

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09544

研究課題名(和文) 加齢に伴うオートファジーの減弱が肺炎・誤嚥性肺炎に及ぼす影響とその制御機構の解明

研究課題名(英文) The effect of age-related attenuation of autophagy on pneumonia and aspiration pneumonia

研究代表者

猪俣 恵 (INOMATA, Megumi)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：40553798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マクロファージにおける肺炎レンサ球菌とオートファジー/LC3 associated phagocytosis (LAP)の関連性について調べた。肺炎レンサ球菌はマクロファージにおいて、LAPを誘導した。LAPは肺炎レンサ球菌を分解・排除し、炎症の調節に関与した。重要なことに、老齢マウス由来のマクロファージでは、若齢マウス由来のマクロファージと比較してLAPが減弱した。本研究の遂行により、加齢によるLAPの減弱が肺炎レンサ球菌に対する分解・排除機構の破綻を引き起こすことが明らかとなり、高齢者に肺炎および誤嚥性肺炎が好発するメカニズムの一端を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎レンサ球菌に対する感受性は65歳以上の高齢者で著しく高くなり、高齢者人口の急増する日本や米国では肺炎レンサ球菌感染症による死亡が増加し問題となっている。本研究では、高齢者に肺炎レンサ球菌感染症が好発するメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

研究を遂行した結果、加齢により肺炎レンサ球菌の誘導するオートファジー/LAPが減弱し、その結果、肺炎レンサ球菌に対する分解・排除機構が破綻することを明らかにした。得られた成果は、高齢者における肺炎病態の発症・進展メカニズムに関与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the relationship between Streptococcus pneumoniae and autophagy / LC3 associated phagocytosis (LAP) in macrophages. We found that macrophages utilize LAP, rather than canonical autophagy, to both eliminate S. pneumoniae and modulate inflammation. Notably, compared to young macrophages, aged macrophages were deficient in LAP, resulting in compromised bacterial killing and enhanced proinflammatory responses. Thus, S. pneumoniae triggers LAP in macrophages, a process that controls both microbial numbers and tissue-damaging inflammation. Importantly, LAP diminishes with age and may contribute to the observed susceptibility of the elderly to many infectious diseases.

研究分野：感染症

キーワード：オートファジー LAP 加齢 肺炎レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

肺炎連鎖球菌（肺炎球菌）*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) は無症状で鼻咽頭にコロニーを形成するが、下気道に感染して肺炎を引き起こし、血流に広がると敗血症や髄膜炎などの侵襲性感染症を起こす。肺炎球菌に対する感受性は65歳以上の高齢者で著しく高くなり、高齢者人口の急増する日本や米国では肺炎球菌感染症による死亡が増加し問題となっている。肺炎球菌性肺炎の病巣には、マクロファージの急速で活発な浸潤がみられる。マクロファージは肺炎球菌を直接排除するだけでなく、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターロイキン-1 β (IL-1 β) およびインターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインを分泌し肺炎の病態を制御する。実際、マウスおよびヒトにおいて、マクロファージ受容体の欠損や貪食細胞の数または機能の欠陥は肺炎の病態を進展させることが明らかにされている。しかしながら、マクロファージの肺炎球菌に対する免疫防御機構の詳細や老化に伴う変化については十分に理解されていない。マクロファージの病原体排除の重要な機構の一つとして、細胞外の病原体を貪食し分解する LC3-associated phagocytosis (LAP) があげられる。LAP は2007年にマクロファージでオートファジー関連因子である light chain 3 (LC3) を用いる特殊なファゴサイトーシスとして発見された。オートファジーでは二重膜の LC3 陽性オートファゴソームで対象物を包んだ後リソソームと融合し分解するが、LAP では一重膜の LC3 陽性ファゴソーム (LAPosome) で包み分解する。LAPosome の形成には LC3 の他にもオートファゴソームの形成に関連する因子が必要であるが、オートファゴソームの形成に関連しない因子も必要であることが明らかにされている。LAP は病原体排除だけでなく炎症性サイトカイン産生の抑制など免疫調節にも関与することが報告されている。

2. 研究の目的

現在までに、肺炎球菌は上皮細胞や線維芽細胞において膜孔形成毒素であるニューモリシン (PLY) を介してオートファジーを誘導し分解されることが明らかにされている。しかしながら、マクロファージにおいて肺炎球菌はオートファジーまたは LAP を誘導するかどうか、またその誘導能が老化とともに変化するののかについては明らかにされていない。本研究では、加齢に伴い、高齢者に肺炎・誤嚥性肺炎が好発する理由をオートファジーに着目して明らかにすることを目的とした。

