

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19587

研究課題名(和文) 宿主細胞のオートファジーに着目したインフルエンザ関連肺炎の重症化メカニズム解明

研究課題名(英文) The role of autophagy in severe influenza-related pneumonia

研究代表者

小佐井 康介 (KOSAI, Kosuke)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：70644433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ関連細菌性肺炎におけるオートファジーの役割を解析した。インフルエンザウイルスと肺炎球菌をA549細胞に重複感染させたin vitroモデルにおいて、オートファジー小胞を発現した細胞が経時的に増加し、その後減少した。重複感染マウスの肺では非感染マウスと比較して、LC3Bを発現している炎症細胞が増加した。In vitro重複感染モデルにオートファジー阻害薬を作用させた結果、interleukin (IL)-6は低下、matrix metalloproteinase (MMP)-10は増加した。重症インフルエンザ関連細菌性肺炎の病態・免疫応答にオートファジーが関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of autophagy in severe influenza-related bacterial pneumonia. In vitro studies showed that the number of A549 cells expressing autophagic vesicle increased during coinfection in a time-dependent manner, and decreased after they peaked. The expression of LC3B in inflammatory cells increased in coinfecting mice, compared to uninfected mice. Autophagy inhibitor suppressed the gene and protein expression of interleukin (IL)-6 in coinfection in vitro, whereas it enhanced the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-10. Autophagy may be involved in mechanisms of severe influenza-related bacterial pneumonia.

研究分野：感染症学、呼吸器病学

キーワード：インフルエンザウイルス 肺炎球菌 オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザウイルスに肺炎球菌が重複感染した肺炎(インフルエンザ関連細菌性肺炎)は、抗菌薬治療に抵抗性で死亡率が高く、病態の解明や新たな治療戦略が求められる。

(2) 通常の急性感染では、病原体は効果的かつ適切なタイミングで炎症が起こることにより排除される。しかし本病態では、好中球の高度な活性化を伴う過剰な炎症によって自己の肺傷害が惹起されることが重症化の一因と考えられる。また本病態において宿主細胞が急速にアポトーシスに陥ることが観察されているが、その意義は不明である。

(3) オートファジーは、細胞が低酸素状態や飢餓に陥った際、自己の蛋白や細胞内小器官を消化することでエネルギーを産生して生き残るための仕組みである。オートファジーは主に細胞死を免れるメカニズムであるため、アポトーシスとオートファジーの間には調節因子を介した相互作用が認められる(Choi AM et al. N Engl J Med. 2013)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、インフルエンザ関連細菌性肺炎において過剰な炎症が生じるメカニズムを宿主細胞のオートファジーに着目して明らかにすることである。また、オートファジーに介入することで過剰な炎症や細胞死を適正化し、抗菌薬に抵抗性である本病態に対する新しい治療法の糸口を見つけ出すことである。

### 3. 研究の方法

#### (1) *In vitro*における検討

① 肺癌細胞株である A549 細胞にインフルエンザウイルスを先行感染させ、更に肺炎球菌を感染させて *in vitro* 重複感染モデルを作成する。A549 細胞に接着・侵入した肺炎球菌の菌数を測定しインフルエンザウイルスの先行感染が肺炎球菌の接着・侵入に及ぼす影響を調べる。また interleukin (IL) -6 の測定を行い、炎症の程度について単独感染と重複感染を比較する。

② 重複感染モデルにおいて、オートファジーの過程で生成される小胞(オートファジー小胞)の検出を経時的に行う。

③ 重複感染モデルにオートファジー阻害薬を作用させ、遺伝子発現がどのように変化するかマイクロアレイを用いて解析する。遺伝子発現が変化したものについては蛋白レベルにおいても測定を行う。

#### (2) *In vivo*における検討

マウスにインフルエンザウイルスを先行感染させ、更に肺炎球菌を感染させて *in vivo*

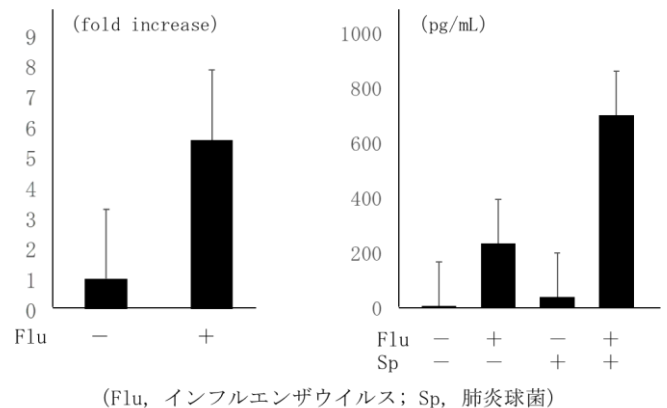
重複感染マウスモデルを作成する。肺組織を採取し、オートファジー関連因子である LC3B の発現を観察する。

