

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08516

研究課題名（和文）ヒト早発性老化症候群モデルマウスによるアシネトバクター感染の重症化機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanisms of Acinetobacter infection in klotho knockout mice

研究代表者

佐藤 義則（Sato, Yoshinori）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：90455402

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）：高齢者におけるA. baumanniiの感染重症化機序については不明な点が未だ多い。本研究から、A. baumannii感染klotho KOマウスの肺では、好中球の活性化が起こらず、殺菌能力が不十分であること、さらに炎症性サイトカインの強い誘導を示すことが明らかとなり、感染に伴う急速な肺炎の悪化が示唆された。また以前の研究から、樹状細胞の誘導も少なく獲得免疫系の活性化も期待できないことや、感染に伴うklotho KOマウスの体重変動が少ないことから、見た目には感染症状が現れにくい可能性がある。抗菌薬の投与と肺の炎症の制御によって、感染の重症化を抑制することが致死率低下に繋がると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢宿主におけるアシネトバクター感染症では、急速に重症化し致死率も高い。本研究から、高齢宿主では、A. baumannii感染に対して誘導される免疫細胞の活性化が減弱しており殺菌力が低下している一方で、肺組織で強い炎症反応が誘導されることが示唆された。高齢者におけるアシネトバクター感染症では、早期に肺に移行性の高い抗菌薬による治療を行うとともに、肺炎の急速な悪化を抑制する治療が必要と推測された。今後、感染メカニズムのさらなる解析によって、重症化の抑制と致死率の低下に貢献することができると期待される。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms of severe infection in aged host infected with A. baumannii have remained unclear. Therefore, to clarify the elicitation of severe infection caused by A. baumannii in aged hosts, we established A. baumannii-infected mouse model using klotho KO mice and analyzed the immune responses of in the mice. Klotho KO mice demonstrated that the activation of immune cells such as neutrophils attenuated in the lungs of klotho KO mice after the infection of A. baumannii. On the other hand, the proinflammatory cytokines such as IL-1 excessively increased in the lungs of klotho KO mice infected with A. baumannii. However, the body weight hardly decreased before death. Our study suggests that alteration of immune responses in aged hosts induces severe infection of A. baumannii and it is necessary to treat suitable antibiotics for the killing of A. baumannii and also regulate the inflammation in the lungs.

研究分野：微生物学 免疫学

キーワード：アシネトバクター・バウマニ ヒト早発性老化症候群モデルマウス 日和見感染 高齢者 免疫応答

1. 研究開始当初の背景

Acinetobacter baumannii は、肺炎や尿路感染症、腹腔内感染症、敗血症を引き起こす院内感染症として、高齢者、重篤な基礎疾患や免疫不全、血管内カテーテル挿入、人工呼吸器装備、長期入院といった危険因子のある患者で問題となる菌である。また高齢者への感染は、急速に重症化し致死率も高い。また世界的にも多剤耐性および病原性が増大し、数多くの重症院内感染症の問題となる6種類の菌種「ESKAPE」に *A. baumannii* は含まれており、さらなる研究と治療法の確立が必要とされている (Mulani MS, et al., *Front. Microbiol.*, 2019)。特に高齢者においては、弱毒菌であるにも関わらず肺炎や敗血症を発症すると致死率が 40-60%と高いことが知られているが、その原因は不明である。

A. baumannii の健常人に対する病原性は弱く、健常マウスを用いた *A. baumannii* の感染実験モデルでは、高齢者の感染病態を反映した解析をすることが難しい。そのため、高齢者における *A. baumannii* の感染重症化機序については不明な点が未だ多い。そこで、6週齢頃までに胸腺の萎縮や動脈硬化などの老化表現型が見られる *klotho* 遺伝子が欠損したヒト早発性老化症候群モデルマウス (*klotho* マウス) を用いた *A. baumannii* 感染 *klotho* マウスモデルを構築し、高齢宿主を想定した *A. baumannii* 感染による敗血症の誘導、感染の重症化の解析を行うことが求められていた。

2. 研究の目的

A. baumannii は弱毒菌であり、健常人や若年者では感染症を引き起こさないが、高齢者に感染した際の致死率は高く、その原因は不明である。これまでの研究で我々は、高齢宿主をターゲットにした *klotho* KO マウス(老化表現型)とそのコントロールマウス(*klotho* wild type (WT) マウス, 若齢)による日和見感染モデルを構築し、*A. baumannii* 感染に対する免疫応答を解析してきた。その結果、*A. baumannii* 感染後の肺では、好中球やマクロファージが誘導されたにもかかわらず、殺菌が不十分であることを明らかにした。しかし、なぜ殺菌が不十分であるかは不明である。そこで本研究では、*A. baumannii* 感染 *klotho* KO マウスの殺菌力が弱い原因と好中球等活性化に関わる Th17 細胞等や炎症惹起の機序を解析することを目的とした。

