

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591300

研究課題名（和文）感染症制圧に向けた易感染宿主の好中球機能異常解析と感染防御能モニタリングの確立

研究課題名（英文）Establishment of immuno-monitoring system for the infectious disease control and analysis of neutrophil dysfunction in various compromised hosts

研究代表者

斧 康雄（ONO YASUO）

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：10177272

研究成果の概要（和文）：易感染宿主の好中球の走化能は、敗血症患者とコントロール不良の糖尿病患者で低下し、殺菌能は、肝硬変、SLE、AIDS、多発性骨髄腫、重症熱傷や高齢者などで低下していた。セプシス患者では、好中球膜抗原の CD14 と TLR-4 の発現レベルが高く、CD11b と CD16 の発現レベルは低下した。好中球内 TREM-1 遺伝子の発現低下は、セプシスの重症度と関連した。これらの好中球機能解析は、易感染宿主における細菌感染に対する感染防御能を評価するための高感度で信頼性の高い免疫監視ツールとして利用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Neutrophil chemotaxis was reduced in septic patients and poorly controlled diabetic patients. Neutrophil bactericidal ability in the patients with liver cirrhosis, SLE, AIDS, myeloma, severe burn and elderly persons was significantly lower than that of healthy controls. Expression levels of neutrophil membrane antigens, CD14 and TLR-4 were higher in patients with sepsis; however, the expression levels of CD11b and CD16 were lower. The gene expression of *TREM-1* in neutrophils associated with the severity of sepsis. Analysis of neutrophil functions using these assays may be available as the sensitive and reliable immuno-monitoring tools for determining the capacity of host defense against bacterial infections in compromised hosts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：感染症内科学

キーワード：感染症防御学、易感染性、好中球、セプシス、遊走能、細胞膜抗原、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

近年の感染症の様相は変化し、易感染宿主 (compromised hosts) の増加が問題となっている。さらに、これらの患者にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)、基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌や肺炎桿菌、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) などの薬剤耐性菌が感染すると、病態が難治性となり、重篤化することから、客観的な宿主の易感染性の評価法の確立や、その治療および予防対策の確立が急務となっている。本研究は、臨床現場で利用可能な宿主の易感染性の評価法の確立を目的とするものである。具体的には、これらの細胞外増殖菌に対して、生体防御の中心的役割を担う食細胞の機能低下や感染に伴う活性化障害を、各種 compromised hosts の好中球に焦点をあてて、細胞レベルで調査すること、さらにその機能低下が、好中球の受容体、情報伝達系、遺伝子レベルでの異常なのかを解明することを目的とする。臨床レベルでの患者の好中球機能の解析については、申請者らの測定系はごく微量の血液検体で、簡便に短時間に機能評価が可能であるので、患者への負担が少ない点も有益で、感染発症に伴う機能変化のモニターにも応用可能と思われる。

2. 研究の目的

近年の感染症の問題点は、compromised hosts の増加とこれらの患者に発症する薬剤耐性菌による重症・難治性感染症である。本研究は、これらの感染症制圧に向けて、compromised hosts における好中球機能を中心とした感染防御能を評価するために、ごく微量の血液検体で、簡便に短時間にできるモニタリングシステムの確立を目指すものである。さらに、compromised hosts の好中球機能低下が細胞膜上の受容体、情報伝達系、遺伝子レベルでの異常 (遺伝多型) なのかも

解明し、感染発症の急性期から回復期までの経過に伴う変化も健常人と比較しながら検討する。

3. 研究の方法

(1) 好中球の殺菌能は分離好中球と 0.1ml の極微量の全血を用いたルミノール依存性化学発光法 (chemiluminescence :CL) を用いて活性酸素産生能を評価する。この方法は、自己血清を含んだ系では発光ピークに至る時間を測定することで、同時に血清オプソニン活性も推測することが可能である (Ono Y, et al: Microbiol Immunol 37:563-571, 1993, Ono Y, et al: Microbiol Immunol 38:373-377, 1994, Ono Y, et al: J Infect Chemother 10:234-238, 2004)。

(2) 遊走活性の測定は、従来法のボイデン法と細胞100個で解析可能なTAXIScan細胞走化性測定装置を用いる。本法は従来の測定系に比べて採血量が少ないので患者負担が少なくすむ点が特長である (Kanegasaki S, et al: J Immunol Methods 282, 1-11, 2003)。

