

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591488

研究課題名(和文)重症感染症におけるPGD2/CRTH2を介する免疫機構の解明

研究課題名(英文)Investigation of immune mechanism of PGD2/CRTH2 in severe infectious diseases

研究代表者

石井 誠 (ISHII, MAKOTO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30317333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症におけるCRTH2の役割を検討した。CRTH2ノックアウト(-/-)マウスは、敗血症において生存率が上昇し、腹腔内の細菌数は有意に減少した。CRTH2-/-マウスは、腹腔内のCXCR2陽性の好中球が増加した。好中球マーカーであるGr-1の抗体や、CXCR2抗体の投与実験の結果、CRTH2-/-マウスの保護的効果の機序にCXCR2陽性の好中球の腹腔内への集積が寄与していた。感染2時間後の末梢好中球のCXCR2プロモーター領域のヒストンH3のアセチル化は、野生型では低下するが、CRTH2-/-マウスでは低下せず、CXCR2の発現はエピジェネティック制御を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the role of CRTH2 using a mice model of polymicrobial sepsis. CRTH2 knockout (-/-) mice were highly resistant to sepsis and peritoneal bacterial load in CRTH2-/- mice was significantly lower as compared to that in wild-type mice. Pharmacological inhibition of Gr-1, a neutrophil marker, and CXCR2 attenuated the protective effects against sepsis in CRTH2-/- mice, indicating that CXCR2-expressing neutrophils play protective roles in CRTH2-/- mice in this sepsis model. Moreover, acetylation of histone H3 at CXCR2 promoter in peripheral neutrophils was reduced 2 h after the surgery in wild-type neutrophils, while that in CRTH2-/- mice was not reduced 2 h after the surgery, suggesting that CXCR2 expression is regulated by epigenetic change.

研究分野：感染免疫学

キーワード：CRTH2 敗血症 エピジェネティクス プロスタグランジンD2

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は、しばしば致命的となる感染症に関わる重篤な疾患であり、その病態の解明と新たな治療法の開発は重要な課題である。敗血症においては、アラキドン酸カスケードの代謝酵素・産物の重要性が、これまで多く報告されている。分泌型ホスホリパーゼ A2(sPLA2)は敗血症において上昇し、阻害剤投与は保護的效果を有する (Bulger E et al. Crit Care Med, 2000)。また NSAIDs によるシクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害によって、敗血症マウスの病態が改善したと報告されている (Hansbrough JF et al. J Trauma, 1986)。さらにプロスタグランジン(PG)E2, PGI2, 15d-PGJ2 は敗血症に保護的に作用すると報告されている (Bulger E et al. Crit Care Med, 2000.) (Zingarelli B et al. Shock, 2005)。

本研究で着目する PGD2 は、主に血球細胞に存在する造血型 PGD2 合成酵素(H-PGDS)と、主に中枢神経系や血管内皮細胞等に存在するリポカリン型 PGD2 合成酵素(L-PGDS)の2種の合成酵素により合成され、L-PGDS は近年動脈硬化や肺炎などの炎症にも関与すると報告されている (Inoue T et al. Atherosclerosis, 2008) (Joo M et al. J Immunol, 2005)。PGD2 自身は炎症細胞の遊走作用や気道平滑筋の収縮作用を有し、喘息患者では気道炎症を引き起こす炎症性メディエーターと考えられている。PGD2 のリセプターには DP1 と近年新たに報告された CRTH2 がある。CRTH2 は PGD2 および 15d-PGJ2 などの PGD2 代謝産物をリガンドとして認識し、Th2 リンパ球や好酸球などの遊走や活性化に関与するとされ、アレルギー疾患などに対する将来的な創薬のターゲットとしても期待されている。しかし、これまで敗血症などの重症感染症における PGDS/PGD2/CRTH2 経路の役割に関しては、詳細な検討はなされていない。

### 2. 研究の目的

敗血症などの重症感染症において、脂質代謝経路であるアラキドン酸カスケードが活性化しその病態に関与することが報告されている。しかし、アラキドン酸代謝物であるプロスタグランジン(PG)D<sub>2</sub> と、その受容体の一つである CRTH2 は、アレルギー性炎症での寄与が報告されているものの、重症感染症における役割は明らかではない。そこで本研究は、重症感染症の中でも敗血症に着目し、PGD<sub>2</sub>/CRTH2 経路を介する免疫機構に関して、マウスモデルを用いて検討する事を目的とする。本研究により敗血症の病態の新たな側面が解明され、治療戦略に寄与することが期待される。