### 4. 研究成果

#### (1) *In vitro*における検討

① A549 細胞にインフルエンザウイルスを先行感染させた群では、肺炎球菌の単独感染群と比較して、肺炎球菌の接着・侵入が亢進した(図1)。また、重複感染群では単独感染群と比較して細胞上清中の IL-6 濃度が高値であった(図2)。

図1. A549細胞へのSpの接着・侵入 図2. A549細胞上清中のIL-6濃度



② *In vitro* 重複感染モデルにおいてオートファジー小胞の検出を行った。重複感染 2 時間後にはオートファジー小胞の発現した細胞は少数であったが、5 時間後には多くの細胞で発現を認めた。16 時間後には発現細胞数は減少した(図3)。A549 細胞における重複感染の過程において、時間経過とともにオートファジーが起こることが示唆された。シグナル強度や発現細胞数について、単独感染群と重複感染群で定量的な比較が必要である。

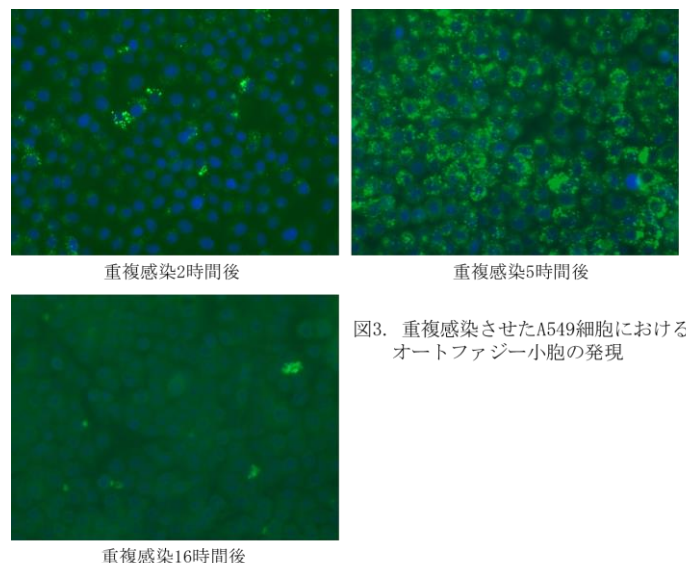


図3. 重複感染させたA549細胞におけるオートファジー小胞の発現

③ *In vitro* 重複感染モデルにオートファジー阻害薬を作用させ、マイクロアレイを用

いて遺伝子発現の変化を解析した。interleukin の中で遺伝子の発現が増加したのは、IL-2 receptor alpha であり、発現が低下したのは IL-6、IL-1 alpha であった。一方で matrix metalloproteinase (MMP) -10 や MMP-13 の発現は増加した。蛋白レベルでの発現を ELISA で測定したところ、オートファジー阻害薬を作用させた群では細胞上清において IL-6 濃度は低下、MMP-10 濃度は上昇しており、遺伝子レベルでの発現と一致した (図 4)。また、オートファジー阻害薬を作用させた群では、肺炎球菌の接着・侵入が減少した (図 5)。細胞障害の程度を LDH assay によって測定したところ、経時的に軽度の細胞障害が認められた (図 6)。オートファジーと細胞死の関係を明らかにするためにアポトーシス関連因子を解析する等、更なる検討が必要である。

図4. 重複感染させたA549細胞上清中のIL-6およびMMP-10濃度

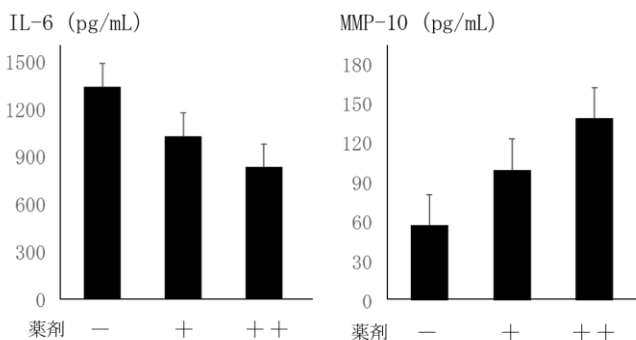
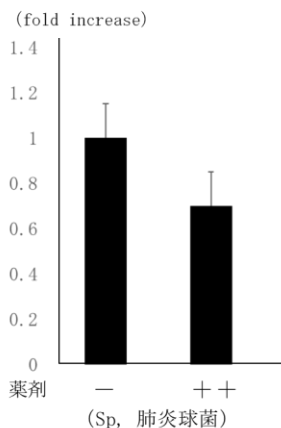


