

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08846

研究課題名（和文）インフルエンザウイルス感染に伴う細菌二次感染易感染性の分子基盤解析と予防法確立

研究課題名（英文）Analysis of susceptibility to bacterial secondary infection associated with influenza virus infection and establishment of preventive methods

研究代表者

石川 裕樹 (Ishikawa, Hiroki)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：60433918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではインフルエンザウイルス感染が引き起こす細菌二次感染易感染性のメカニズムとその予防法について *in vitro* にて検討をおこなった。その結果、インフルエンザウイルス感染では、細菌が細胞上への接着に利用する CEACAM-1 分子遺伝子発現量を増加させ、実際に細菌の細胞接着細菌数を増加させた。またインフルエンザウイルス感染では、タイトジャンクション構成成分の一つである ZO-1 遺伝子発現量を低下させ、実際に上皮バリア機能低下を引き起こすことが確認された。これらの影響に対し、乳酸菌産生多糖体はウイルス感染を抑制しそれに伴う CEACAM-1 分子遺伝子発現低下、ZO-1 遺伝子発現回復が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルス感染に続く、細菌二次感染は宿主病態悪化の危険因子のひとつである。本研究ではインフルエンザウイルス感染による細菌二次感染易感染性はウイルス感染細胞の細菌接着分子遺伝子発現誘導およびタイトジャンクション遺伝子発現低下による上皮バリア機能脆弱により起こる可能性を示唆した。また予防法として乳酸菌産生多糖体がインフルエンザウイルス感染予防効果を示し、それに伴う易感染性のメカニズムも改善することが認められた。インフルエンザウイルス感染予防に乳酸菌産生多糖体が効果を持つことを論文として情報を発信した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated *in vitro* the mechanism of susceptibility to bacterial secondary infection caused by influenza virus infection and methods for its prevention. As a result, influenza virus infection increased the expression level of the CEACAM-1 molecule gene, which bacteria use for adhesion to cells, and actually increased the number of bacteria adhering to cells. It was also confirmed that influenza virus infection reduces the expression level of ZO-1 gene, one of the components of tight junctions, and actually causes a decline in epithelial barrier function. In response to these effects, polysaccharides produced by lactic acid bacteria suppressed viral infection, and an associated decrease in CEACAM-1 gene expression and recovery of ZO-1 gene expression were observed.

研究分野：微生物学 免疫学

キーワード：インフルエンザウイルス 細菌二次感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス感染後の細菌二次感染は宿主の病態悪化の重要な因子である。我々はこれまでの研究において、インフルエンザウイルス感染は肺中での G-CSF 産生を低下させることで細菌貪食後の好中球の殺菌機能を減弱、すなわち細菌排除を遅らせることで病態を悪化させる可能性を示した。そこでインフルエンザウイルス感染予防もしくは早期改善することは好中球機能を維持し、細菌二次感染を軽減できるのではないかと推察し実験的に証明することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は臨床的に二次性細菌性肺炎予防の観点から、ウイルス感染に伴う細菌排除能低下は、インフルエンザウイルスワクチン接種または抗インフルエンザウイルス薬早期投与による迅速なウイルス排除亢進が好中球の細菌排除機能維持ひいては二次性細菌性肺炎予防に寄与するか基礎医学的知見から明らかにすることを目的とした。

当初の予定では、予備検討で得た、「抗インフルエンザウイルス薬投与によるインフルエンザウイルスの早期排除亢進は二次性細菌性肺炎予防に有効である」という結果の再現性を確認する予定であった。しかしながらコロナウイルス感染拡大に伴う非常事態宣言により、当大学では実験動物の購入に制限がかかり動物実験遂行が不可能になった。そこで本研究では動物実験から肺基底上皮細胞株 A549 細胞を用いた *in vitro* 系にてインフルエンザウイルス感染とそれに伴う細菌二次感染易感染性のメカニズム解明および予防法について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス感染による細菌接着因子発現増強と予防法

