *A. baumannii*. This study suggests that alteration of immune responses in aged hosts induces severe infection of *A. baumannii*.

研究分野：免疫学、微生物学

キーワード：アシネトバクター感染症 免疫応答 老化 高齢者

1. 研究開始当初の背景

アシネトバクターは、主に肺炎や尿路感染症、腹腔内感染症、稀に敗血症を引き起こす院内感染症として、高齢者、重篤な基礎疾患や免疫不全、血管内カテーテル挿入、人工呼吸器装備、長期入院といった危険因子のある患者で問題となる菌である (Karageorgopoulos DE., *et al.*, Lancet Infect. Dis., 2008)。また高齢者のアシネトバクター感染による市中肺炎が稀であるが認められ、急速に重症化し致死率も高いことが知られており、注意が必要とされる (金本 幸司 他, 日呼吸会誌, 2003, 森岡 悠 他, 日呼吸会誌, 2011)。入院患者から分離されるアシネトバクターの約 6 割は *A. baumannii* であり (国立感染症研究所, Infectious Agents Surveillance Report, 2010)。さらに多剤耐性アシネトバクター (MDRA) が毎年恒常的に報告され、過去にも MDRA の集団発生が深刻な問題になったこともあり、MDRA 感染症の動向が注目されている。*A. baumannii* の病原因子の代表的なものは、外膜タンパクである Outer membrane protein A (OmpA) が、バイオフィーム形成や宿主細胞への接着、上皮細胞や樹状細胞のアポトーシス誘導に関与することが明らかとなっている (Gaddy JA., *et al.*, Infect. Immun., 2009, Lee JS., *et al.*, J. Microbiol., 2010, Sato Y., *et al.*, J. Med. Microbiol., 2017)。一方、*A. baumannii* の病原性解析において、この菌の健常人に対する病原性は弱く、健常マウスを用いた *A. baumannii* の感染実験では、高齢者の感染を反映した解析をすることが難しく、高齢者における *A. baumannii* の感染重症化機序については不明な点が多い。そこで、6 週齢頃までに胸腺の萎縮や動脈硬化などの老化表現型が見られる *klotho* 遺伝子が欠損したヒト早発性老化症候群モデルマウス (*klotho* マウス) を用いた *A. baumannii* 感染 *klotho* マウスモデルを構築し、高齢宿主を想定した当該菌感染による敗血症の誘導、感染の重症化の解析を行うことが求められる。

2. 研究の目的

高齢宿主における *A. baumannii* の感染は、急速に重症化し致死率も高い。そこで本研究では、*A. baumannii* と老化症状を示すヒト早発性老化症候群モデルマウス (*klotho* K0 マウス) を用いた感染モデルを構築し、高齢宿主における好中球などの自然免疫系細胞の誘導率やそれらの活性化について解析する。また炎症性サイトカインの誘導などについても解析し、高齢宿主における *A. baumannii* の病原性と感染病態の重症化の関係について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *A. baumannii* 感染 *klotho* マウスの体重、生体内菌数の解析

Klotho K0 マウスおよび WT マウスの尾静脈に当該菌を接種した。感染 1、3、7 日後の生存数と体重を計測後、肺、脾臓、血液を採取し、それらを PBS 中で破碎後、段階希釈した破碎液を LB 寒天培地に塗布した。37℃ で一晚培養した後、CFU (colony forming unit) を計算した。

(2) *A. baumannii* 感染 *klotho* マウスの各臓器の免疫細胞の誘導・機能解析

Klotho K0 マウスおよび WT マウスの尾静脈に当該菌を接種後、感染 1、3、7 日後に肺、脾臓、末梢血を回収し、細胞を調整後、好中球、マクロファージ、樹状細胞等の各表面マーカーに特異的な標識抗体で染色した。染色後、フローサイトメーターで各細胞の検出を行い、各細胞の割合変化を解析した。また各細胞の活性化マーカーおよび ROS 産生について標識抗体または ROS 検出試薬で染色後、フローサイトメーターで各細胞の活性化レベルを解析した。