(3) 一部の薬剤耐性菌の病原性は、マウスなどの動物モデルで解析されているが、ヒトの臨床レベルで宿主の食細胞を中心とした感染防御能から解析した研究は数少ない。薬剤耐性菌 (MRSA, PRSP, MDRP など) を用いた好中球との反応系において、好中球の貪食殺菌作用や遊走活性が、感性菌と異なるのかどうかを検討する (薬剤耐性菌の抗食菌反応などの病原性が評価できる)。

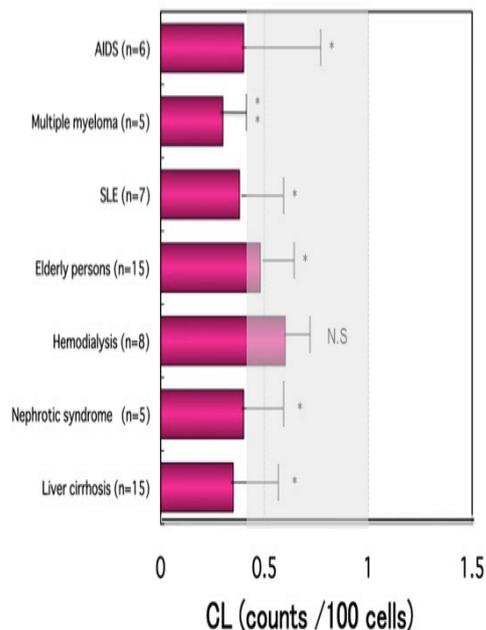
(4) 通常、細菌感染症が発症すると好中球機能は亢進するが、compromised hosts の好中球では活性化が起こるかどうかは、まだ臨床的に十分検討されていない。申請者の検討では、肝硬変、重症熱傷患者などで、敗血症のような重症感染症が発症しても全血CL活性が十分に増強しない場合は感染が遷延化し

難治性であり、予後も不良であったので、食細胞活性化の低下は易感染性、感染症の重篤化、難治化の一因と考えられる (Ono Y, et al: Microbiol Immunol 37: 563-571, 1993, Ono Y, et al: J Infect Chemother 10:234-238, 2004)。今回、さらに多くの compromised hosts について検討する。食細胞の活性化には、ペプチドグリカン、エンドトキシン (LPS: リポ多糖体) などの菌体成分や炎症性サイトカインなどが関与する。そこで、ケモカイン/サイトカイン、LPSや β -グルカンなどの菌体成分による好中球活性化作用を、MAPキナーゼ (MAPK) のリン酸化とCL応答を指標に健常人で検討し、その後患者好中球との比較やセプシスなどの病態下における応答性の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) 微量全血と分離好中球を用いたCLで好中球殺菌能を評価した。全血CLのデータは過去の分と合わせて、合計300名の健常人の活性酸素産生能の基準値を決定した。zymosanや緑膿菌、MRSA、肺炎球菌の食作用に付随する好中球の活性酸素産生能の測定は主に全血CLで評価したが、肝硬変、SLEなどのステロイド使用患者、骨髄腫、熱傷患者などで低下していた。各種 compromised hosts における肺炎球菌刺激時の単位顆粒球あたりの全血CLを示す (Fig.1)。Compromised hosts では、セプシスや肺炎などの重症細菌感染症が起ると、比較的免疫能が保たれている場合は、全血および分離好中球共にzymosan刺激、PMA刺激によるCL値は高値を示したが、血清オプソニン低下例はzymosanや前述した薬剤耐性菌刺激では低値であった。尚、好中球のCL反応は、同一菌種の耐性菌と感受性菌を刺激物として比較しても、好中球のCL応答性に有意差を認めなかった。

Fig. 1 各種 compromised hosts における単位好中球あたりの全血CL (肺炎球菌貪食時)



(2) 遊走活性の測定は、主に TAXIScan を用いて、IL-8、fMLP を遊走因子として 100 名のボランティアで測定し、基準値を決定した。好中球の遊走能の低下はコントロール不良の糖尿病患者でみられた。セプシスおよび重症細菌性肺炎患者の好中球遊走活性において、IL-8、fMLP 刺激による遊走速度は健常人と比較して低下していたが (Fig.2)、その低下の一因として、細胞膜上の IL-8 受容体の発現低下 (Fig.3)、細胞内の IL-8 の mRNA の低下、IL-8 刺激による MAPK family のリン酸化の低下が関与することを明らかにした。特にステロイドパルス療法患者では、その傾向は顕著であった。易感染性宿主のセプシス発症時の著しい遊走能低下は、基礎疾患よりは幼弱好中球数と相関した。薬剤耐性菌と感受性菌を刺激物/遊走因子とした場合に、薬剤耐性による好中球の応答性に有意差を認めなかった。