A549 細胞は 96 well flat plate に 1×10^5 cell/well で播種した。インフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/34 株) を 1×10^5 pfu 感染させ、1 時間後に細胞を洗浄し、非接着ウイルスを排除した。さらに 6 時間インキュベートし、細胞より RNA を抽出した。リアルタイム PCR により細胞内のインフルエンザウイルス遺伝子量および細菌接着因子遺伝子発現量を測定した。またいくつかの実験ではウイルス感染時または感染後にプロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 が産生する Exopolysaccharides (EPS) を添加し、予防効果の検討をした。また黄色ブドウ球菌接着試験では同様に A549 細胞を 96 well flat plate に 1×10^5 cell/well で播種し、インフルエンザウイルスを 1×10^5 pfu 感染させ、1 時間後に細胞を洗浄した。さらに 6 時間インキュベート後、黄色ブドウ球菌 (ATCC 29213 株) を 1×10^5 cfu 添加し、さらに 1 時間インキュベートした。非接着の黄色ブドウ球菌を PBS で 10 回洗浄し、細胞をトリプシン-EDTA で剥離し、寒天プレート上に撒き、培養後、コロニー数を測定した。

(2) インフルエンザウイルス感染によるタイトジャンクション遺伝子発現抑制と予防法

A549 細胞は 96 well flat plate に 1×10^5 cell/well で播種した。インフルエンザウイルスを 1×10^5 または 1×10^6 pfu 感染させた。いくつかの実験では感染と同時に $400 \mu\text{g/ml}$ の EPS を添加した。1 時間後に細胞を洗浄し、非接着ウイルスを排除し、さらに 12 時間インキュベーションし、細胞より RNA を抽出した。リアルタイム PCR により細胞内のインフルエンザウイルス遺伝子量、タイトジャンクション遺伝子および炎症性サイトカイン遺伝子発現量を測定した。同様の実験系で培養 12 時間後に細胞をホルマリン固定し、0.3% Triton-X-100 処理後、anti-ZO1 抗体と DAPI で免疫染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。FITC-FITC-dextran Permeability 試験では 24 Trans-well plate を使用し、上側に A549 細胞を 2×10^5 cell 播種した。インフルエンザウイルス 2×10^5 pfu 感染と同時に $400 \mu\text{g/ml}$ の EPS を添加した。1 時間後に細胞を洗浄し、非接着ウイルスを排除し、さらに 12 時間インキュベーションした。50 μg の FITC-dextran (40kDa) を上側に添加し、3 時間後下側の FITC-dextran 量を蛍光プレートリーダーで測定した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルス感染による細菌接着因子発現増強と予防法

インフルエンザウイルス感染時に EPS を添加した細胞では、EPS の添加によりウイルス感染を有意に抑制することが認められた (図 1A)。しかしながら、ウイルス感染後に EPS を添加した細胞ではウイルス感染を防ぐ効果は認められなかった (図 1B)。これらの結果より EPS はウイルスの複製を阻害するのではなく、細胞への接着を阻害していることが示唆された。

図 2 が示すように、インフルエンザウイルス感染細胞では CEACAM-1 遺伝子発現が非感染細胞と比較し、10 倍以上になることが確認された (ICAM-1, VCAM-1, Fibronectin, PAF-r, E-selectin は変化なし)。またこのウイルス感染による発現増強は EPS 添加により有意に抑制された。この結果と並行し、実際に細胞への黄色ブドウ球菌接着菌数を測定したところ、非感染細胞と比較し、ウイルス感染細胞では接着細菌数が有意に増加しており、この増加した細菌数は EPS の添加により減少傾向を示した。以上より、ウイルス感染時の EPS 添加はウイルス感染を予防し、それに続く接着因子の発現増強の抑制し、結果として細菌二次感染を軽減することが示唆された。