(3) *A. baumannii* 感染 *klotho* マウスのサイトカイン産生の解析

Klotho K0 マウスおよび WT マウスの尾静脈に当該菌を接種後、感染 1、3 日後に肺および血清を回収し、サイトカイン産生量を測定した。方法は、感染後の肺組織の RNA を抽出し、特異的なプライマーを用いて各サイトカインの発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。また血清中に含まれる各サイトカイン量は ELISA 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) *A. baumannii* 感染 *klotho* マウスの生体内菌数の解析

A. baumannii 感染後、*klotho* WT マウスの体重は一時的に減少したが、その後回復した (図 1 A)。一方、感染後に生存した *klotho* K0 マウスでは、徐々に体重が減少する傾向が見られた (図 1 B)。

A. baumannii 感染後、*klotho* WT マウスで死亡する個体は無かったが、*klotho* K0 マウスでは、感染 7 日後の生存率が 57% であった (図 1 C)。

感染 7 日後の *klotho* WT マウスの各臓器で菌は検出されなかった。一方、感染 7 日後の *klotho* K0 マウスの肺では、菌が検出された (図 1 D ~ 1 F)。

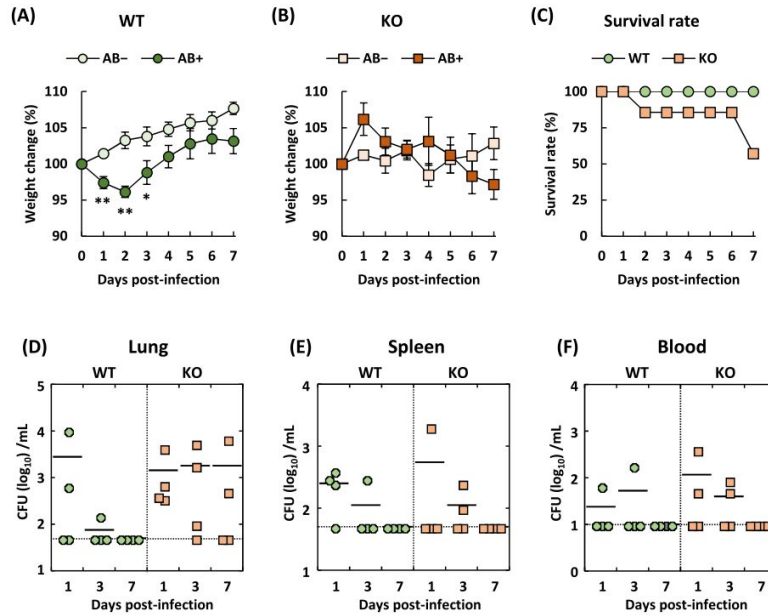


図1. *A. baumannii* 感染 klotho マウスの (A , B) 体重変化、(C) 致死率および (D , E , F) 臓器内菌数の測定

(2) *A. baumannii* 感染 klotho マウスの各臓器の免疫細胞の誘導・機能解析

- A. baumannii* 感染 klotho KO マウスの肺では、好中球や好酸球が強く誘導された (図 2 A ~ 2 D)
- A. baumannii* 感染 klotho KO マウスの肺では、肺胞マクロファージの数に変化は無かった。一方、間質マクロファージが一過性に誘導された (図 1 E ~ 1 H)
- A. baumannii* 感染 klotho KO マウスの肺では、単球や樹状細胞の誘導は弱かった (図 2 I ~ 2 L)
- A. baumannii* 感染 klotho KO マウスの好中球は、感染によって細胞内 ROS は誘導されたが、活性化マーカーの発現は誘導されなかった。

