

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17468

研究課題名（和文）ARDS患者の末梢気道細菌に着目したインフルエンザ重症化因子の探索

研究課題名（英文）Research for influenza aggravation factors focusing on lower respiratory bacteria in ARDS patients

研究代表者

西岡 敬介（Nishioka, Keisuke）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50790713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに重症ARDS患者では全身性の炎症状態の悪化に特定の細菌属のバランスが寄与している可能性を報告した。本研究ではARDS患者検体から培養された細菌の中から、in vitroの系においてインフルエンザウイルス感染においてウイルス複製を増強または抑制する細菌種が同定された。それら活性は、100℃の熱処理を行うことで失活することが見られ、タンパクであることが考えられた。ウイルス複製の増強と抑制の効果を持つ細菌種はARDS患者における炎症の増悪、抑制と関係しており、そのタンパクの同定はインフルエンザ重症化及びARDS発症予防に貢献できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毎年多くのインフルエンザ患者が見られるが重症化すると多くのケースで致死率が高いARDSを続発する。ARDSは対症療法が行われているが未だ治療成績は良くない。そのためARDS重症化に関与する因子に加え、ARDS発症関連因子の同定はARDS治療に貢献できると考えられる。本研究の成果は、特定の細菌種のタンパクが重症化及び予防に関与している可能性があり、今後タンパク同定を行うことで新規の治療法確立へ貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported that the balance of specific bacterial genera may contribute to the exacerbation of systemic inflammation in ARDS patients. In this study, we cultured bacteria using ARDS patients samples and identified bacterial species that enhance or suppress influenza virus replication in vitro. These activities were found to be inactivated by heat treatment at 100 °C, suggesting that they were proteins. Bacterial species that have the effect of enhancing and suppressing viral replication are associated with exacerbation and suppression of inflammation in ARDS patients, and identification of these proteins may contribute to the prevention of influenza aggravation and the onset of ARDS.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ ARDS 細菌叢

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザの重症化例は、インフルエンザ脳症、インフルエンザウイルス自体や肺炎球菌、黄色ブドウ球菌など上気道常在細菌の二次感染による肺炎の合併症、病態形成が不明な急性呼吸窮迫症候群(**ARDS**)といったものが挙げられ、いずれも死亡率が高く問題となっている。その重症化率は高齢者で高い一方で、**2009**年に流行した新型インフルエンザウイルス(**H1N1/pdm09**)では若齢者においても多数の重症化が見られた。そのため、宿主の免疫機能に起因する重症化因子の解明は重要な課題となっている。また、上記のうち致死率が**40%**に至る**ARDS**は病態形成が明らかになっておらず、特異的治療法が未だ確立されていない。申請者は研究の開始までに、**ARDS**の病態形成において末梢気道細菌叢に着目し、肺胞洗浄液中細菌の網羅的解析を行っており、**ARDS**患者では特定の細菌属の比が予後と関係することを明らかにしてきた。本解析例では**ARDS**の原因は肺炎が**65%**と一番多く、その原因はインフルエンザウイルスが**20%**と一番多かった。加えて、培養検査陰性のケースも多く見られ(**38%**)、これらはウイルス性肺炎の可能性もあり、見た目以上にウイルス性肺炎から**ARDS**へ続発するケースは多いと考えられた。**ARDS**の予後に関する解析結果が得られていた末梢気道細菌叢だが、過去の報告において、インフルエンザウイルス感染と上気道細菌叢の解析では、*Neisseria*属と*Streptococcus*属が、インフルエンザ症状へ関与することが報告されている(**Lee et al. PLoS One. 2017**)。季節性インフルエンザウイルスは上気道に感染するため、口腔・上気道細菌叢の関与が着目されるが、我々の末梢気道細菌叢解析でも*Neisseria*属を含む*Betaproteobacteria*綱と*Streptococcus*属が**ARDS**の予後へ関与することが示されており、インフルエンザの重症化及び**ARDS**の病態形成にはインフルエンザ症状を増悪させる特定の細菌が関与している可能性が考えられた。以上から、肺へのウイルス感染から**ARDS**の発症・予後に至るまで密接に関与していることが示唆された。下気道にあたる末梢気道細菌は次世代シーケンシング(**NGS**)のようなシーケンシング技術を用いないと検出が困難なため、これまでにインフルエンザウイルス感染及び続発する**ARDS**において特定の末梢気道細菌に着目し解析された例はない。