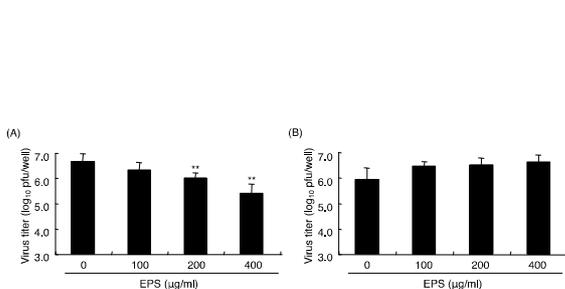


図1. インフルエンザウイルス感染におけるEPSの作用

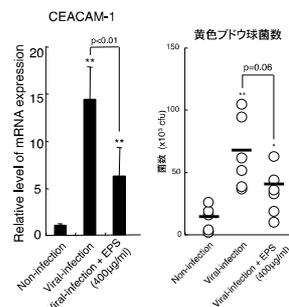


図2. インフルエンザウイルス感染における細菌接着因子発現とEPSの作用

(2) インフルエンザウイルス感染によるタイトジャンクション遺伝子発現抑制と予防法

図 3 が示すように、インフルエンザウイルス感染によりタイトジャンクション構成成分の一つである ZO-1 遺伝子発現量がウイルス感染数依存的に減少していた。またタイトジャンクションを脆弱させることが報告されている炎症性サイトカインはウイルス感染により誘導されることが確認された。

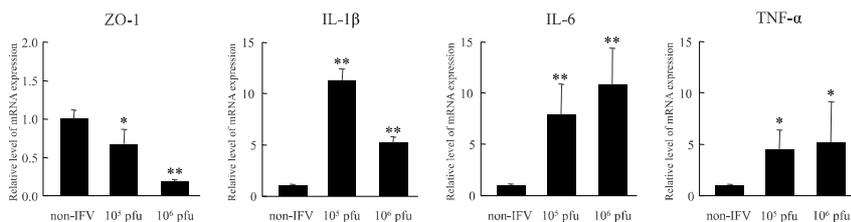


図3. インフルエンザウイルス感染によるタイトジャンクションと炎症性サイトカイン遺伝子発現量

図 4 はインフルエンザウイルスを 1×10^5 pfu 感染させ、同時に $400 \mu\text{g/ml}$ の EPS を添加した時の結果である。EPS 添加により細胞内ウイルス遺伝子量の減少、ウイルス感染によって低下した ZO-1 遺伝子量の有意な回復が確認された。ウイルス感染によって誘導された炎症性サイトカインについても EPS 添加により有意な減少が確認された。しかしながら、インフルエンザウイルスを 1×10^6 pfu 感染させた場合には EPS の効果は確認できなかった (data not shown)。

インフルエンザウイルス感染によりタイトジャンクションの透過性が有意に上昇し、その上昇した透過性は EPS 添加により回復傾向が認められた (data not shown)。しかしながら、共焦点レーザー顕微鏡下での ZO-1 タンパク発現量に差は認められなかった。