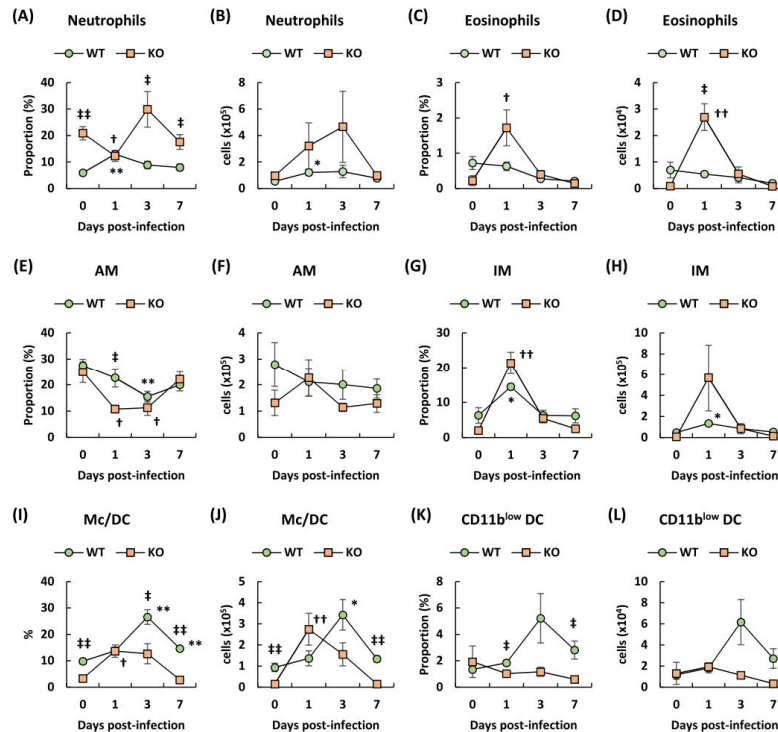


図2. *A. baumannii* 感染 klotho マウスの肺における免疫細胞の誘導 (Neutrophils: 好中球, Eosinophils: 好酸球, AM: 肺胞マクロファージ, IM: 間質マクロファージ, Mc/DC: 単球/樹状細胞, DC: 樹状細胞)