さらに高齢宿主への *A. baumannii* の感染では肺組織での殺菌が不十分であることから、抗菌薬による治療が必須となるが、近年では *A. baumannii* の薬剤耐性菌の出現が問題となっており、使用できる抗菌薬の種類が限られてきている。そこで既存の抗菌薬の併用による治療効果の改善を目指した各種抗菌薬の併用効果について解析した。以上の研究から、高齢者における *A. baumannii* の感染重症化の詳細な機序の解明と新規治療法の開発に大きく貢献できると期待される。

3. 研究の方法

(1) *A. baumannii* 感染 *klotho* マウスの肺に誘導される各種細胞の解析

Klotho KO マウスおよび WT マウスの尾静脈に当該菌を接種後、感染 1, 3, 7 日後の肺を回収し、細胞を調整後、好中球、マクロファージ、T 細胞の各表面マーカーに特異的な標識抗体で染色した。染色後、フローサイトメーターで各細胞の検出を行い、細胞数と割合変化を解析した。また各細胞の活性化マーカーについて標識抗体で染色後、フローサイトメーターで各細胞の活性化レベルを解析した。

(2) 肺のサイトカイン誘導量の解析

Klotho KO マウスおよび WT マウスの尾静脈に当該菌を接種後、感染 1 日後に肺を回収し、サイトカイン産生量を測定した。方法は、感染後の肺の RNA を抽出し、特異的なプライマーを用いて各サイトカインの発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

(3) チェッカーボード法を用いた多剤耐性 *A. baumannii* に対する抗菌薬併用効果の解析

帝京大学医学部附属病院にて臨床分離された 10 株の多剤耐性 *A. baumannii* に対して、チェッカーボード法を実施した。方法は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準じ、抗菌薬はアズトレオナム (AZT) 0-32 µg/mL、コリスチン (CL) 0-2 µg/mL、リファンピシン (RFP) 0-4 µg/mL、チゲサイクリン (TGC) 0-32 µg/mL の濃度範囲の組合せで薬剤感受性プレートを作成し実施した。評価方法に The fractional inhibitory concentration index (FIC index) を用いた。

4. 研究成果

(1) *A. baumannii* 感染 klotho マウスの肺における免疫細胞の活性化率と IL-17 の誘導量の解析

A. baumannii 感染 1、3、7 日後の klotho KO および WT マウスの肺に誘導された好中球と肺胞マクロファージは、活性化しないことが明らかとなった (図 1)。klotho KO および WT マウスの肺における IL-17mRNA の誘導は、認められなかった (検出限界以下)。

以上の結果から、感染後に誘導された好中球およびマクロファージは活性化せず、一方で好中球等の殺菌作用に影響を及ぼすサイトカイン IL-17 の関与もないことが明らかとなった。

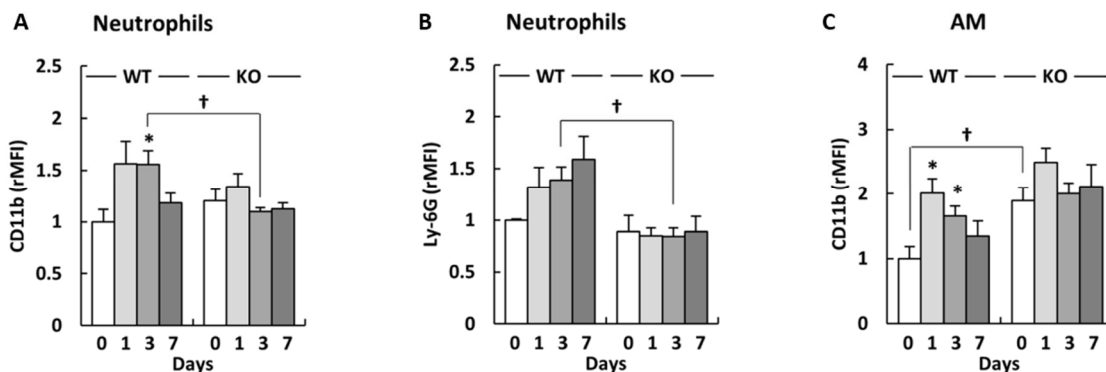


図 1. *A. baumannii* 感染 klotho マウスの肺における好中球 (A, B) と肺胞マクロファージ (C) の活性化マーカー発現量による活性化の比較 (* $p < 0.05$, † $p < 0.05$)