2. 研究の目的

本研究では**ARDS**患者の末梢気道でみられる特徴的な細菌種を探索し、その候補細菌種がインフルエンザの重症化及び**ARDS**の発症にどのように関与するか検討することを試みた。**ARDS**は高度な炎症により血管内皮、肺胞上皮細胞の傷害から、びまん性の肺胞傷害を示す症候群であり、死亡率は**30-58%**と非常に予後が悪く**ICU**では対策必須となっている。病態は、滲出期、増殖期、線維化期と進行し、滲出期では、血管内皮やガス交換を行う**I**型上皮細胞肺胞上皮の傷害により、血漿成分等の滲出液が肺胞内に充満することで、ガス交換障害が見られる。続く増殖期においては、炎症と組織修復のための細胞増殖が混在しており、ガス交換を行わない**II**型上皮細胞の過形成がみられ、その後は、繊維芽細胞の増殖や膠原繊維による肺線維化が進んでいく。増殖期以降は慢性の線維化病変が見られ、不可逆的に病態が進行していくため、発症または重症化予防が非常に重要となる。これまでの末梢気道細菌叢解析においては、**ARDS**患者において*Betaproteobacteria*綱と*Streptococcus*属、*Staphylococcus*属、腸内細菌科細菌のバランスが予後に関係していた。また上記の通り、*Betaproteobacteria*綱に含まれる*Neisseria*属と*Streptococcus*属が、インフルエンザ症状へ関与することが報告されているため、特徴的な細菌種を検出することで、インフルエンザ重症化予防、**ARDS**発症/重症化予防法への検討を目的とした。

3. 研究の方法

1) 候補細菌種の検出

本研究における**ARDS**患者の特徴的な末梢気道細菌種の検出のために、**ARDS**患者の気管支肺胞洗浄液の属レベルにおける**NGS**解析と、細菌培養を行った。

NGSによる候補細菌種の検出

ARDS患者とコントロール群の気管支肺胞洗浄液中の細菌DNAを抽出し、*Streptococcus*属、*Staphylococcus*属、腸内細菌科細菌のユニバーサルプライマーにて**PCR**を行った。**PCR**産物を精製し、次世代シーケンサーでシーケンスを行った。

得られたデータからそれぞれ約**300 bp**以上の配列のみ抽出し、その後クラスターを形成した。各クラスターのコンセンサス配列を集め、データベース上の配列と照合することで各クラスターに最も近い細菌種を決定した。**1**種類の細菌種に決定しなかった場合でも、複数の細菌種の配列としてデータを出した。最後に各クラスター割合と決定した細菌種から、標的とした属レベルでの細菌叢を解析した。

培養による候補細菌種の検出

*Betaproteobacteria*綱と*Streptococcus*属、*Staphylococcus*属、腸内細菌科細菌のそれぞれ

において、細菌の分離培養のために、各寒天培地による培養を行った。

Betaproteobacteria 綱は範囲が広いので、インフルエンザの症状と関与の報告がある **Neisseria** 属を標的とした。チョコレート寒天培地、血液寒天培地を用いて、嫌気、好気的条件下で培養を行った。グラム染色により、グラム陰性の球菌をピックアップし、**16S rRNA** 遺伝子の解読により **Neisseria** 属細菌を得た。

Streptococcus 属は血液寒天培地を用いて、**CO₂** 培養にて培養を行った。グラム染色により、グラム陽性の球菌をピックアップし、**16S rRNA** 遺伝子の解読を行った後に、溶血性の判定も行った。

Staphylococcus 属は普通寒天培地、卵黄加マンニット寒天培地を用いて好気的条件下で培養を行った。グラム染色により、グラム陽性の球菌をピックアップし、**16S rRNA** 遺伝子の解読により **Staphylococcus** 属細菌を得た。

腸内細菌科細菌は血液寒天培地の好気、嫌気的条件下、ブルセラ **HK** 寒天培地の嫌気的条件下で培養を行った。グラム染色により、グラム陰性の桿菌をピックアップし、**16S rRNA** 遺伝子の解読により腸内細菌科細菌を得た。