(3) *A. baumannii* 感染 klotho マウスのサイトカイン産生の解析

A. baumannii 感染 klotho KO マウスの肺では、MCP-1、IL-1 および MIP-2の発現が強く誘導された。(図3 B, 3 C, 3 E)

A. baumannii 感染 klotho KO マウスの肺の TNF- α 、IL-6および IL-10の発現は、klotho WT の肺と同程度誘導された。(図3 A, 3 D, 3 F)

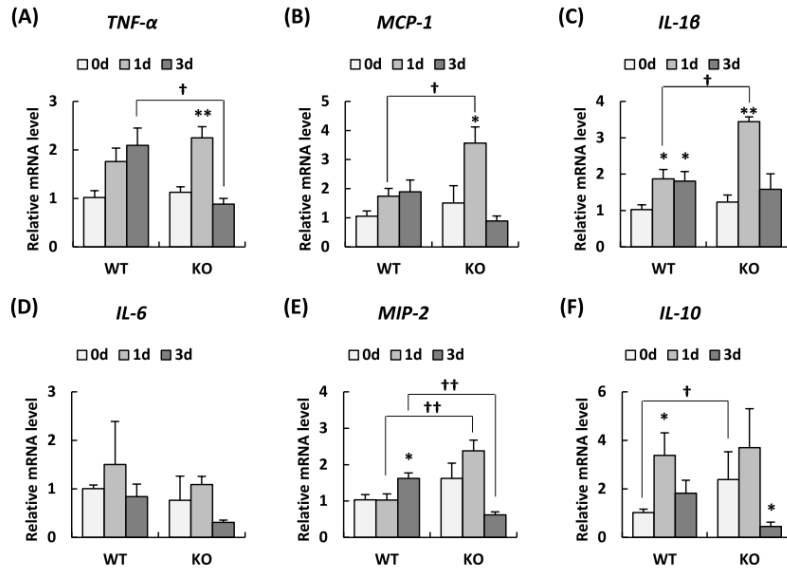


図3. *A. baumannii* 感染 klotho マウスの肺におけるサイトカイン発現量の変化

以上の結果から、*A. baumannii* 感染 klotho KO マウスの肺では、好中球が誘導されるにも関わらず活性化が起こらず、殺菌能力が不十分であること、さらに炎症性サイトカインの強い誘導や好酸球の誘導などの特徴を示すことが明らかとなり、感染に伴う急速な肺炎の悪化が示唆される。また樹状細胞の誘導も少ないことから、獲得免疫系の活性化も期待できないことが推測される。さらに、感染に伴う klotho KO マウスの体重変動が少ないことから、見た目には感染症状が現れにくい可能性があり、7 日後の生存率が半分程度であることから、高齢者への *A. baumannii* 感染には注意する必要がある。特に肺炎の急速な悪化に注意し、早期に肺に移行性の高い抗菌薬による治療によって、感染の重症化を抑制できると推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kamoshida Go, Akaji Takuya, Takemoto Norihiko, Suzuki Yusuke, Sato Yoshinori, Kai Daichi, Hibino Taishi, Yamaguchi Daiki, Kikuchi-Ueda Takane, Nishida Satoshi, Unno Yuka, Tansho-Nagakawa Shigeru, Ubagai Tsuneyuki, Miyoshi-Akiyama Tohru, Oda Masataka, Ono Yasuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Lipopolysaccharide-Deficient <i>Acinetobacter baumannii</i> Due to Colistin Resistance Is Killed by Neutrophil-Produced Lysozyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Yoshinori, Unno Yuka, Miyazaki Chizuru, Ubagai Tsuneyuki, Ono Yasuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> resists reactive oxygen species and survives in macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53846-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Yoshinori, Unno Yuka, Ubagai Tsuneyuki, Ono Yasuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote <i>Acinetobacter baumannii</i> biofilm formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0194556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0194556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Unno Yuka, Sato Yoshinori, Nishida Satoshi, Nakano Akiyo, Nakano Ryuichi, Ubagai Tsuneyuki, Ono Yasuo	4. 巻 2017
2. 論文標題 <i>Acinetobacter baumannii</i> Lipopolysaccharide Influences Adipokine Expression in 3T3-L1 Adipocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mediators of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/9039302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤義則、西田智、上田たかね、永川茂、祖母井庸之、斧康雄
2. 発表標題 Multidrug-resistant <i>A. baumannii</i> は活性酸素種に抵抗してマクロファージ内で生存する
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 義則、海野 雄加、西田 智、上田 たかね、永川 茂、祖母井 庸之、斧 康雄
2. 発表標題 マクロファージの殺菌に対する <i>Acinetobacter baumannii</i> の抵抗性評価
3. 学会等名 第68回 日本感染症学会東日本地方会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 義則、永川 茂、海野雄加、鴨志田 剛、西田 智、上田 たかね、祖母井 庸之、斧 康雄
2. 発表標題 <i>Acinetobacter baumannii</i> 感染klothoマウスにおける免疫応答の解析
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤義則、永川 茂、海野雄加、鴨志田剛、西田 智、上田たかね、祖母井庸之、斧 康雄
2. 発表標題 高齢宿主を想定した <i>Acinetobacter baumannii</i> 感染に対する免疫応答の解析
3. 学会等名 第93回 日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 義則、永川 茂、海野 雄加、鴨志田 剛、西田 智、上田 たかね、祖母井 庸之、斧 康雄
2. 発表標題 Klotho マウスを用いた Acinetobacter baumannii 感染マウスモデルの構築
3. 学会等名 第67回 日本感染症学会東日本地方会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 義則、海野 雄加、鴨志田 剛、西田 智、上田 たかね、永川 茂、祖母井 庸之、斧 康雄
2. 発表標題 多剤耐性Acinetobacter baumannii のバイオフィルム形成能 - ポリペプチド系抗菌薬のsub-MIC効果 -
3. 学会等名 第92回 日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 義則、海野 雄加、鴨志田 剛、西田 智、上田 たかね、永川 茂、祖母井 庸之、斧 康雄
2. 発表標題 ポリペプチド系抗菌薬のsub-MICsにおける Acinetobacter baumannii 臨床分離株のバイオフィルム形成量の変化
3. 学会等名 第91回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 義則、海野 雄加、鴨志田 剛、西田 智、上田 たかね、永川 茂、祖母井 庸之、斧 康雄
2. 発表標題 ポリペプチド系抗菌薬のsub-MICsにおける Acinetobacter baumannii 臨床分離株のバイオフィルム形成量の変化
3. 学会等名 第91回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 義則、西田 智、永川 茂、上田 たかね、祖母井 庸之、斧 康雄
2. 発表標題 Acinetobacter baumannii のバイオフィルム形成に及ぼす抗菌薬のsub-MIC効果
3. 学会等名 第64回 日本化学療法学会 東日本支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 義則、海野 雄加、鴨志田 剛、西田 智、上田 たかね、永川 茂、祖母井 庸之、斧 康雄
2. 発表標題 病原因子ompsの発現に相関した Acinetobacter baumannii 臨床分離株の病原性変化
3. 学会等名 第91回 日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----