

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791137

研究課題名（和文） 過剰炎症による肺炎重症化機序の解明と抗炎症治療への展開

研究課題名（英文） Excessive Inflammation and Severe Pneumonia; Approach to Anti-inflammatory Therapy

研究代表者

森永 芳智 (MORINAGA YOSHITOMO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30580360

研究成果の概要（和文）：

重症肺炎治療における抗炎症治療の有用性を検討した。レジオネラが誘導する細胞死(ネクローシス様細胞死)と、それに伴う HMGB1 という強力な炎症メディエーターの放出の制御を試みた。放出機序に関わるカテプシン B の阻害、あるいはトロンボモジュリンによる HMGB1 分解は、炎症を抑制して感染症治療に有効であった。黄色ブドウ球菌による感染症での有用性も観察された。

研究成果の概要（英文）：

We studied the effectiveness of anti-inflammatory therapeutic approaches against severe lung infections. *Legionella* induced necrotic cell death with releasing inflammatory mediator, HMGB1, via cathepsin B activation. Cathepsin B inhibitor or recombinant thrombomodulin improved the inflammatory findings and weight changes in the mouse model of severe *Legionella* infection. Thrombomodulin also contributed to the treatment of *Staphylococcus aureus* lung infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：肺炎，抗炎症，HMGB1，ネクローシス

1. 研究開始当初の背景

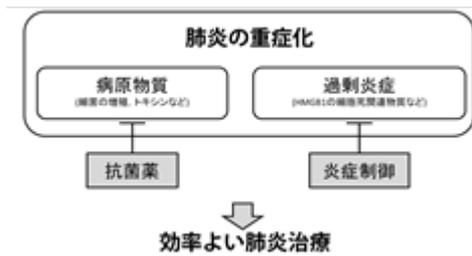
肺炎は日本人の死因の第 4 位に挙げられる重要な疾患である。高齢化が進む現代では、さらに増加すると見込まれ、その診療マネジメントは重要である。近年肺炎の診断面では、簡便で迅速に診断が可能となりつつある一方、治療面では新規抗菌薬の開発は限られ、耐性菌問題からも抗菌薬のみでは治療に難渋する症例が増えつつある。そこで、抗菌薬のみによらない、肺炎の病態を多方面からみた総合的な治療が今後の課題といえる。

近年、自己免疫疾患やアルツハイマー病などでは、炎症制御という新たな治療法が開発されつつあり、各種疾患において病態への炎症の関わりが注目されている。感染症におけ

る炎症は、病原微生物や病原因子などの排除に働く反応であると考えられるが、過剰炎症は組織障害をもたらしている可能性がある。たとえば肺炎球菌とレジオネラ菌はいずれも全身の炎症反応をとまなう重症肺炎を起こす 2 大菌種であるが、これらの細菌による肺炎では、適切な抗菌薬を投与してもしばしば重症化することがある。このことは菌側の因子に加えて重症化に生体側の因子が関わっている可能性を秘めており、病態解明が急がれる。しかし、炎症に着目した肺炎の病態解析は少なく、肺炎での炎症は善か悪かという問題を含め、菌側、生体側の両面からの肺炎の病態解析は重要と考えられ、われわれは両面からアプローチを進めてきた。

2. 研究の目的

肺炎の病態は、菌側と生体側の因子が複雑に関係していると考えられる。特に重症肺炎では有効な抗菌薬による治療でも一時的に悪化する症例があり、生体内で惹起される過剰炎症が病態に関与している可能性がある。そこで、重症肺炎の原因菌として問題となるレジオネラ菌と肺炎球菌に着目し、肺炎における病態を細胞死と炎症の側面から解析し、重症化機序の解明に迫る。また、過剰炎症を制御することによる有用性を評価し、炎症制御という新たな視点からの治療法の開発を目的とする。



3. 研究の方法

本研究は、*in vitro* と *in vivo* の両面から病態解析を行い、炎症の側面、関連する細胞死、これらの作用を阻害する場合の生体への効果などを検証した。

なお、微生物として、レジオネラ、肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、エロモナスなどを用いた。