本研究の遂行によって、申請者らは、肺炎球菌がマクロファージにおいて PLY 依存的に LAP を誘導すること、同菌は LAP を介してリソソームで分解・排除されること、さらに肺炎球菌の誘導する LAP は老化とともに破綻するため同菌のマクロファージでの生存率が増加し炎症性サイトカインの発現誘導が亢進されることを明らかにした。

3. 研究の方法

若年マウス (2 か月齢)・老年マウス (22~26 か月齢) より分離したマクロファージに肺炎球菌を一定時間感染させた。培養上清を取り除いた後、ゲンタマイシンを含む培地に交換し一定時間培養後、培地を除き細胞を洗浄・溶解する。細胞溶解液を希釈し、寒天培地に播種し培養後 CFU を測定することで、若年・老年マウスの細胞内の肺炎球菌分解能の差異を解析した。この際、オートファジーの程度をオートファジー誘導マーカーである LC3-II の発現量に着目してウェスタンブロットによって調べた。オートファゴソームあるいは LAPosome の形成は、マクロファージに肺炎球菌を感染させた後、電子顕微鏡観察にて解析した。

4. 研究成果

4-1. マクロファージにおいて肺炎球菌は PLY 依存的に LAP を誘導する

申請者らは、マクロファージにおいて肺炎球菌はオートファジーまたは LAP を誘導するかどうかを調べるために、若年マウス (2 か月齢) 由来骨髄マクロファージに肺炎球菌を感染させた。肺炎球菌は LC3-II の発現 (LC3-I の膜結合型であり、LC3-II の発現増加は LC3 陽性オートファゴソームならびに LAPosome 形成の指標となる) を時間経過的に誘導した (図 1A)。PLY の関与を調べたところ、PLY 欠損株は LC3-II を誘導しなかった。緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグ付き LC3 (GFP-LC3) を発現させたマクロファージでは、肺炎球菌の約 35% が 30 分以内に LC3 と共局在し、その共局在は 90 分後には減少した。オートファゴソームならびに LAPosome の形成に関与する Atg5 または Atg7 を欠損させたマウス由来マクロファージでは LC3 と共局在する肺炎球菌の割合が減少した。したがって、マクロファージにおいて肺炎球菌は PLY 依存的に Atg5 および Atg7 を必要とする LC3 陽性オートファゴソームまたは/ならびに LAPosome の形成を誘導すると考えられた。

オートファジーは数時間で誘導されるのに対し、LAP は数分で誘導されることが明らかにされている。肺炎球菌と LC3 の共局在は感染後 30 分以内に生じたことより、LAP が肺炎球菌への LC3 の動員に関与していると推測した。LAP の誘導にはオートファジーの誘導には関与しない NADPH オキシダーゼを介した活性酸素種 (ROS) の産生が必要とされる。そこでまず、肺炎球菌が ROS の産生を誘導するかどうかを調べた。肺炎球菌は NADPH オキシダーゼの細胞膜成分 gp91 phox (NOX2) ならびに細胞質成分 (p40phox) と共局在するとともに強力に ROS の産生を誘導した。続いて、LAP の誘導に必須の因子である Rubicon の関与を調べた。Rubicon 欠損マウス由来のマクロファージでは LC3 と共局在する肺炎球菌の割合が減少した。一方で、オートファジーの誘導

に必須の因子であり LAP の誘導には関与しない Atg14 欠損マウスのマクロファージでは影響がみられなかった。またオートファジーの誘導には mTOR 経路の不活性化が必要であり、mTOR 基質である p70S6K の脱リン酸化が生じるが、肺炎球菌を感染させたマクロファージでは p70S6K の脱リン酸化を認めなかった。最後に、オートファジーでは対象物が二重膜のオートファゴソームに包まれ分解されるが、LAP では一重膜の LAPosome に包まれることから、肺炎球菌が二重膜あるいは一重膜のどちらに包まれるのかを調べた。オートファジーの誘導因子であるラパマイシンで処理されたマクロファージでは二重膜構造が認められた (図 1B)。LAP を誘導することが報告されているザイモサン (酵母の細胞壁の多糖質) は一重膜に包まれていた (図 1B)。肺炎球菌はザイモサンと同様に一重膜に包まれていた。これらの結果から、肺炎球菌はオートファジーではなく Atg5、Atg7、Rubicon ならびに NADPH オキシダーゼを介した ROS 産生依存的に LC3 陽性一重膜の LAPosome の形成、すなわち LAP を誘導すると考えられた。

4-2. LAP は肺炎球菌を分解する

LAP は貪食した病原体を LAPosome に包み最終的にリソソームで分解する。ほとんどの LC3 陽性肺炎球菌はリソソーム関連膜タンパク質 (LAMP-2) と共局在した。そこで実際に LAP は肺炎球菌の分解・排除に関与するのかどうかを調べた。コントロールマウス由来マクロファージでは肺炎球菌の生存率が減少した。Rubicon 欠損マウス由来マクロファージではコントロールマウス由来マクロファージに比べて生存率が増加した。同様に、Atg7 または NOX2 が欠損したマウス由来マクロファージではコントロールマウスに比べて生存率が増加した。しかしながら一方で、Atg14 欠損マウス由来のマクロファージではコントロールマウスと同程度に肺炎球菌の生存率が減少した。これらの結果からマクロファージにおいて LAP は肺炎球菌の殺傷に関与すると考えられた。

4-3. LAP による肺炎球菌分解機構は老化により減弱し、肺炎球菌に対する炎症性サイトカインの誘導が亢進する

オートファジーは老化とともに減弱することが明らかにされている。また、高齢者では肺炎球菌感染症の感受性が亢進する。これらのことより、肺炎球菌の LAP 誘導能が老化とともに変化するのかどうかを調べるため、若年マウスおよび老年マウス (22~26 か月齢) 由来のマクロファージに肺炎球菌を感染させ LC3-II 量を比較した。若年マウス由来マクロファージは LC3-II の発現を誘導した (前述) が、老年マウス由来マクロファージでは LC3-II の誘導がみられなかった (図 1A)。また肺炎球菌と LC3 の共局在は老年マウス由来マクロファージで明らかに減少した。これらの結果から、肺炎球菌の誘導する LAP は老化により減弱すると示唆された。老化に伴う LAP の低下が、肺炎球菌殺傷能に及ぼす影響を調べた。老年マウス由来マクロファージでは若年マウス由来マクロファージと比較して肺炎球菌の生存率が増加した。Rubicon のサイレンシングは若年マウス由来マクロファージにおける肺炎球菌の生存率を増加させた (前述) が、老年マウス由来マクロファージには影響を及ぼさなかったことから、LAP による肺炎球菌分解機構は老化により破綻すると考えられた。

LAP は炎症性サイトカイン産生の抑制など免疫調節能にも関与することが明らかにされている。LAP がマクロファージの肺炎球菌に対する炎症応答に影響を及ぼすのかどうかを調べた。老年マウス由来マクロファージでは若年マウス由来マクロファージに比べて肺炎球菌に対して高レベルの TNF- α 、IL-6、および IL-1 β の発現が誘導された。Rubicon のサイレンシングは若年マウス由来マクロファージにおいてこれらのサイトカインの発現をさらに誘導したが、老年マウス由来マクロファージには影響を及ぼさなかった。これらの結果から、老化に伴う LAP の誘導の減弱は肺炎球菌生存率を増加させ、その結果、同菌に対する炎症性サイトカインを増加させると考えられた。

4-4. おわりに

本研究においてマクロファージにおける肺炎球菌とオートファジー/LAP の関連性について調べたところ、肺炎球菌は PLY 依存的に LAP を誘導すること、肺炎球菌は LAP を介してリソソームで分解・排除されること、さらに肺炎球菌の誘導する LAP を介した同菌の分解機構は老化とともに破綻し、その結果、炎症性サイトカインの発現誘導を亢進させることが明らかになった (図 2)。マクロファージ LAP の肺炎球菌に対する免疫防御機構とその老化との関連は、高齢者における肺炎病態の進展メカニズムに関与すると考えられる。今後の研究では、なぜ老化に伴い肺炎球菌の誘導する LAP が減弱するのかを肺炎モデルマウスを使いながら調べることで、超高齢社会の日本における健康寿命の延伸に向けた取り組みに貢献できたらと考える。