図5. インフルエンザウイルスを先行感染させたA549細胞へのSpの接着・侵入



### (2) *In vivo*における検討

未感染マウス、インフルエンザウイルス、肺炎球菌をそれぞれ単独および重複感染させたマウスから肺を採取し、免疫染色により LC3B の検出を行った。未感染マウスにおいては細気管支周囲に炎症細胞は認められず、LC3B の発現は確認されなかった。一方で、単独感染および重複感染マウスにおいては細気管支周囲に炎症細胞の浸潤を認め、LC3B の発現を認めた (図 7)。単独感染と重複感染の間で定量的な比較が必要である。

図6. 重複感染させたA549細胞上清を用いたLDH assay

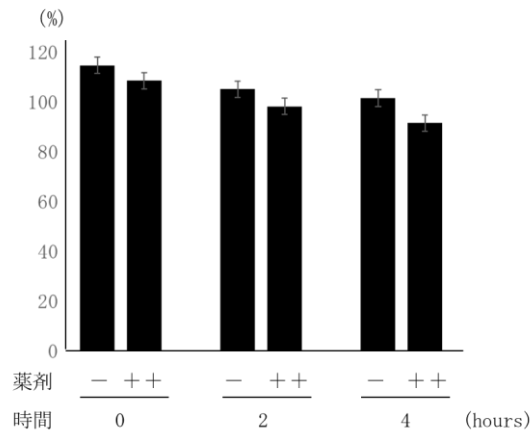
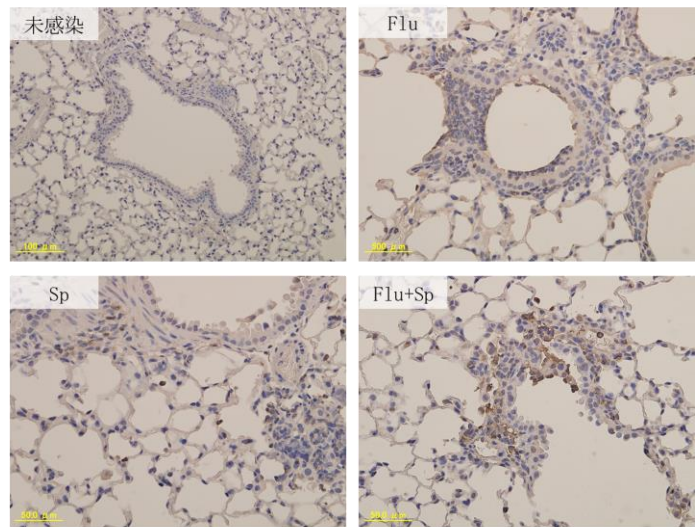


図7. 重複感染させたマウス肺におけるLC3Bの発現



(Flu, インフルエンザウイルス; Sp, 肺炎球菌)

### (3) 考察および今後の展望

これまでの結果よりインフルエンザウイルスと肺炎球菌が重複感染した病態にオートファジーが関与していることが示唆された。*In vitro* 重複感染モデルにオートファジー阻害薬を作用させることで炎症に関連する因子の発現が変化した。免疫細胞が関与する宿主においても同様の変化が起こりうるかどうか、また、宿主にとって有益であるかについてはまだ明らかでなく、引き続き検討を行う必要がある。特にオートファジー阻害薬をマウスに投与する、あるいはオートファジー関連因子のノックアウトマウスを用いることで本病態を発症した生体におけるオートファジーの役割を明らかにすることができると考えられる。今後は LC3B のノックアウトマウスを用いた検討を予定しており、LC3B の欠損が本病態におけるオートファジーの発現や重症化にどのように影響するかを調べる予定である。また、気道上皮に加えて好中球などの炎症細胞にも着目し研究を進める予定である。これまでに行った各実験の再現性の確認も十分に行う必要がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小佐井 康介 (KOSAI, Kosuke)  
長崎大学・病院 (医学系)・助教  
研究者番号 : 70644433

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

柳原 克紀 (YANAGIHARA, Katsunori)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
教授  
研究者番号 : 40315239

森永 芳智 (MORINAGA, Yoshitomo)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
助教  
研究者番号 : 30580360