(1) Bacteria-Cell interaction の評価

重症感染症の原因となる微生物と、細胞との相互作用を *in vitro* で評価した。

① 細胞死の評価

培養細胞崩壊(培養上清中 LDH)、細胞代謝 (XTT 代謝アッセイ)、顕微鏡所見(Diff-Quik 染色、蛍光染色)、フローサイトメトリー (Annexin-PI による蛍光染色)を行い、細胞死とその分類の整理。

② 細胞死関連炎症誘導物質の評価

放出 HMGB1, IL-1 β などの定量あるいはウエスタンブロット法での検出。

③ 炎症誘導物質の放出に関わる機序をスクリーニングし、詳細な機序と、Cell-signaling をターゲットにした治療介入の可能性を評価した。

(2) 重症肺感染症動物モデル

① 重症肺感染症モデルマウスの作成

CBA/J マウス(肺炎球菌用)、A/J マウス(レジオネラ菌用)、ddY マウス(黄色ブドウ球菌用)に菌液を接種し、肺感染症を惹起した。

② 重症肺炎モデルマウスにおける肺内炎症所見の評価

評価方法は当研究室で確立されている方法を用いた(Morinaga et al. JAC, 62:1326-1331, 2008, Morinaga et al. Exp Lung Res. 2010; 36: 484-490 など)。具体的には、以下の通りである。

- ・ 感染マウスの気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液中の炎症細胞の分類、割合を測定する(細胞数カウント、Diff-Quik 染色による細胞分画の分類)。
- ・ 気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン、ケモカイン、抗炎症性サイトカインを ELISA 法を用いて定量。
- ・ カテプシン B 活性(酵素基質反応)、HMGB-1(ELISA 法、Western Blot 法)の検出。
- ・ 病理組織学的評価。

③ 炎症誘導性生理活性物質の評価

肺胞マクロファージでの検討が望まれるが、マウス肺から回収できる細胞はわずかであり、腹腔由来のマクロファージで代用した。

- ・ レジオネラ菌によりネクロシス様細胞死を誘導し、細胞由来する産物を測定。
- ・ 死細胞サンプルとマクロファージ生細胞を共培養することによる炎症誘導をサイトカイン産生などで評価。また、死細胞サンプルを特異的阻害剤や中和抗体、分解酵素で処理することで、炎症誘導に重要な因子の絞り込み。

④ HMGB-1 の解析

HMGB-1 は酸化型と還元型があり、主に還元型が炎症反応を誘導する(Exp Cell Res 2006; 312: 191-195, Immunity 2008; 29: 21-32)ため、重症肺炎モデルマウスでの酸化型、還元型の HMGB-1 を Western blot 法により分離、同定した。

⑤ 重症肺炎モデルマウスに対する抗炎症介入効果の評価

評価可能な機序については、その阻害効果がある薬剤、化学合成物質、抗体などを駆使して、抗炎症からの治療介入の可能性を評価した。

以下の薬剤を用いた。

- ・ カテプシン B 阻害剤
- ・ 抗 HMGB-1 中和抗体
- ・ HMGB1 分解薬(トロンボモジュリン)

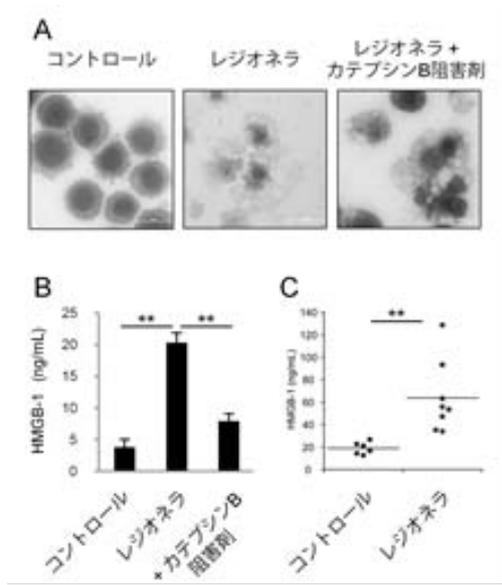
4. 研究成果

(1) 重症化への細胞死の関与

In vitro での解析を通じ、抗菌量のレジオネラ菌は、積極的に THP-1 細胞をネクロシス

様細胞死(Necrotic cell death)に誘導することを明らかとした。またこの機序にはカテプシンBというリソソーム酵素の急激な活性上昇が関わっていた。結果として、強力な炎症メディエーターである HMGB1 が細胞外へ遊離しており、重症化の一因である可能性を突き止めた。また、動物モデルにおいても、HMGB1 は明らかな上昇を示し、病態との関連性が示唆された。

(レジオネラによる細胞死と HMGB1.)