2) *in vitro* における候補細菌種のインフルエンザウイルス複製への影響の検討

得られた候補細菌種の液体培養を行い、細菌区画をフィルター滅菌にて除くことで各細菌の培養上清を得た。培養上清を各ヒト呼吸器上皮細胞株の培養系へウイルス感染前またはウイルス感染後へ添加し、インフルエンザウイルスの複製にどのような影響を与えるか検討した。感染前の添加は細胞の状態の変化、感染後の添加はウイルス感染動態への影響を評価することを目的とした。

ウイルス感染 **24** 時間後に培養上清を回収し、上清中のウイルスゲノムコピー数をリアルタイム **PCR** にて評価した。また、影響する活性区画を調べるために、**100** 処理した細菌の培養上清や、限外ろ過にてタンパクサイズで分画した上清を用いて同様の解析を行った。

4. 研究成果

ARDS 患者の肺胞洗浄液を用いた **NGS** による細菌種の探索では複数種の細菌の候補がそれぞれ得られた。この結果は、細菌培養結果と概ね一致しており、**ARDS** 患者の下気道検体から特徴的な細菌種を培養できた。主要な候補細菌は一般的には口腔や上気道の細菌であり、口腔・上気道からの特定の細菌の移行が、**ARDS** 発症へ関与することが示唆された。しかしながら、培養できる種は限られるため培養できなかった種については、今後検討が必要である。

続いて、得られた細菌種の液体培養を行い培養上清を用いてインフルエンザウイルス複製への影響を検討した。**Streptococcus** 属においては特定の種では、上皮細胞へ強い細胞傷害性を示し、また別の種ではインフルエンザウイルス複製の亢進に働くことがわかった。ウイルス感染前または後に培養上清は添加しており、特に感染前の上清添加でウイルス複製の亢進がみられたことは細菌叢の変化が宿主の細胞の状態を変化させることを示唆している。また、これらウイルス複製を亢進する活性は、一部の細菌種では **100** の培養上清処理で不活化したことからタンパクが活性区画であることが考えられた。

同様に **Neisseria** 属について行ったところ、インフルエンザウイルス複製の抑制を示す **Neisseria** 属菌が複数種同定された。また、その活性区画は **30-10 kDa** に含まれるタンパクである可能性が高く、タンパクの同定はインフルエンザの重症化予防や、その他ウイルス感染症においても重症化予防法に働く可能性がある。これらの結果は、過去の上気道細菌叢の **Neisseria** 属と **Streptococcus** 属が、インフルエンザ症状へ関与する報告を支持する結果となった。

以上の結果は、細菌叢内のバランスの破綻が重症化に寄与することを支持する結果となった。そこで、これら細菌属について、共存の影響を調べた。特定の **Streptococcus** 属細菌と **Neisseria** 属細菌を共培養したところ各々が影響することなく、単独培養と同程度増殖することがわかった。また、これら細菌属の培養上清を同時に刺激すると、**Neisseria** 属の抑制効果のみが現れ、**Streptococcus** 属による亢進が打ち消されることがわかった。共培養の結果と合わせると、**Betaproteobacteria** 綱の細菌の減少によって、**Streptococcus** 属によるウイルス複製亢進を打ち消す効果が減弱すると考えられ、**ARDS** 発症・重症化に寄与している可能性がある。

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishioka Keisuke, Daidoji Tomo, Nakaya Takaaki	4. 巻 309
2. 論文標題 Downregulation of calcium-regulated heat stable protein 1 expression by low-temperature stimulation causes reduction of interferon- expression and sensitivity to influenza viral infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198659 ~ 198659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2021.198659	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 Nishioka Keisuke, Kyo Michihito, Nakaya Takaaki, Shime Nobuaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Proteins produced by Streptococcus species in the lower respiratory tract can modify antiviral responses against influenza virus in respiratory epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 104764 ~ 104764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micinf.2020.09.010	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 Soliman Rofaida Mostafa, Nishioka Keisuke, Daidoji Tomo, Noyori Osamu, Nakaya Takaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Chimeric Newcastle Disease Virus Vectors Expressing Human IFN- Mediate Target Immune Responses and Enable Multifaceted Treatments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 455 ~ 455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines11020455	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0件

〔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
---------	---------