

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K16747

研究課題名（和文）緑膿菌性肺傷害に対する新規免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Immunotherapy for Pseudomonas aeruginosa Lung Injury

研究代表者

加藤 秀哉（Kato, Hideya）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師

研究者番号：30515284

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）：申請者は、細菌性肺炎の起因菌の中でも、グラム陰性菌の起炎菌として最も頻度の高い緑膿菌性肺炎に対する免疫療法の開発を研究してきた。緑膿菌の病原性メカニズムには三型分泌システムと呼ばれる相同性の高い毒素分泌システムが関与している。また、それに加えて細胞外小胞と呼ばれる細胞外伝達物質が病原性に深く関わっていることが知られてきた。申請者はそれらの病原メカニズムの一部を解明し重症化の予防につなげうることを発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の主な死因別死亡統計において、肺炎が脳血管疾患を抜いて第3位を占めるように至った。この背景には、高齢化社会や医療の高度化に基づく免疫不全患者の増加、抗菌薬の汎用による多剤耐性菌蔓延が深く関わっている。これら肺炎の主な起炎菌には、緑膿菌に代表されるグラム陰性桿菌やMRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)などが含まれる。そこで、新たな方法で病原性細菌に対抗して免疫力を高める予防法や、従来の抗菌薬には頼らない方法で病原性のメカニズムに対抗できる新しい治療法の開発が強く求められており、今回その一部を解明し得た。

研究成果の概要（英文）：The applicants have studied the development of immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa pneumonia, the most frequent Gram-negative bacterial pathogen. The virulence mechanism of Pseudomonas aeruginosa involves a highly homologous toxin secretion system called the type III secretion system. In addition, it is now known that extracellular transmitters called extracellular vesicles are deeply involved in pathogenicity. The applicants have elucidated some of these pathogenic mechanisms, which may lead to the prevention of severe disease.

研究分野：急性肺障害

キーワード：緑膿菌性肺炎 免疫療法 抗体療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の主な死因別死亡統計において、肺炎が脳血管疾患を抜いて第3位を占めるように至った。この背景には、高齢化社会や医療の高度化に基づく免疫不全患者の増加、抗菌薬の汎用による多剤耐性菌蔓延が深く関わっている。これら肺炎の主な起炎菌には、緑膿菌に代表されるグラム陰性桿菌や MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)などが含まれる。

2. 研究の目的

このような背景から、病原性細菌に対抗して免疫力を高める予防法や、従来の抗菌薬には頼らない方法で病原性のメカニズムに対抗できる新しい治療法の開発が強く求められている。申請者らは、グラム陰性菌の起炎菌として最も頻度の高い緑膿菌性に対する免疫療法を検討してきた。これまでの研究で、細菌感染症に対して現在臨床で唯一使用可能な抗体製剤である市販ガンマグロブリン製剤には、緑膿菌性肺傷害に対して保護効果があることを見出した。その改善のメカニズムとして、緑膿菌の主要な病原毒性である III 型分泌システムの阻害に加えて、緑膿菌の未同定の表面抗原に対する抗体分画が関与していることが解った。

一方で細胞外小胞の一種であるエクソソームは、約 100nm 前後の大きさで各種タンパクや microRNA が内包されており、細胞間伝達物質として知られている。エクソソームはリン脂質を主成分とする小さな粒子で、生理的あるいは病的な状態のいずれにおいても、あらゆる細胞から細胞外環境へ放出される。またエクソソームはヒトだけでなく、細菌からも分泌されることが明らかになっており、宿主細胞への傷害性だけでなく、免疫の賦活化という相反する働きも報告されている。今回のプロジェクトにおいて、緑膿菌由来のエクソソームの傷害性および内包されているタンパクの同定を行い、抗菌薬治療だけに頼らないワクチン・抗体療法の開発を目指すことが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

緑膿菌性肺炎の病原性には、他のグラム陰性菌と同様、極めて相同性の高い三型分泌システムと呼ばれる毒素分泌システムが関与している。また、細胞外小胞であるエクソソームと呼ばれる細胞外伝達物質も病原性の発揮に関与している。これらの病態メカニズムを、マウス緑膿菌性肺炎モデルや気管上皮細胞を用いた *in vitro* での細胞傷害実験にて検証した。

緑膿菌 PA103 株を用いたマウス急性肺傷害モデルの作成

マウスに対して吸入麻酔薬を用いて全身麻酔下で致死量の緑膿菌を気管内に投与した。これらの効果判定として、肺胞構造の解析を中心に免疫組織学的、生理学的検討を加えた。具体的には、緑膿菌投与後 24 時間までの体温・生存率を測定し、24 時間の時点で肺の浮腫の程度の定量評価を行い、また肺内・血中細菌数、各種サイトカイン、MPO (ミエロペルオキシダーゼ) 活性等炎症パラメータも併せて測定した。肺の組織図も記録し比較した。

細胞外小胞エクソソームの抽出

前述のマウス緑膿菌性肺炎モデルを作成後、気管内への緑膿菌投与 24 時間後にマウスの気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収した。比較対象として、健常マウスからも BALF を回収した。血球成分や夾雑物を除去するために、BALF を遠心したのち上清を回収しその後、超遠心機 (XL-90, Ultracentrifuge: Beckman Coulter, CA, USA) を用いて、4 °C, 100000g, 1 時間 × 2 回の工程でエクソソームを沈殿分画にして回収した。ナノ粒子測定機器であるナノサイト NS300 (Malvern Panalytical, CA, USA) を用いてエクソソームの収量・粒子径を測定し定量評価を行った。また緑膿菌由来のエクソソームを取り込んだ宿主細胞を、各種蛍光抗体試薬を用いてフローサイトメトリーにより同定した。その後エクソソームの傷害性の評価を、ヒト気管上皮細胞 A549 を培養し、エクソソームを投与することにより細胞傷害アッセイキットである CCK-8 kit (Cell Counter Kit-8, Dojindo, Japan) を使用し、投与 1, 2, 3, 4 時間後にそれぞれマイクロプレートリーダーで吸光度 (OD: 450nm) を測定し、傷害性を定量評価した。

4. 研究成果

三型分泌システムの毒素分泌システムに関わる V 抗原タンパクの相同性を他のグラム陰性菌とも比較し確認し得た。またマウス重症緑膿菌性肺炎の際に放出される細胞外小胞の病態メカニズム・役割を明らかにした。

加えて、緑膿菌肺炎マウスの BALF から分離したエクソソーム (I-EV) は細胞毒性があり、CD44 受容体をブロックするとそれらエクソソームの細胞毒性が低下した。その上で、高分子ヒアルロン酸を静脈内投与すると、エクソソーム上の CD44 レセプターを介してこれらの炎症性エクソソームに結合し、傷害された肺胞の炎症を抑え、内皮の透過性を改善し、細菌の増殖を抑えることが明らかになった。これらの結果は、高分子ヒアルロン酸を投与することで、緑膿菌に限らず他の細菌性肺炎に対する治療効果も期待できることを示唆した。一方で、I-EV は、緑膿菌三型分泌

毒素のひとつである ExotoxinU(ExoU)やエキソトキシン A などの毒素を小胞内に内包している証拠を見出すことはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Naito Yoshifumi, Kato Hideya, Zhou Li, Sugita Shinji, He Hongli, Zheng Justin, Hao Qi, Sawa Teiji, Lee Jae-Woo	4. 巻 57
2. 論文標題 Therapeutic Effects of Hyaluronic Acid Against Cytotoxic Extracellular Vesicles Released During Pseudomonas Aeruginosa Pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 408 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001846	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 Kinoshita Mao, Shimizu Masaru, Akiyama Koichi, Kato Hideya, Moriyama Kiyoshi, Sawa Teiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Epidemiological survey of serum titers from adults against various Gram-negative bacterial V-antigens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220924	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 Lee Jae Hoon, Liu Airan, Park Jeong-Hyun, Kato Hideya, Hao Qi, Zhang Xiwen, Zhou Li, Lee Jae-Woo	4. 巻 54
2. 論文標題 Therapeutic Effects of Hyaluronic Acid in Peritonitis-Induced Sepsis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 488 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001512	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 Liu Airan, Park Jeong-Hyun, Zhang Xiwen, Sugita Shinji, Naito Yoshifumi, Lee Jae-Hoon, Kato Hideya, Hao Qi, Matthay Michael A., Lee Jae-Woo	4. 巻 200
2. 論文標題 Therapeutic Effects of Hyaluronic Acid in Bacterial Pneumonia in Ex Vivo Perfused Human Lungs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 1234 ~ 1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.201812-22960C	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 Qi Hao, Gudapati V, Monseil A, Park JH, Hu S, Kato H, Lee JH, Zhou L, He H, Lee JW.	4. 巻 203
2. 論文標題 Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Decrease Lung Injury in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1961 ~ 1972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1801534. Epub 2019 Aug 26.	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 Kinoshita Mao, Shimizu Masaru, Akiyama Koichi, Kato Hideya, Moriyama Kiyoshi, Sawa Teiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Epidemiological survey of serum titers from adults against various Gram-negative bacterial V-antigens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220924	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 Lee Jae-Woo, Kato Hideya	4. 巻 3
2. 論文標題 Should We Stop for Growth Arrest-specific 6 in Acute Respiratory Distress Syndrome?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000002204	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 Naito Y, Hamaoka S, Kinoshita M, Kainuma A, Shimizu M, Katoh H, Moriyama K, Ishii KJ, Sawa T.	4. 巻 12
2. 論文標題 The protective effects of nasal PcrV-CpG oligonucleotide vaccination against Pseudomonas aeruginosa pneumonia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 774 ~ 785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12658.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤秀哉
2. 発表標題 Exosomes Released During Pseudomonas aeruginosa Pneumonia are Inflammatory and Cytotoxic
3. 学会等名 IARS (International Anesthesia Research Society) Annual Meeting and International Science Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------