(2) 炎症メディエーターHMGB-1 の感染局所での増加(*In vivo*)

HMGB1 は還元型 HMGB-1(炎症誘導型)と酸化型 HMGB-1(炎症非誘導型)に分類できるが、動物実験モデルで肺内で観察されるHMGB1 は還元型であり、*in vitro* での結果を支持するものであった。

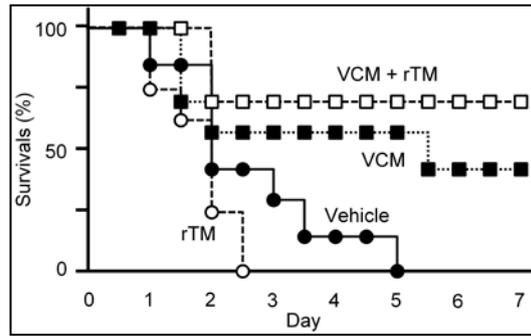
(3) カテプシン B 阻害による効果

レジオネラ菌動物感染モデルでのカテプシン B 阻害薬(CA074Me)による重症化阻止効果を認めた。

(4) HMGB-1 阻害による効果

HMGB1 をターゲットにマウスモデルで阻害実験を行った。抗 HMGB1 抗体のみでは、十分な改善効果を認めなかったが、HMGB1 分解作用をもつトロンボモジュリンは、複数の病原体による肺感染症モデルにおいて、既存の抗菌薬との併用で炎症性サイトカイン産生や、感染局所への炎症細胞浸潤を抑制しつつ予後を改善した。

(MRSA 肺感染症モデルにおける予後改善効果。 VCM:バンコマイシン, rTM: トロンボモジュリン)



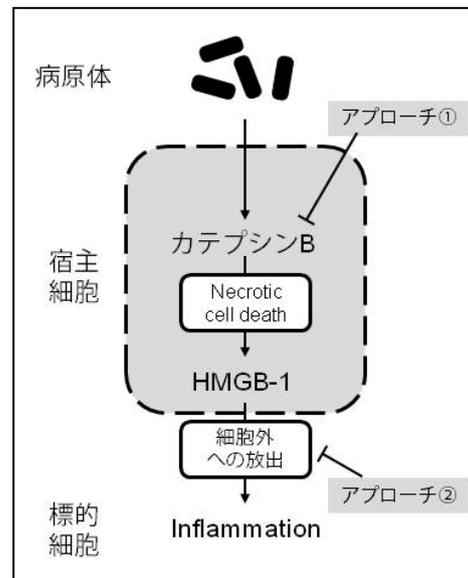
(5) 結果の意義

われわれの結果は、炎症制御の視点からの治療が、特に重症肺炎における救命率向上などの効果が期待できることを支持するものであった。

抗菌薬と、新しい機序からの抗炎症治療は、現在の耐性菌蔓延の現状や複雑化・高度化した医療における感染症の新しい治療戦略の一つとして期待できると考えられた。本研究を通して興味深い所見として、抗炎症作用のみでは逆に悪化する感染症もあり、病原体-抗菌薬-抗炎症の三者のバランスが重要であることを示唆する結果であった。

抗炎症の視点を含めた感染症治療アプローチが、新時代の戦略のひとつとなり得ることを証明した。

(感染症重症化病態と治療アプローチ)



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 2 件)

- (1) Morinaga Y, Yanagihara K, Eugenin FL, Beaz-Hidalgo R, Kohno S, Figueras Salvat MJ. Identification error of *Aeromonas aquariorum*: A causative agent of septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013, in press. DOI pii: S0732-8893(13)00055-2. 10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.019.
- (2) Morinaga Y, Yanagihara K, Araki N, Migiyama Y, Nagaoka K, Harada Y, Yamada K, Hasegawa H, Nishino T, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Kohno S, Kamihira S. Live *Legionella pneumophila* induces MUC5AC production by airway epithelial cells independently of intracellular invasion. *Canadian Journal of Microbiology* 58; 151-157, 2012. DOI 10.1139/w11-123