Fig. 2 Sepsis 患者好中球の遊走活性

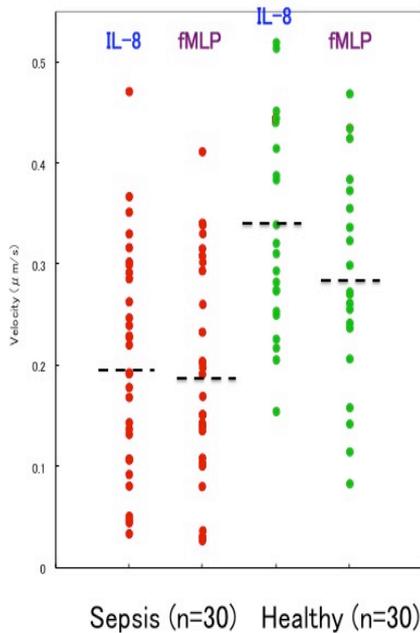
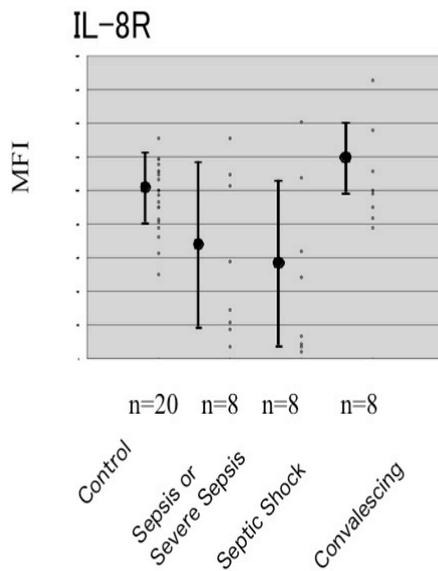


Fig. 3 Sepsis患者好中球のIL-8受容体の変化



(3) さらに、セプシス患者の好中球膜上抗原発現においては、TLR-2、TLR-4、CD14の発現増加、CD11b、CD16の発現減少を確認した。また、回復期には健常人と同様のレベルまで抗原発現は回復した(Fig. 4, Fig. 5)。

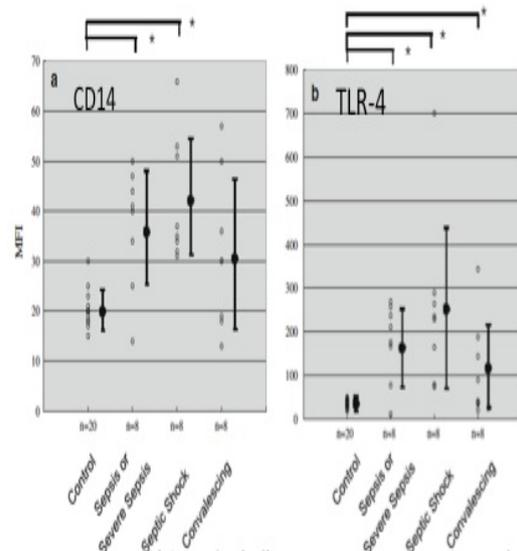
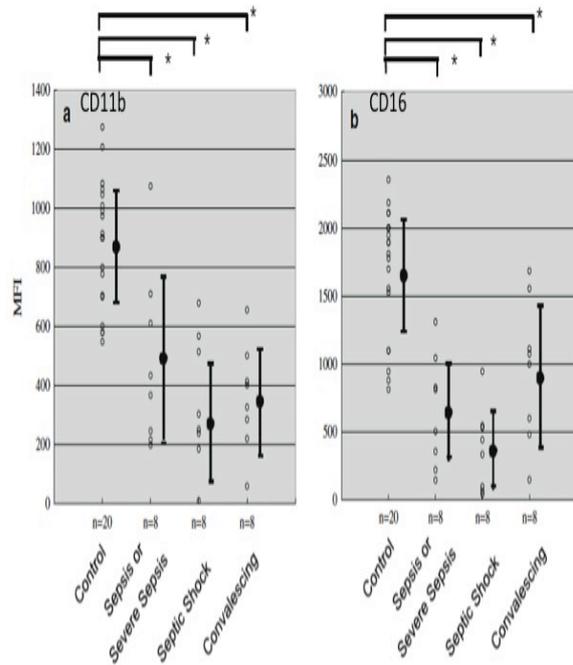


Fig.4 Sepsisに伴う好中球膜上のCD14とTLR-4の発現解析(FACS)

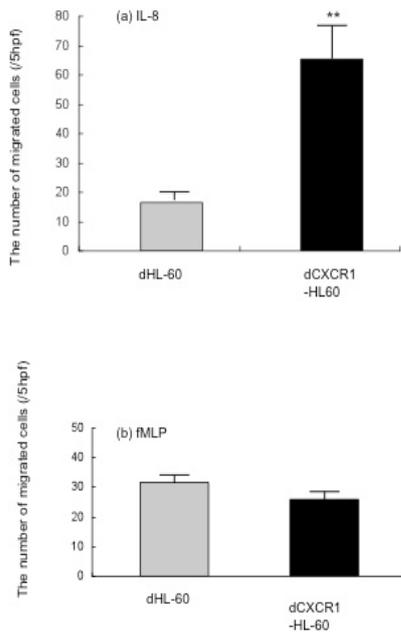
Fig.5 Sepsis患者好中球のCD11b,CD16の発現解析 (FACS)



(4) 健常人の好中球だけでなく、好中球様に分化させた HL-60 を使用して、これに CXCR1 (IL-8R) 遺伝子を導入した HL-60 を作製した。遺伝子導入により HL-60 に IL-8 受容体を発現させると IL-8 による遊走(Fig. 6)や活性酸素産生能に対する priming 効果が増強することから、IL-8 受容体の発現量と遊走活性の関係が基礎的にも証明された。この系は、

薬剤などが好中球遊走に与える影響を評価するのに応用可能と思われる。

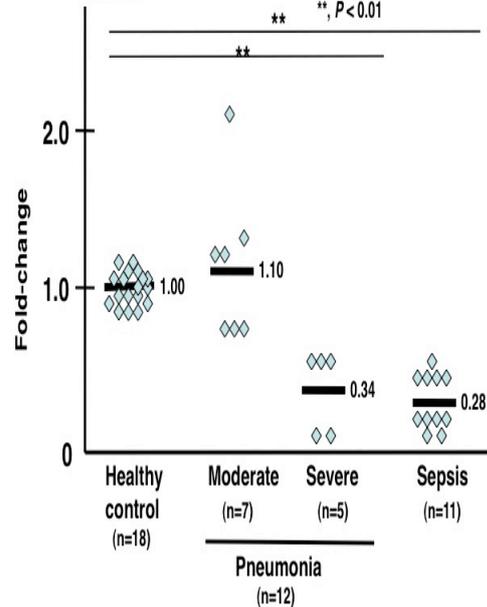
Fig.6 CXCR1 (IL-8受容体)遺伝子を導入したHL60の遊走活性増強効果(IL-8を遊走因子とした場合)



(5) 重症細菌感染症の急性期には、過剰に活性化した好中球がしばしば炎症や臓器傷害を惹起する。各種 compromised hosts の重症感染症発症に伴う好中球内の遺伝子発現変化を調べる目的で、免疫能に関わる遺伝子群の発現解析を23症例(肺炎12名、敗血症11名)で、下記の好中球内遺伝子発現をリアルタイムPCR法で解析した。*TLR-2*(20/23名)、及び*CD14*(18/23名)の好中球内遺伝子発現は、健常者よりも亢進していた。一方、*TLR-4*(16/23名)、及び*IL-6*(16/23名)の遺伝子発現量は抑制されていたが、*TNF- α* (16/23名)では増強していた。また、*IL-8*受容体(15/23名)の遺伝子発現は低下していたが、*MAC-1*(14/23名)の遺伝子発現は増加していた。ミエロイド細胞の受容体である*TREM-1*の遺伝子発現量は、中等症の肺炎患者において健常者の0.7-2.1倍を示し、平均値で1.1倍であった。同様に重症の肺炎、及び敗血症の患者では、健常者の0.3倍であった。この

ように、重症細菌感染症患者の好中球内の*TREM-1*遺伝子発現量は、患者病態の重症度と逆相関することが明らかとなった(Fig.7)。以上の結果から、循環血中の好中球内*TREM-1*遺伝子発現は、細菌感染症のバイオマーカーとして臨床応用できることが示唆された。

Fig.7 Sepsisや重症肺炎患者好中球のTREM1遺伝子(mRNA)の発現



(6) 敗血症や重症肺炎での起病菌がグラム陽性菌かグラム陰性菌、真菌かで好中球の活性化が異なるか否かを調べるため、それぞれの菌体成分の好中球の機能に対する影響をMAPKのリン酸化を指標に検討した。健常者及びグラム陰性菌やグラム陽性菌による肺炎患者及びグラム陽性菌による敗血症患者由来の好中球に対して、大腸菌由来のLPSや黄色ブドウ球菌由来のLTA(リポテイコ酸)、カンジダ由来の β -グルカンで刺激し、特にp38 MAPKのリン酸化を調べた。その結果、p38 MAPKのリン酸化を指標とした好中球活性化はLPS>LTA>可溶性 β -グルカンの順であった。また、グラム陰性菌によるセプシス患者の好中球では、LPS刺激によるp38のリン酸化が抑制されたが、グラム陽性菌が起病菌のセプ

シス患者の好中球では抑制されないことも判明した。また、肝硬変や AIDS 患者などの好中球では、 β -グルカンや LPS、TNF- α に対する CL 反応に対する priming 効果の低下がみられており、細菌感染が起こっても好中球の活性化が十分起こらない可能性があり、易感染性や重篤化/難治化との関連性が示唆された。今後は、他の compromised hosts の好中球での解析や、応答性の低下の詳細な機序の解析が重要な研究課題である。

これまで国内外で compromised hosts の好中球機能についての報告はあるものの、薬剤耐性菌との相互作用の点から解析した研究や機能異常のメカニズムを好中球の受容体、情報伝達系、遺伝子レベルで解析した研究はほとんどない。また、compromised hosts の好中球機能をモニターしながら病態診断や治療に応用する試みもなされていない。さらに、感染症患者のダイナミックに変化する食細胞の活性酸素産生能や遊走能の変化を、経過を追って分子レベルで明らかにした報告も数少ない。本研究の成果や今後の継続する研究によって解明される新知見は、compromised hosts の感染予防や、さらには宿主感染防御能を考慮に入れた抗菌薬療法や免疫調整療法を実施する上で極めて役立つと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Kikuchi-Ueda T, Tansho S, Ono Y: Enhancement of interleukin-8-induced chemotactic response and reactive oxygen species production in HL-60 cells expressing CXCR1. J Infect Chemother (査読有り). 2012. in press.
DOI:10.1007/s10156-011-0321-3
- 2) Tansho-Nagakawa S, Ubagai T, Kikuchi-Ueda T, Koshio O, Koshibu Y, Kikuchi H, Ono Y: Analysis of membrane

antigens on neutrophils from patients with sepsis. J Infect Chemother (査読有り). 2012. in press.

DOI: 10.1007/s10156-012-0386-7

- 3) Ubagai T, Tansho-Nagakawa S, Ikeki T, Ono Y: Evaluation of *TREMI* gene expression in circulating polymorphonuclear leukocytes and its inverse correlation with the severity of pathophysiological conditions of patients with acute bacterial infections. Jap J Infect Dis (査読有り). 2012. in press.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 丹生茂, ほか: 細菌感染症患者の末梢白血球における抗原認識に関わる細胞膜抗原の解析, 第 85 回日本感染症学会総会, 2011 年 4 月, 東京
- 2) 祖母井庸之, ほか: 細菌感染症患者の末梢好中球内で重症度に関連して発現変化する遺伝子に関する検討, 第 85 回日本感染症学会総会, 2011 年 4 月, 東京
- 3) 越尾修, ほか: 真菌および細菌由来菌体成分の好中球 MAPK family リン酸化に対する影響, 第 85 回日本感染症学会総会, 2011 年 4 月, 東京
- 4) 斧康雄: 会長シンポジウム, 「ヒト・微生物・薬剤関係からみた感染症, 最新の知見」, 宿主からみた感染症, 第 84 回日本感染症学会総会, 2010 年 4 月, 京都.
- 5) 上田たかね, ほか: 原虫感染に対する HL-60 を用いた好中球機能の解析, 第 2 報, 第 84 回日本感染症学会総会, 2010 年 4 月, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斧 康雄 (ONO YASUO)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号: 10177272

(2) 研究分担者

祖母井 庸之 (UBAGAI TSUNEYUKI)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号: 10311416

(3) 研究分担者

丹生 茂 (TANSHO SHIGERU)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号: 50266300

(4) 研究分担者

上田 たかね (UEDA TAKANE)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号: 80459312

(5) 研究分担者

越尾 修 (KOSHIO OSAMU)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号: 30365986