(2) *A. baumannii* 感染 klotho マウスの肺における T 細胞数の経時的変化の解析

A. baumannii 感染 1、3、7 日後の klotho KO マウスの肺に誘導された T 細胞の数は、感染 1 日目に WT マウス比で有意な誘導が認められたが、その後減少した (図 2A, 2B, 2C)。 *A. baumannii* 感染 1、3、7 日後の klotho KO マウスの肺に誘導された CD4T 細胞および CD8T 細胞の数は、感染 1 日目に WT マウス比で有意な誘導が認められた (図 2D, 2E)。一方、CD4/CD8 細胞比に変化はなかった (図 2F)。

以上の結果から、*A. baumannii* 感染後の klotho KO マウスの肺では、T 細胞が過剰誘導されることが明らかとなった。

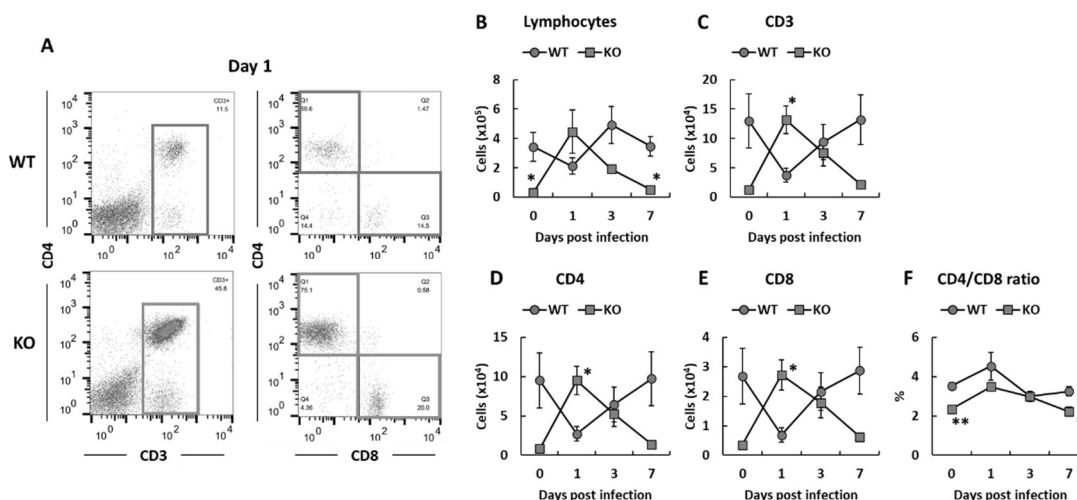


図 2. *A. baumannii* 感染 klotho マウスの肺における T 細胞の割合 (A) と T 細胞数の経時的変化 (B, C, D, E, F) の比較 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

(3) *A. baumannii* 感染 klotho マウスの肺における炎症関連遺伝子の発現誘導の比較

A. baumannii 感染 1 日後の klotho KO および WT マウスの肺では、全く異なる炎症関連遺伝子の誘導が認められ、特に klotho KO マウスでは、炎症性サイトカインである *IL-1* や *IL-6* が有意に誘導された (図 3)。

以上の結果から、klotho KO マウスの *A. baumannii* 感染後の肺では、炎症性サイトカイン *IL-1* や *IL-6* の過剰産生による炎症惹起が示唆された。

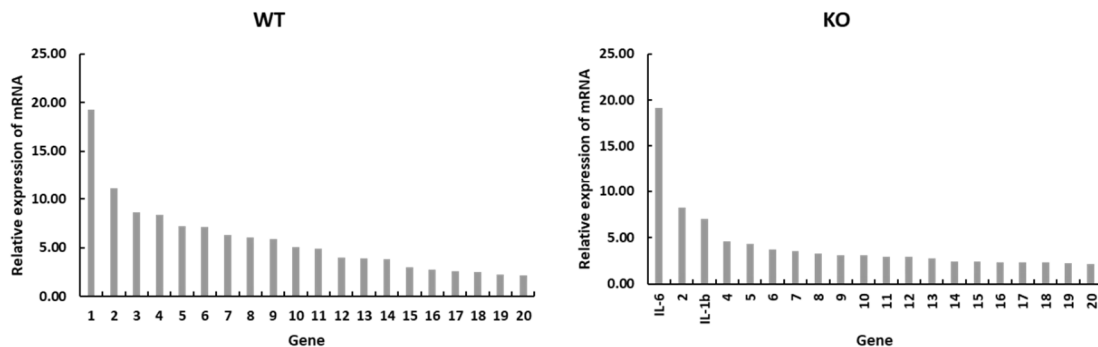


図 3. *A. baumannii* 感染 klotho マウスの肺における炎症性サイトカインの誘導量の比較

(4) 多剤耐性 *A. baumannii* におけるチェッカーボード法を用いた抗菌薬併用効果の検討

臨床分離された 10 株の多剤耐性 *A. baumannii* に対するアズトレオナム (AZT) とリファンピシン (RFP) の組合せでは、10 株中 7 株で相乗効果が認められた (表 1)。コリスチン (CL) とリファンピシン、コリスチンとチゲサイクリン (TGC)、チゲサイクリンとリファンピシンを併用した結果、コリスチンとリファンピシンを併用することで最も良い抗菌薬併用効果が認められた (表 1)。

以上の結果から、多剤耐性 *A. baumannii* に対する抗菌薬併用効果は、コリスチン (CL) とリファンピシン (RFP) の組合せが良好であることが示唆された。

表 1. The fractional inhibitory concentration index (FIC index) による薬剤併用効果の判定

抗菌薬の組合せ	FIC index 値による薬剤併用効果判定の株数			合計株数
	相乗効果	相加効果	不関 (無関係)	
AZT × RFP	0	7	3	10
CL × RFP	8	2	0	10
CL × TGC	0	5	5	10
TGC × RFP	0	4	6	10