〔学会発表〕 (計 11 件)

- (1) Morinaga Y, Yanagihara K, Kaku N, Migiyama Y, Nagaoka K, Harada Y, Yamada K, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y and Kohno S. Effects Of Recombinant Thrombomodulin In Combination With Antibiotics On A Murine *Legionella* Pneumonia Model. 52nd ICAAC, 2012, in San Francisco.
- (2) Morinaga Y, Yanagihara K, Kaku N, Migiyama Y, Harada Y, Nagaoka K, Yamada K, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y and Kohno S. Effects of dagibatran on a murine model of *Staphylococcus aureus* hematogenous pulmonary infection. 52nd ICAAC, 2012, in San Francisco.
- (3) Morinaga Y, Yanagihara K, Araki N, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Yamada K, Akamatsu N, Matsuda J, Hasegawa H, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yasuoka A, Kohno S and Kamihira S. Clinical and Microbial Characteristics of *Aeromonas* Infections in a Japanese Hospital. 112th ASM, 2012, in San Francisco.
- (4) 森永芳智, 柳原克紀, 賀来敬仁, 原田陽介, 右山洋平, 長岡健太郎, 山田康一, 泉川公一, 掛屋 弘, 山本善裕, 河野 茂. *Aeromonas* 属菌の遺伝子学的再同定と病原性の検討. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会, 2012, 福岡
- (5) 森永芳智, 柳原克紀, 荒木伸子, 右山洋

平, 原田陽介, 長岡健太郎, 山田康一, 泉川公一, 掛屋 弘, 山本善裕, 河野 茂, 上平 憲. レジオネラによる IL-1 β 産生に対する CRP の抑制効果. 第 86 回日本感染症学会総会, 2012, 長崎

- (6) 森永芳智, 柳原克紀, 荒木伸子, 右山洋平, 原田陽介, 長岡健太郎, 山田康一, 泉川 公一, 掛屋 弘, 山本 善裕, 河野 茂, 上平 憲. マウスレジオネラ肺炎モデルにおける抗菌薬併用下でのリコンビナントトロンボモジュリンの効果. 第 60 回日本化学療法学会総会, 2012, 長崎
- (7) 森永芳智, 柳原克紀, 荒木伸子, 原田陽介, 右山洋平, 長岡健太郎, 山田康一, 泉川公一, 掛屋 弘, 山本善裕, 河野 茂, 上平 憲. 気道分泌に対するマクロライド系薬 2 薬剤の併用効果. 第 60 回日本化学療法学会総会, 2012, 長崎
- (8) Morinaga Y, Yanagihara K, Araki N, Migiyama Y, Nagaoka K, Harada Y, Yamada K, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S and Kamihira S. The efficacy of the combination of azithromycin and clarithromycin on MUC5AC production in airway epithelial cells. 51st ICAAC, 2012, in Chicago
- (9) 森永芳智, 柳原克紀, 荒木伸子, 右山洋平, 原田陽介, 長岡健太郎, 山田康一, 赤松紀彦, 松田淳一, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 掛屋 弘, 山本善裕, 河野 茂, 上平 憲. *Aeromonas* 感染症の臨床的・微生物学的検討. 第 59 回日本化学療法学会西日本支部総会, 奈良, 2011
- (10) 黒部昌也, 森永芳智, 大島一浩, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 掛屋 弘, 山本善裕, 柳原克紀, 河野 茂, 上平 憲. 仮性肺動脈瘤を伴った *Streptococcus constellatus* による肺化膿症の 1 例. 第 81 回日本感染症学会西日本地方会, 福岡, 2011
- (11) 森永芳智, 柳原克紀, 荒木伸子, 原田陽介, 山田康一, 松田淳一, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 掛屋 弘, 山本善裕, 河野 茂, 上平 憲. *Aeromonas* 敗血症 7 例の臨床像, 第 81 回日本感染症学会西日本地方会, 福岡, 2011

〔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〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

森永 芳智 (MORINAGA YOSITOMO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30580360

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし