

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791026

研究課題名(和文) インフルエンザ菌感染症に及ぼす I 型インターフェロンの役割

研究課題名(英文) The role of type I interferon for the lower respiratory infection induced by Haemophilus influenzae

研究代表者

中村 茂樹 (Nakamura, Shigeki)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20399752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ菌による慢性下気道感染症の成立機序について、インフルエンザ菌が気道上皮細胞内侵入性を有することに着目して解析を行った。肺気腫患者の下気道に定着したインフルエンザ菌21株について気道上皮細胞内侵入性について比較したところ、菌株によって侵入能力に差が認められた。さらに気道上皮細胞内へ高頻度に侵入したインフルエンザ菌では、I型インターフェロン(IFN)の産生が有意に増加していた。通常、I型(IFN)は抗ウイルス作用を発揮するが、インフルエンザ菌感染症においては気道感染を発症しやすくする増悪因子として作用することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanism of chronic lower respiratory infection (cLRT) induced by Haemophilus influenzae with focusing the tissue-invasive ability especially bronchial epithelial cells. Twenty-one clinical isolates of H.influenzae were measured the ability of tissue-invasion and there were significant differences of the invasion ability between each strain. In addition, the production of type I IFN in the supernatant of the cell lines infected with high-invasive strains has increased significantly compared to the low-invasive strains. In general, type I IFN has the inhibitory effect against the viral infection, however we found new insight of type I IFN to accelerate the LRT infection induced with H.influenzae, and this finding will be contribute to elucidate the mechanism of bacterial cLRT.

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：感染免疫 自然免疫

### 1. 研究開始当初の背景

インターフェロン(IFN)はウイルス感染細胞によって分泌され、隣接細胞への感染拡大を阻止するサイトカインである。通常、I型IFNとII型IFNに分類され、I型IFNがほぼ全てのウイルス感染細胞において抗ウイルス免疫を誘導するのに対し、II型IFNは、マクロファージや細胞障害性T細胞などに作用し、細胞内寄生病原体に対する殺菌を誘導する。これまでウイルス感染防御作用が主とされていたIFNだが、近年、宿主免疫を介し細菌感染症に対し様々な影響を与えていることが明らかとなった。例えばリステリア感染の際に抗原提示細胞より産生されるI型IFNは、エフェクター細胞死を促進し、リステリアに対する宿主感受性を低下させることが報告されている。

インフルエンザ菌は成人市中肺炎や慢性気道感染症、COPD増悪などの重要な原因菌であるが、その病原性は未だ不明な点も多い。ウイルス同様、細胞内寄生性を有するインフルエンザ菌ではあるが、感染とIFN産生の関連性について報告はこれまでに認められていない。今回我々は、インフルエンザ菌感染におけるI型IFNの産生と機序、さらに宿主免疫における役割を明らかにすることで、難治性インフルエンザ菌感染症発症のメカニズムを探るとともに、新規治療戦略の確立を目指す。

### 2. 研究の目的

難治性インフルエンザ菌下気道感染症の成立のメカニズムを解析し、新規治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

使用菌株：非莢膜型インフルエンザ菌 21株 (COPD増悪を来し、患者下気道に定着した臨床分離株)

細菌培養・保存：菌株は-80にて凍結保存。BHI寒天培地 [2% Fildes enrichment+NAD (20 µg/ml)] に塗布し 37、5%CO<sub>2</sub> 下に培養を行った。

菌液の調整：保存菌株より得られたコロニーを BHI 液体培地 [2% Fildes enrichment+NAD (20 µg/ml)] に溶解 (OD<sub>660</sub> 0.1) し、37、5%CO<sub>2</sub> 下で震盪培養を行った (OD<sub>660</sub> 0.4 前後に調整)。

Cell culture: 気道上皮細胞 NCI-H292 を RPMI1640(+10% FBS) で 37、5%CO<sub>2</sub> 下に培養を行った。

腹腔内マクロファージの抽出および培養：C57BL/6 マウス (8 週齢、雄) に 4%チオグリコレート 2ml を腹腔内注射し、3 日後に 0.1%ゼラチン含有 Hank's Balance Salt Solution (HBSS) にて腹腔洗浄を行った。腹腔内洗浄液は Percoll を加えた後に遠心 (1000rpm, 45min) し単球成分を抽出した。得られた単球成分は洗浄後、RPMI1640 (+10%FBS) で浮遊させ、24 ウェルプレートに接種後、37、5%CO<sub>2</sub> 下に培養を行った。

NTHi の細胞内侵入性試験：24 ウェルプレートで NCI-H292 気道上皮細胞 (1 × 10<sup>5</sup> cells/well) を培養し、NTHi (6 × 10<sup>6</sup> CFU/ml) を 10 µl/well ずつ接種した。3 時間後に HBSS で洗浄後、ゲンタマイシン (200 µg/ml) を投与し細胞外生菌の除去を行った。HBSS で洗浄後、1%TritonX 0.5ml で細胞の破壊を行い、BHI 寒天培地に接種し定量培養を行った。得られた菌株を細胞内侵入菌とし、接種

菌数と比較した比率が 1%以上のものを高侵入菌と定義した。

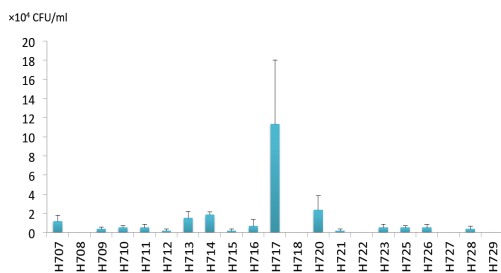
走査及び透過電子顕微鏡：トランスウェル及びディッシュに NCI-H292 気道上皮細胞 ( $2 \times 10^4$  cells/well)を接種後 4 日間培養し、NTHi( $6 \times 10^6$  CFU/ml)を  $10 \mu\text{l/well}$  ずつ接種した。菌接種 24 時間後に透過及び走査電子顕微鏡にて観察した。

定量 RT-PCR：NCI-H292 気道上皮細胞、腹腔内マクロファージを NTHi にて刺激した後、経時的に RNA を抽出し、定量 RT-PCR で IFN- $\beta$  mRNA 発現量を定量した。

#### 4. 研究成果

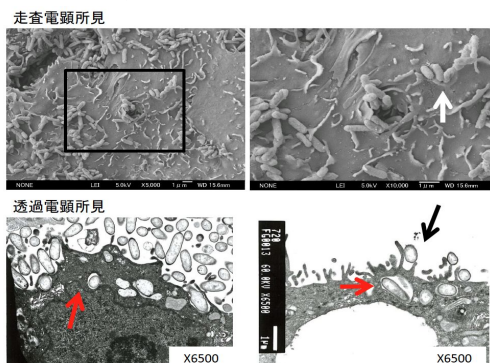
##### NTHi の細胞内侵入性の比較

NTHi 臨床分離株の細胞内侵入試験を行った。侵入率 1%以上の株は 5 株認められた。最も高侵入性 ( $11.33 \pm 6.68\%$ )であった H717 を I 型 IFN 産生実験に用いた。



##### 電子顕微鏡所見

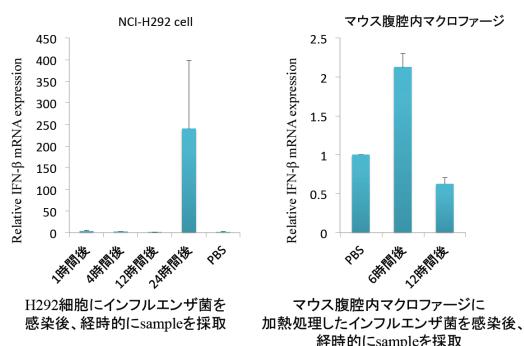
NCI-H292 気道上皮細胞に H717 を接種後、24 時間後の走査電子顕微鏡及び透過電子顕微鏡像を示す。



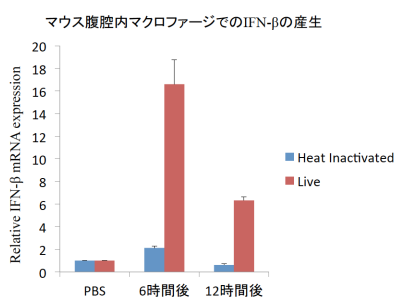
菌の細胞表面への接着、細胞内侵入像 (白/赤矢印) villi による捕捉像 (黒矢印) が認められた。

##### NTHi による I 型 IFN 産生誘導解析

NCI-H292 気道上皮細胞を熱殺菌した NTHi で刺激した場合、菌接種 24 時間後において IFN- $\beta$  mRNA の発現が最も亢進した。また腹腔内マクロファージを熱殺菌 NTHi で刺激し、菌接種 6 時間後に IFN- $\beta$  mRNA の発現が最も亢進した。腹腔内マクロファージを NTHi (生菌) で刺激した場合、熱殺菌の場合と比較し、IFN- $\beta$  mRNA 発現が有意に亢進していた。



H292細胞にインフルエンザ菌を感染後、経時的にsampleを採取  
マウス腹腔内マクロファージに加熱処理したインフルエンザ菌を感染後、経時的にsampleを採取



マウス腹腔内マクロファージにインフルエンザ菌を接種後、経時的にsampleを採取

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 茂樹 ( MAKAMURA, Shigeki )  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：20399752