5. 総括

本研究から、*A. baumannii* 感染 klotho KO マウスの肺では、好中球が誘導されるにも関わらず活性化が起らず、殺菌能力が不十分であること、さらに炎症性サイトカインの強い誘導を示すことが明らかとなり、感染に伴う急速な肺炎の悪化が示唆された。また以前の研究から、樹状細胞の誘導も少なく獲得免疫系の活性化も期待できないことや、感染に伴う klotho KO マウスの体重変動が少ないことから、見た目には感染症状が現れにくい可能性がある。しかし、7 日後の生存率が半分程度であったことから、高齢者への *A. baumannii* 感染には早期の対応が必要であることが推測される。特に肺炎の急速な悪化に注意し、早期に肺に移行性の高い抗菌薬による治療が必要であるが、近年の *A. baumannii* の多剤耐性化による治療効果の低下が懸念されている。抗菌薬の併用による殺菌の相乗効果についても検討し、感染の重症化を抑制することが致死率低下に繋がると考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kimura Yoshitaka, Hatayama Nami, Sato Yoshinori, Nishida Satoshi, Yoshino Yusuke	4. 巻 77
2. 論文標題 Efficacy of cefiderocol, a novel siderophore cephalosporin, against multi-drug resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> clinical isolates in Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 178 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2023.364	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 Sato Yoshinori, Hatayama Nami, Tanzawa Shigeru, Kimura Yoshitaka, Wakabayashi Yoshitaka, Kitazawa Takatoshi, Seki Nobuhiko, Yoshino Yusuke	4. 巻 180
2. 論文標題 <i>Staphylococcus haemolyticus</i> attenuates the antibacterial effect of teicoplanin via aggregates and biofilms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 106152 ~ 106152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2023.106152	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 Yoshinori Sato, Nami Hatayama, Tsuneyuki Ubagai, Shigeru Tansho-Nagakawa, Yasuo Ono, Yusuke Yoshino	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 Tigecycline Suppresses the Virulence Factors of Multidrug-Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> Allowing Human Neutrophils to Act	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 3357 ~ 3368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S368890	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 Yoshinori Sato, Tsuneyuki Ubagai, Shigeru Tansho-Nagakawa, Yusuke Yoshino, Yasuo Ono	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of colistin and tigecycline on multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> biofilms: advantages and disadvantages of their combination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90732-3	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 Shigeru Tansho-Nagakawa, Yoshinori Sato, Tsuneyuki Ubagai, Takane Kikuchi-Ueda, Go Kamoshida, Satoshi Nishida, Yasuo Ono	4. 巻 70
2. 論文標題 Histopathological Analysis of Acinetobacter baumannii Lung Infection in a Mouse Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polish Journal of Microbiology	6. 最初と最後の頁 469 ~ 477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33073/pjm-2021-044	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13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 義則, 畑山 奈美, 祖母井 庸之, 永川 茂, 斧 康雄, 吉野 友祐
2. 発表標題 ヒト早発性老化症候群モデルマウスを用いた Acinetobacter baumannii 感染に対する肺の免疫応答の解析
3. 学会等名 第72回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第70回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 義則, 畑山 奈美, 木村 佳貴, 若林 義賢, 北沢 貴利, 吉野 友祐
2. 発表標題 感染症における基礎と臨床の橋渡しとなる新たなトランスレーショナル・リサーチの構築 ~臨床分離株の病原性と抗菌薬感受性の基礎解析と感染病態との相関関係の解明~
3. 学会等名 第6回 帝京大学 研究交流シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 義則, 畑山 奈美, 永川 茂, 上田 たかね, 西田 智, 矢崎 有希, 若林 義賢, 北沢 貴利, 吉野 友祐
2. 発表標題 臨床分離された Staphylococcus haemolyticus のバイオフィルム形成に及ぼすテイコプラニンの効果
3. 学会等名 第97回日本感染症学会・学術講演会 第71回日本化学療法学会学術集会 合同学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 畑山奈美, 佐藤義則, 上田たかね, 西田智, 祖母井庸之, 斧康雄, 吉野友祐
2. 発表標題 多剤耐性Acinetobacter baumanniiにおけるチェッカーボード法を用いた抗菌薬併用効果の検討
3. 学会等名 第72回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第70回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 畑山奈美, 吉野友祐, 佐藤義則, 矢崎有希, 北沢貴利, 若林義賢
2. 発表標題 抗菌薬投与によって引き起こされる菌の薬剤抵抗性獲得機序の形態的解析
3. 学会等名 第6回 帝京大学 研究交流シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 畑山奈美, 佐藤義則, 永川茂, 上田たかね, 西田智, 矢崎有希, 祖母井庸之, 斧康雄, 吉野友祐
2. 発表標題 多剤耐性Acinetobacter baumannii におけるブレイクポイント・チェッカーボードプレートを用いた薬剤併用効果の検討
3. 学会等名 第97回日本感染症学会・学術講演会 第71回日本化学療法学会学術集会 合同学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 義則, 畑山 奈美, 若林 義賢, 北沢 貴利, 石垣 しのぶ, 古川 泰司, 吉野 友祐
2. 発表標題 臨床分離されたStaphylococcus haemolyticusのテイコプラニン投与時における付着・凝集性の評価
3. 学会等名 第71回 日本感染症学会東日本地方会学術集会 第69回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 義則, 畑山 奈美, 永川 茂, 上田 たかね, 西田 智, 祖母井 庸之, 斧 康雄, 吉野 友祐
2. 発表標題 チゲサイクリンは多剤耐性Acinetobacter baumanniiの病原因子を抑制し、ヒト好中球による殺菌を可能にする
3. 学会等名 第71回 日本感染症学会東日本地方会学術集会 第69回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 義則, 木村 佳貴, 若林 義賢, 北沢 貴利, 吉野 友祐
2. 発表標題 感染症における基礎と臨床の橋渡しとなる新たなトランスレーショナル・リサーチの構築 ~臨床分離株の病原性と抗菌薬感受性の基礎解析と感染病態との相関関係の解明~
3. 学会等名 第5回 帝京大学 研究交流シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 義則, 畑山 奈美, 永川 茂, 上田 たかね, 西田 智, 祖母井 庸之, 斧 康雄, 吉野 友祐
2. 発表標題 チゲサイクリン存在下における ヒト好中球の多剤耐性Acinetobacter baumannii に対する殺菌効果の解析
3. 学会等名 第96回 日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 義則, 祖母井 庸之, 永川 茂, 西田 智, 上田 たかね, 斧 康雄, 吉野 友祐
2. 発表標題 多剤耐性Acinetobacter baumannii のバイオフィルムに対するコリスチン/チゲサイクリンの併用効果
3. 学会等名 第70回 日本感染症学会東日本地方会学術集会・第68回 日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 義則, 永川 茂, 祖母井 庸之, 斧 康雄, 吉野 友祐
2. 発表標題 アシネトバクター・パウマニの病原性と宿主免疫応答の解析
3. 学会等名 第4回 帝京大学 研究交流シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 義則, 永川 茂, 祖母井 庸之, 西田 智, 上田 たかね, 吉野 友祐, 斧 康雄
2. 発表標題 高齢者におけるAcinetobacter baumannii 感染重症化機序の解明 (ヒト早発性老化症候群モデルマウスによる感染免疫応答の解析)
3. 学会等名 95回 日本感染症学会学術講演会・第69回 日本化学療法学会総会 合同学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京大学医学部微生物学講座 http://teikyo-microbe.umin.jp/research.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	祖母井 庸之 (Ubagai Tsuneyuki) (10311416)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	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	永川 茂 (Nagakawa Shigeru) (50266300)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	
研究分担者	畑山 奈美 (Hatayama Nami) (90976961)	帝京大学・医学部・助手 (32643)	

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