### 3. 研究の方法

敗血症は、マウスの盲腸を結紮・穿孔し誘発する。野生型と、CRTH2 ノックアウト(-/-)マウスを用いて敗血症を惹起し、生存率、細

菌数、サイトカインの発現、感染巣(腹腔)や脾臓における免疫担当細胞分画や表面マーカーの発現等を比較検討する。

さらに、CRTH2<sup>-/-</sup>マウスにおいて腹腔内への好中球集積が上昇していた予備実験の結果を踏まえ、好中球における CRTH2 の役割に着目して in vivo 及び in vitro で検討を進めた。

### 4. 研究成果

マウスの敗血症後の腹腔内洗浄液中の PGD2 は有意に上昇した。また PGD2 は、主に血球細胞に存在する造血型 PGD2 合成酵素(H-PGDS)と、主に中枢神経系や血管内皮細胞等に存在するリポカリン型 PGD2 合成酵素(L-PGDS)の2種の合成酵素により合成されるが、L-PGDS が敗血症後に有意に上昇していた。さらに、野生型および CRTH2<sup>-/-</sup>マウスを用いて、敗血症を惹起し、生存率を検討したところ、CRTH2<sup>-/-</sup>マウスの方が有意に敗血症後の生存率が上昇した。さらに血液及び腹腔内の細菌数を検討したところ、CRTH2<sup>-/-</sup>マウスの方が有意に細菌数の減少が見られ、CRTH2<sup>-/-</sup>マウスにおける生存率の上昇に寄与していると考えられた。

また CRTH2<sup>-/-</sup>マウスにおいては、腹腔内に好中球の集積が有意に増強し、なかでも CXCR2 陽性の好中球が増強していた。好中球のマーカーである Gr-1 の抗体や、CXCR2 抗体の投与より、CRTH2 ノックアウトマウスの生存率における保護的效果が減弱したことから、CRTH2 ノックアウトマウスの保護的效果の機序に CXCR2 陽性の好中球の腹腔内への集積が寄与していた。

以上の研究により、CRTH2 が敗血症において、有望なターゲット分子として、将来的な創薬にも寄与する可能性があると考えられた。

### 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17件)

Masaki K, Ishii M, Anraku M, Namkoong H, Miyakawa R, Nakajima T, Fukunaga K, Naoki K, Tasaka S, Soejima K, Sayama K, Sugita K, Iwata S, Cui L, Hanaki H, Hasegawa N, Betsuyaku T. Fatal fulminant pneumonia caused by methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* negative for major high-virulence factors secondary to influenza B virus infection. *Am J Case Rep.* 2015 (in press). (査読あり)

Namkoong H, Ishii M, Tasaka S, Betsuyaku T. The diagnostic usefulness of <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed

tomography in SAPHO syndrome. *BMJ Case Rep.* 2015 (in press). (査読あり)

Yagi K, Ishii M, Namkoong H, Asami T, Fujiwara H, Nishimura T, Saito F, Kimizuka Y, Asakura T, Suzuki S, Kamo T, Tasaka S, Gono T, Kamei K, Betsuyaku T, Hasegawa N. Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia cyriacigeorgica* in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease: two case reports. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):684. (査読あり)

Namkoong H, Kameyama Y, Yasuda H, Nakayama S, Kaneko H, Kawashima C, Terajima T, Maezawa K, Hayashi T, Sandoh M, Ishii M, Tasaka S, Kanayama A, Kobayashi I, Betsuyaku T, Kizu J, Iwata S, Sato Y, Hasegawa N. The efficacy, safety, and pharmacokinetics of biapenem administered thrice daily for the treatment of pneumonia in the elderly. *J Infect and Chemo.* 2014 20:356-360. (査読あり)

Funatsu Y, Hasegawa N, Fujiwara H, Namkoong H, Asami T, Tasaka S, Kimizuka Y, Kamata H, Ishii M, Iketani O, Ogata H, Iwata S, Betsuyaku T. Pharmacokinetics of arbekacin in bronchial epithelial lining fluid of healthy volunteers. *J Infect and Chemo.* 2014 20:607-611. doi: 10.1016/j.jiac.2014.05.007. (査読あり)

Namkoong H, Funatsu Y, Oishi K, Akeda Y, Hiraoka R, Takeshita K, Asami T, Yagi K, Kimizuka Y, Ishii M, Tasaka S, Suzuki Y, Iwata S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Comparison of the immunogenicity and safety of polysaccharide and protein-conjugated pneumococcal vaccines among the elderly aged 80 years or older in Japan: An open-labeled randomized study. *Vaccine.* 2015 33:327-332. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.11.023. (査読あり)

Tasaka S, Kobayashi S, Yagi K, Asami T, Namkoong H, Yamasawa W, Ishii M, Hasegawa N, Betsuyaku T. Serum (1-3)- $\beta$ -D-glucan assay for discrimination between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *J Infect*

*Chemother.* 2014 20:678-81. doi: 10.1016/j.jiac.2014.07.001. (査読あり)

Asami T, Ishii M, Fujii H, Namkoong H, Tasaka S, Matsushita K, Ishii K, Yagi K, Fujiwara H, Funatsu Y, Hasegawa N, Betsuyaku T. Modulation of murine macrophage TLR7/8-mediated cytokine expression by mesenchymal stem cell-conditioned medium. *Mediators Inflamm.* 2013:264260. doi: 10.1155/2013/264260, 2013. (査読あり)

Miyamoto K, Tasaka S, Nakano S, Shinoda H, Kamata H, Yamasawa W, Ishii M, Hasegawa N, and Betsuyaku T. Differential Mechanisms of the Effect of Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Agonists on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *Open Journal of Respiratory Diseases.* 3: 31-38, 2013. (査読あり)

Ishii M, Asano K, Namkoong H, Tasaka S, Mizoguchi K, Asami T, Kamata H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Funatsu Y, Kagawa S, Miyata J, Ishii K, Nakamura M, Hirai H, Nagata K, Kunkel SL, Hasegawa N, Betsuyaku T. CRTH2 is a critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 188:5655-5664, 2012. (査読あり)

Ishii M, Asano K, Kamiishi N, Hayashi Y, Arai D, Haraguchi M, Sugiura H, Naoki K, Tasaka S, Soejima K, Sayama K, and Betsuyaku T. Tuberculous sclerosis diagnosed by incidental CT findings of multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia: a case report. *J Med Case Rep.* 6:352, 2012. (査読あり)

**石井誠**。特集 呼吸器疾患とエビジェネティクス 「呼吸器感染症とエビジェネティクス」。Respiratory Medical Research 先端医学社 2015 (in press) (査読なし)

**石井誠**。特集 よく見る呼吸器感染症 インフルエンザウィルスの病態と臨床呼吸器内科 2015(in press) (査読なし)

**石井誠**。重傷呼吸器感染症・ARDS におけ

る免疫応答 第22回呼吸器疾患・感染症研究会 臨床と研究 92: 115-116, 2015. (査読なし)

**石井誠**、南宮湖、浅見貴弘、八木一馬、高橋左枝子、田坂定智、長谷川直樹、別役智子。私たちの研究「重症呼吸器感染症における免疫機構の解明～あらたな治療法確立に向けて～」。化学療法の領域 31:136-145, 2015. (査読なし)

**石井誠**。ALI/ARDSにおける遺伝子研究。特集ALI/ARDSの診断と治療。呼吸器内科 25:263-269, 2014. (査読なし)

**石井誠**。呼吸器感染症とエビジェネティクス。分子呼吸器病 17 :11-15,2013. (査読なし)

[学会発表](計 14 件)

Namkoong H, **Ishii M**, Fujii H, Asami T, Yagi K, Fujiwara H, Saito F, Tasaka S, Hasegawa N, Koyasu S, Betsuyaku T. Clarithromycin expands CD11b+Gr-1+ cells to protect against LPS-induced lethal shock. The 37th Annual Conference on Shock. Charlotte, NC. U.S.A. June 7-10<sup>th</sup>, 2014.

Kimizuka Y, **Ishii M**, Hoshino Y, Asami T, Nishimura T, Maeda S, Tasaka S, Namkoong H, Fujiwara H, Funatsu Y, Yagi K, Abe T, Iwata S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Clinical and bacteriological evaluations during observation of Mycobacterium avium complex lung disease without treatment. The 110th International Conference of American Thoracic Society. San Diego, CA. U.S.A. May16-21th, 2014.

Yagi K, **Ishii M**, Namkoong H, Asami T, Fujiwara H, Nishimura T, Saito F, Tasaka S, Kunkel SL, Hasegawa N, Betsuyaku T. Critical Roles Of Enhancer Of Zeste Homolog 2(EZH2) During Influenza A Virus Infection. The 110th annual International Conference of American thoracic society. San Francisco, CA, U.S.A. May 16-21th, 2014.

Namkoong H, **Ishii M**, Fujii H, Asami T, Yagi K, Saito F, Fujiwara F, Tasaka S, Hasegawa N, Betsuyaku T. Obesity Worsens The Outcome Of Influenza Virus Infection Via Impaired Ifn -Beta

Induction In Mice. The 110th annual International Conference of American thoracic society. San Francisco, CA, U.S.A. May 16-21th, 2014.

Namkoong H, **Ishii M**, Fujii H, Asami T, Yagi K, Fujiwara H, Saitoh F, Tasaka S, Hasegawa N, Koyasu S, Betsuyaku T. Clarithromycin Expands CD11b+Gr-1+ cells To Protect against LPS-Induced Lethal Shock and Polymicrobial Sepsis. The 28th international congress of chemotherapy and infection. Yokohama, Japan. PACIFICO Yokohama. June 5th-8th, 2013.

**Ishii M**, Asano K, Namkoong H, Tasaka S, Asami T, Miyata J, Yagi K, Saito F, Nakamura M, Hirai H, Nagata K, Hasegawa N, and Betsuyaku T. Prostaglandin D2 Receptor CRTH2 Is A Critical Regulator of Neutrophil Migration and Resistance to Polymicrobial Sepsis. The 28th international congress of chemotherapy and infection. Yokohama, Japan. PACIFICO Yokohama. June 5th-8th, 2013.

Nakagawa T, **Ishii M**, Namkoong H, Fujii H, Asami T, Yagi K, Saito F, Funatsu Y, Fujiwara H, Tasaka S, Hasegawa N, Betsuyaku T. Diet-induced obesity modulates the macrophage response to influenza virus infection. The 109th annual International Conference of American thoracic society. Philadelphia, PA, U.S.A. May 17-22th, 2013.

Matsui Y, **Ishii M**, Namkoong H, Fujii H, Asami T, Yagi K, Saito F, Funatsu Y, Fujiwara H, Tasaka S, Hasegawa N, Betsuyaku T. In Vitro Effect Of 14-Hydroxy Clarithromycin, A Major Metabolite Of Clarithromycin, On Cytokine Expressions In Murine Macrophages And Dendritic Cells During Influenza A Virus Infection. The 109th annual International Conference of American thoracic society. Philadelphia, PA, U.S.A. May 17-22th, 2013.

Yagi K, **Ishii M**, Fujii H, Mizoguchi K, Namkoong H, Asami T, Funatsu Y, Fujiwara H, Saito F, Tasaka S, Kunkel SL, Hasegawa N, Betsuyaku T. Effects of Histone Deacetylase Inhibitor

Trichostatin A During Influenza A Virus Infection In Vivo And In Vitro. The 109th annual International Conference of American thoracic society. Philadelphia, PA, U.S.A. May 17-22th, 2013.

Asami T, **Ishii M**, Fujii H, Namkoong H, Yagi K, Ishida Y, Funatsu Y, Kimizuka Y, Fujiwara H, Tasaka S, Hasegawa N, Betsuyaku T. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Modulates Murine Macrophage Cytokine Expression Induced by TLR7/8 Ligand Stimulation and Influenza A Virus Infection. The 109th annual International Conference of American thoracic society. Philadelphia, PA, U.S.A. May 17-22th, 2013.

Namkoong H, **Ishii M**, Fujii H, Asami T, Yagi K, Funatsu Y, Fujiwara H, Saitoh F, Tasaka, S, Hasegawa N, Koyasu S, Betsuyaku T. Clarithromycin Expands CD11b+Gr-1+ cells To Protect against LPS-Induced Lethal Shock and Polymicrobial Sepsis. The 109th annual International Conference of American thoracic society. Philadelphia, PA, U.S.A. May 17-22th, 2013.

Asami T, **Ishii M**, Fujii H, Namkoong H, Funatsu Y, Kimizuka Y, Tasaka S, Hasegawa N, and Betsuyaku T. Modulatory Roles Of Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Media On Cytokine Expressions In Murine Macrophages And Dendritic Cells During Influenza A Virus Infection. The 108th annual International Conference of American thoracic society. San Francisco, CA, U.S.A. May 23th, 2012.

Namkoong H, **Ishii M**, Tasaka S, Hasegawa N, Sugiura H, Sakurai M, Kato J, Mori T, Okamoto S, and Betsuyaku T. Clinical Characteristics Of Late-Onset Idiopathic Pneumonia Syndrome With Severe Restrictive Lung Deficit After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The 108th annual International Conference of American thoracic society. San Francisco, CA, U.S.A. May 22th, 2012.

Wakatabe M, **Ishii M**, Namkoong H, Fujii H, Asami T, Funatsu Y, Kimizuka Y, Tasaka S, Hasegawa N, and Betsuyaku T.

Clarithromycin Modulates Cytokine Expression Profiles In Murine Macrophages And Dendritic Cells During Influenza A Virus Infection. The 108th annual International Conference of American thoracic society. San Francisco, CA, U.S.A. May 23th, 2012.

〔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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 誠 (ISHII MAKOTO)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：30317333

### (2) 連携研究者

藤猪 英樹 (FUJII HIDEKI)  
琉球大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：50356250