図1A

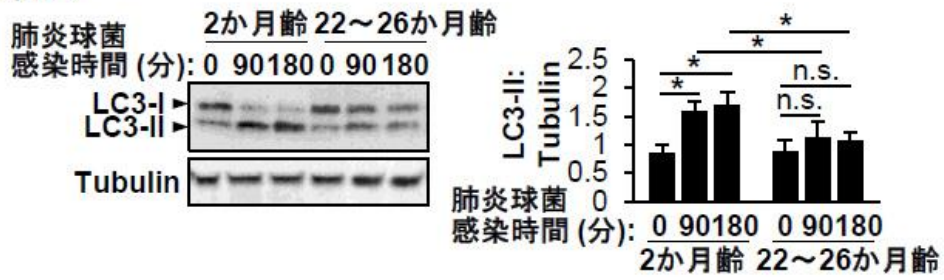


図1B

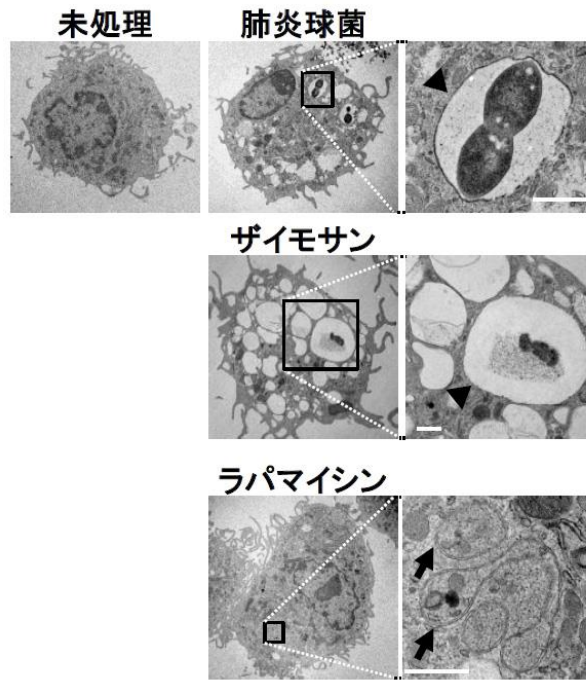
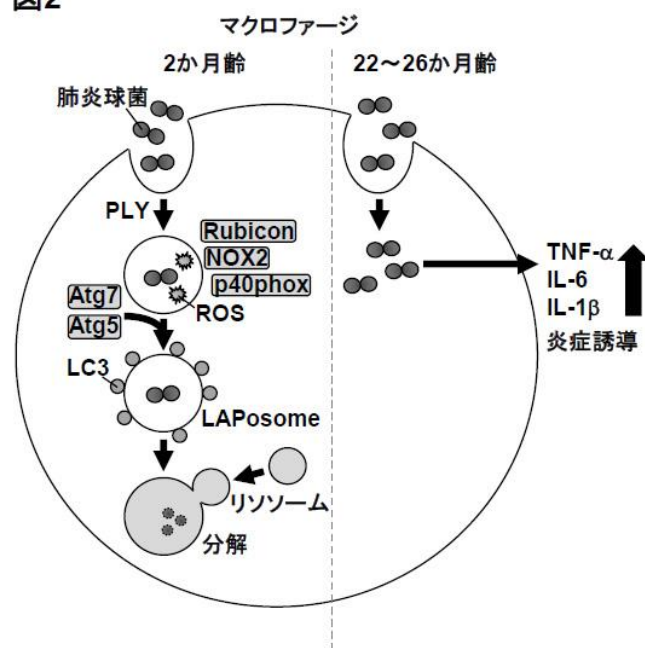


図2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 猪俣 恵	4. 巻 93(4)
2. 論文標題 マクロファージにおけるLC3-associated phagocytosisを介した肺炎連鎖球菌に対する免疫防御機構;老化との関連	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 562-565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930562	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 猪俣 恵	4. 巻 36
2. 論文標題 肺炎レンサ球菌に対する自然免疫の加齢変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 46-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Inomata Megumi, Xu Shuying, Chandra Pallavi, Meydani Simin N., Takemura Genzou, Philips Jennifer A., Leong John M.	4. 巻 117
2. 論文標題 Macrophage LC3-associated phagocytosis is an immune defense against Streptococcus pneumoniae that diminishes with host aging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 33561 ~ 33569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2015368117	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 該当する
1. 著者名 Inomata Megumi, Horie Toshi, Into Takeshi.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of the Antimicrobial Peptide LL-37 on Gene Expression of Chemokines and 29 Toll-like Receptor-Associated Proteins in Human Gingival Fibroblasts Under Stimulation with Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Probiotics Antimicrob Proteins.	6. 最初と最後の頁 64-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12602-019-09600-2.	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 猪俣 恵、堀江 俊、引頭 毅	4. 巻 45
2. 論文標題 オートファジーと老化の関連性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 岐阜歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 猪俣恵 ジョンレオン
2. 発表標題 肺炎連鎖球菌に対するLC3-associated phagocytosisを介した免疫防御は加齢とともに減弱する
3. 学会等名 第95回日本細菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Megumi Inomata, Masayo Abe, Takeshi Into.
2. 発表標題 Outer membrane proteins of Porphyromonas gingivalis are involved in the resistance to antimicrobial peptides
3. 学会等名 第66回JADR総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Megumi Inomata, Shuying Xu, Pallavi Chandra, Simin Meydani, Jennifer Philips, John Leong
2. 発表標題 Macrophage LC3-associated phagocytosis is an immune defense against Streptococcus pneumoniae that diminishes with host aging
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Megumi Inomata, Shuying Xu, Pallavi Chandra, Simin N. Meydani, Jennifer A. Philips, and John M. Leong
2. 発表標題 Aging impairs macrophage LC3-associated phagocytosis-mediated immune defense against Streptococcus pneumoniae
3. 学会等名 The 99th General Session of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

明海大学 微生物学 https://www.meikai.ac.jp/about/information/degree/dentistry/715.html
--

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
研究分担者	岩橋 均 (IWAHASHI Hitoshi) (60356540)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	

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		
米国	Tufts University School of Medicine		