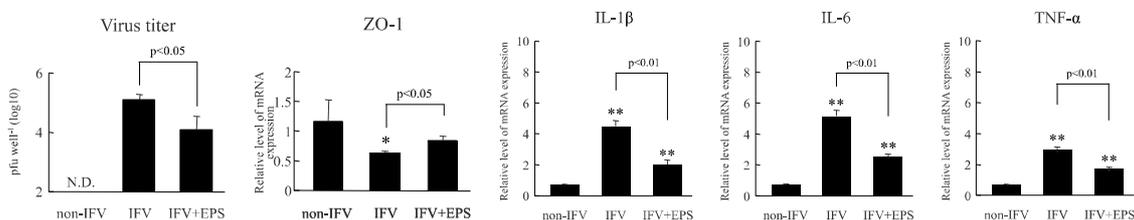


図4. インフルエンザウイルス感染によるタイトジャンクションと炎症性サイトカイン遺伝子発現量に対するEPSの効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ishikawa Hiroki, Kuno Yoshihiro, Yokoo Takehiro, Nagashima Ryuichi, Takaki Takashi, Sasaki Hiraku, Kohda Chikara, Iyoda Masayuki	4. 巻 77
2. 論文標題 In vitro investigation of the effects of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1 exopolysaccharides on tight junction damage caused by influenza virus infection	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/lambio/ovae029	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 Ishikawa Hiroki, Nagashima Ryuichi, Kuno Yoshihiro, Sasaki Hiraku, Kohda Chikara, Iyoda Masayuki	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 Effects of NKT Cells on Metabolic Disorders Caused by High-Fat Diet Using CD1d-Knockout Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity	6. 最初と最後の頁 2855 ~ 2864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/DMSO.S428190	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 Kohda Chikara, Ino Satoshi, Ishikawa Hiroki, Kuno Yoshihiro, Nagashima Ryuichi, Iyoda Masayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 The essential role of intestinal microbiota in cytomegalovirus reactivation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.02341-23	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 Nagashima Ryuichi, Ishikawa Hiroki, Kuno Yoshihiro, Kohda Chikara, Iyoda Masayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 HIF-PHD inhibitor regulates the function of group2 innate lymphoid cells and polarization of M2 macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29161-3	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 Ishikawa H., Kuno Y., Kohda C., Sasaki H., Nagashima R., Iyoda M.	4. 巻 74
2. 論文標題 Exopolysaccharides from <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> OLL1073R-1 prevent influenza virus infection and attenuate secondary bacterial infection risk	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 632 ~ 639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.13649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Hiraku, Ueshiba Hidehiro, Yanagisawa Naoko, Itoh Yuta, Ishikawa Hiroki, Shigenaga Ayako, Benga Laurentiu, Ike Fumio	4. 巻 102
2. 論文標題 Genomic and pathogenic characterization of RTX toxin producing <i>Rodentibacter</i> sp. that is closely related to <i>Rodentibacter haemolyticus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 105314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2022.105314	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 Nagashima Ryuichi, Ishikawa Hiroki, Kuno Yoshihiro, Kohda Chikara, Iyoda Masayuki	4. 巻 157
2. 論文標題 IL-33 attenuates renal fibrosis via group2 innate lymphoid cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 155963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2022.155963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Hiroki, Ino Satoshi, Nakashima Takuji, Matsuo Hiroataka, Takahashi Y?ko, Kohda Chikara, ?mura Satoshi, Iyoda Masayuki, Tanaka Kazuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Oral administration of trehangelin-A alleviates metabolic disorders caused by a high-fat diet through improvement of lipid metabolism and restored beneficial microbiota	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Obesity Research & Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 360 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.orcp.2020.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasaki Hiraku, Ishikawa Hiroki, Itoh Taisuke, Arano Makoto, Hirata Koya, Ueshiba Hidehiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Penicillin-Binding Proteins and Associated Protein Mutations Confer Oxacillin/Cefoxitin Tolerance in Borderline Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mdr.2020.0191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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 石川裕樹、長島隆一、久野芳裕、高木孝士、幸田力、佐々木啓、伊與田雅之
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染によるタイトジャンクション傷害におけるOLL1073R-1乳酸菌産生多糖体の影響
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 幸田力、石川裕樹、久野芳裕、長島隆一、伊與田 雅之
2. 発表標題 潜伏サイトメガロウイルスの再活性化におけるエストロゲンおよびプロゲステロンの関与
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川裕樹、長島隆一、久野芳裕、佐々木啓、幸田力、伊與田雅之
2. 発表標題 高脂肪食摂取誘導肥満におけるNKT細胞の影響
3. 学会等名 第24回氷川フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryuichi Nagashima, Hiroki Ishikawa, Yoshihiro Kuno, Chikara Kohda, Masayuki Iyoda
2. 発表標題 Group2 innate lymphoid cells ameliorate renal fibrosis and dysfunction associated with adenine-induced CKD
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石川裕樹、久野芳裕、幸田力、佐々木啓、長島隆一、狩野宏、石井祥子、伊與田雅之
2. 発表標題 OLL1073R-1乳酸菌産生多糖体はインフルエンザウイルス感染予防効果を示し、さらに細菌二次感染を軽減する
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 啓、上芝 秀博、柳澤 直子、石川 裕樹、伊與田 雅之、池 郁生
2. 発表標題 Characterization of Rodentibacter sp. that is closely related to Rodentibacter haemolyticus
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川裕樹、佐々木啓、幸田力、久野芳裕、長島隆一、田中和生、伊與田雅之
2. 発表標題 マウスノロウイルス感染においてNKT細胞は腸管内に特異的なIgA抗体を誘導することでウイルス排除に寄与する
3. 学会等名 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸田力、石川裕樹、久野芳裕、長島隆一、田中和生、伊與田雅之
2. 発表標題 サイトメガロウイルス再活性化に及ぼすエストロゲンの影響
3. 学会等名 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木啓、上芝秀博、柳澤直子、石川裕樹、池郁生
2. 発表標題 溶血性を示すRodentibacter sp.の病原性解析
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木啓、上芝秀博、石川裕樹、池郁生
2. 発表標題 肺バクテリウム近縁種Rodentibacter sp.の病原性評価
3. 学会等名 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------