

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08507

研究課題名（和文）好中球機能に着目したインフルエンザ関連細菌性肺炎の重症化機序解明

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

研究代表者

小佐井 康介（KOSAI, Kosuke）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：70644433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザ感染後の肺炎球菌性肺炎における好中球の表現型や機能を解析した。インフルエンザの先行感染がある場合、肺炎球菌の肺への接着が亢進した。肺における好中球の割合は、未感染群、肺炎球菌単独感染群、重複感染群の順に増加傾向を示した。重複感染群では未感染群と比較して骨髄中のCD49dを発現している好中球の割合が高かった。また、重複感染群では肺炎球菌単独感染群と比較して肺から分取された好中球におけるSOCS3 mRNAの発現が亢進していた。重複感染させたマウスの骨髄細胞に含まれる高密度と低密度の細胞の比較では、好中球の割合は前者が高い一方、CD49dを発現している好中球の割合は後者が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、好中球は不均一な細胞集団であり、好中球の中にも表現型や機能が異なるものが含まれる可能性が報告されている。本研究ではインフルエンザ関連細菌性肺炎の病態に関して骨髄や肺における好中球機能に着目して解析を行った。更なる研究によってインフルエンザ関連細菌性肺炎の重症化に関わる特徴的な好中球やその機能を明らかにすることができれば、病態を新しい側面から解明できるとともに治療法の開発などへの発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed phenotype and function of neutrophils in pneumococcal pneumonia following influenza virus infection. Prior influenza infection enhanced pneumococcal adhesion in lungs. The rate of neutrophils in lungs increased in co-infected group compared to uninfected group. We observed higher rate of CD49d-positive neutrophils in bone marrow in co-infected group compared to uninfected group. The SOCS3 mRNA expression in lungs increased in co-infected group compared to single pneumococcal infection group. In comparison between high- and low-density cells obtained from bone marrow of co-infected mice, the rate of neutrophils was higher but that of CD49d-positive neutrophils was lower in high-density cells than in low-density cells.

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 好中球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザウイルスに感染した際、肺炎球菌などによる細菌感染が合併して重症化することがある。通常の急性感染症において、炎症は病原体の排除に必要な免疫応答であるが、過度な炎症は自身の臓器傷害を引き起こし重症化の一因となる。

(2) 好中球は体内に侵入した細菌を貪食・殺菌する古典的な機能に加え、好中球プロテアーゼや活性酸素種の産生、好中球細胞外トラップなど細胞外の病原体に対する機能も有している。

(3) インフルエンザウイルスの先行感染後に細菌を感染させたマウスモデルを用いた過去の研究では、インターフェロン- γ 受容体が欠損したマウスの方が野生型マウスよりも好中球機能を介した肺炎球菌のクリアランスや予後が良いこと、インフルエンザウイルスの先行感染が G-CSF や好中球ミエロペルオキシダーゼ活性を抑制することによって緑膿菌のクリアランスを低下させること、などが報告されている。これらの報告を考慮するとインフルエンザに肺炎球菌感染が合併した病態においても好中球機能が重症化に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インフルエンザウイルスが先行感染した後に肺炎球菌が感染した病態の重症化メカニズムを、好中球機能に着目して解明することである。

3. 研究の方法

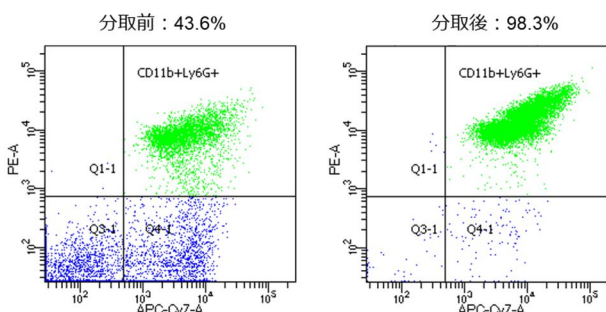
(1) マウスモデルの作成と試料の採取

マウスに経気道的にインフルエンザウイルスを感染あるいは PBS を投与した後に肺炎球菌を感染させた。均質化した肺、肺を破碎して分散させた細胞、大腿骨・脛骨の骨髓腔のフラッシュにより採取した細胞を試料とした。

図1. 好中球の割合

(2) 好中球の分離

好中球マーカーである Ly6G に対する抗体とビーズを用いて Ly6G 陽性細胞を分取した。CD45/CD11b/Ly6G 陽性細胞を好中球とした。未感染のマウスの骨髓腔から採取した細胞および Ly6G 陽性細胞を分取した後の試料における好中球分画の例を示す(図1)。



(3) 解析

肺炎球菌の肺内生菌数、および好中球の表現型、機能に関する遺伝子発現量の測定やフローサイトメトリーによる解析を行った。

4. 研究成果

(1) 重複感染と肺炎球菌単独感染の比較

肺炎球菌の接着

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、肺内生菌数が増加した(図2)。

骨髓と肺における好中球の割合

骨髓と肺における好中球(CD45/CD11b/Ly6G 陽性細胞)の割合について未感染群、肺炎球菌単独感染群、重複感染群で比較した。骨髓における好中球の割合は3群間で差を認めなかった。一方、肺においては未感染群、肺炎球菌単独感染群、重複感染群の順に増加傾向を示した(図3A)。重複感染群では未感染群よりも骨髓から採取した細胞においてCD49dを発現している好中球の割合が高かった。肺においても重複感染群では未感染群、肺炎球菌単独感染群と比較してCD49dを発現している好中球の割合が高い傾向を示したが有意ではなかった(図3B)。

図2. 肺内生菌数 (cfu/mL)

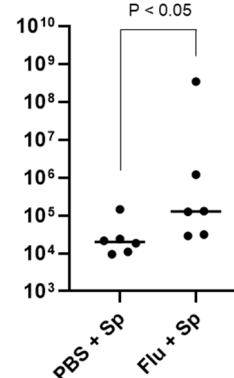


図3A. 好中球の割合 (%)

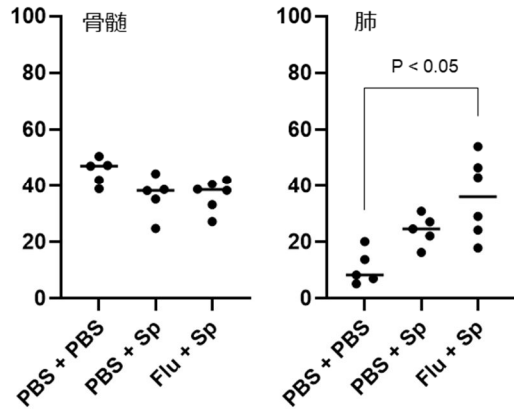
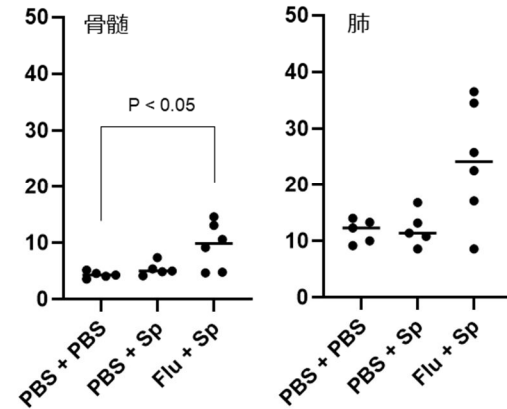


図3B. 好中球におけるCD49d陽性細胞の割合 (%)



骨髄と肺から分取した好中球における遺伝子発現

重複感染群と肺炎球菌単独感染群のマウスの骨髄と肺の細胞を採取し Ly6G 陽性細胞を分取した。それらの遺伝子発現を解析したところ、重複感染群では肺炎球菌単独感染群と比較して肺の好中球における suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA の発現が亢進していた (図4)。

(2) 密度の異なる好中球の比較

重複感染させたマウスの骨髄から採取した細胞を密度勾配遠心法により高密度と低密度の細胞に分離し好中球 (CD45/CD11b/Ly6G 陽性細胞) の割合や表現型を比較した。高密度の細胞では低密度の細胞よりも好中球の割合が高かった (図5A)。一方、CD49d を発現している好中球の割合は低密度の好中球において高密度の好中球よりも高かった (図5B)。

図4. 好中球におけるSOCS3 mRNA発現量(相対値)

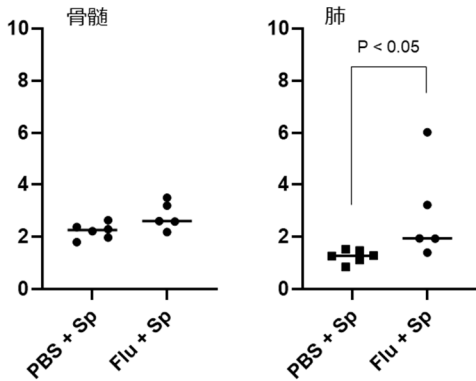


図5A. 好中球の割合 (%)

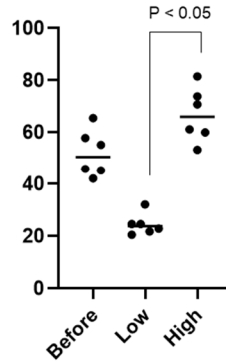
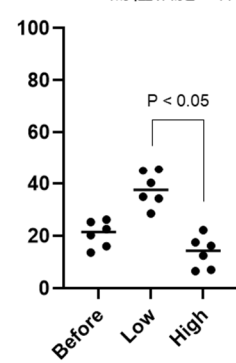


図5B. 好中球におけるCD49d陽性細胞の割合 (%)



(3) 考察

先行するインフルエンザウイルス感染がある場合、肺炎球菌の肺内生菌数が増加しており肺炎球菌のクリアランスが低下していることが示唆された。また、骨髄における好中球の割合は変化しないものの、肺の白血球に占める好中球の割合は重複感染群において未感染群よりも増加した。重複感染群と肺炎球菌単独感染群の骨髄と肺から分取された好中球における遺伝子発現の比較では、重複感染群のマウスの肺より分取された好中球において SOCS3 mRNA の発現が亢進していた。また、骨髄細胞のうち CD49d を発現している好中球の割合は重複感染群において未感染群よりも高かった。既報では、様々な病態において低密度の好中球が認められており、その性質も異なる可能性が報告されている。本研究では、重複感染したマウスから採取した骨髄細胞のうち高密度の細胞では低密度の細胞よりも好中球の割合が高い一方、CD49d を発現している好中球の割合は低密度の好中球において高密度の好中球よりも高かった。CD45/CD11b/Ly6G 陽性細胞として定義された好中球の中に密度が異なる細胞集団があり、それぞれに表現型が異なる細胞が含まれている可能性がある。これまでに行った各実験について再現性の確認を十分に行うとともに、表現型の異なる好中球が細菌クリアランスの低下や重症化にどのように関与しているかについて更に研究を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小佐井 康介、柳原 克紀
2. 発表標題 呼吸器感染症における 重複・二次感染の病態と治療戦略
3. 学会等名 第92回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第65回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第70回日本化学療法学会西日本支部総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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
研究協力者	柳原 克紀 (YANAGIHARA Katsunori) (40315239)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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