

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791030

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染後の肺粘膜面自然免疫恒常性維持におけるNK細胞の意義

研究課題名(英文) Significance of NKT cell on maintaining homeostasis of lung mucosal innate immunity system during influenza virus infection

研究代表者

石川 裕樹 (ISHIKAWA, HIROKI)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60433918

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)：インフルエンザウイルス感染に続く、細菌二次感染は宿主病態悪化の危険因子である。本研究ではウイルス感染後の細菌二次感染抵抗性低下について免疫学的な検討をおこなった。その結果、ウイルス感染マウスでは非感染マウスと比較し肺中に二次感染した緑膿菌に対する排除能の顕著な低下を示し、この排除能低下は好中球のミエロペルオキシダーゼ活性低下による不完全な貪食作用に起因することが示唆された。さらに好中球活性化因子であるG-CSFがウイルス感染マウスの肺中で減少することが示された。またウイルス感染マウスにおけるウイルス感染後のG-CSF投与は肺における細菌排除能が回復することが示された。

研究成果の概要(英文)：Secondly bacteria infection during influenza virus infection is most frequent complication and lethal case in patients. We examined the immunological mechanisms of impaired immune response against secondly bacterial infection caused by influenza virus infection. When mice with virus were intranasally infected with *P. aeruginosa*, the faculty of bacterial clearance in lung of viral infected mice significantly decreased compared to that of non-viral infected mice. Neutrophil derived from viral infected mice showed the dysfunction with regard to impaired digestion and/or killing of phagocytized bacteria to due to reduced myeloperoxidase activity. Moreover, G-CSF, which is activator for neutrophil, production in lung of viral infected mice was significantly lower than that of non-viral infected mice after secondly bacteria infection. When viral infected mice was injected with G-CSF before secondly bacteria infection, the faculty of bacteria clearance in viral infected mice was recovered.

研究分野：微生物学 免疫学

キーワード：インフルエンザウイルス 細菌二次感染 好中球 G - C S F

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス感染後の細菌二次感染は宿主の病態悪化の重要な因子である。研究開始当初の段階では、ウイルス感染後の肺への緑膿菌感染ではその排除能が低下していることが確認されていた。そのメカニズムとして肺粘膜面に恒常的に発現し、オプソニン効果を有するサーファクタントに注目し研究を遂行したが、否定的な結果となった。しかしながらウイルス感染後の細菌排除能低下は再現性が得られていたため、自然免疫で肺中の細菌排除に重要である好中球に焦点を絞り研究を遂行した。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルス感染後の肺への細菌感染に対する排除能低下のメカニズムは十分には証明されていない。そこで本研究ではウイルス感染による細菌排除能低下のメカニズムを明らかにするとともに、その排除能低下の機能回復の方法の確立についての検討もおこなう。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス感染後の肺二次感染緑膿菌排除能の検討

6～8週齢の Balb/c 雌 SPF マウスにインフルエンザウイルス PR8 株を 100 pfu/mouse 経鼻的に感染させた。またコントロール(非感染)群として PBS を使用した。ウイルス感染 4 日後に緑膿菌 S10 株をウイルス感染群、コントロール群に 1×10^7 cfu/mouse で感染させた。緑膿菌感染 6 時間後および 24 時間後に肺を摘出し、PBS 内でホモジナイズ後、緑膿菌選択培地である NAC 寒天培地上にて一晚培養し菌数を測定した。

(2) 肺中のサイトカイン測定

インフルエンザウイルス感染 4 日後またはコントロール群に緑膿菌を 1×10^7 cfu/mouse 感染させ、感染 6 時間後に、Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) を回収した。遠心後、BALF 上清中のサイトカイン量を ELISA 法にて測定した。

(3) 肺中の好中球細胞数および Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

インフルエンザウイルス感染 4 日後またはコントロール群に緑膿菌を 1×10^7 cfu/mouse 感染させ、感染 6 時間後に、BALF を回収した。BALF 中の好中球細胞数は自動血球細胞測定装置にて測定した。また BALF 細胞中の MPO 活性は MPO 活性キットにより測定した。

(4) 好中球の緑膿菌貪食能の検討

インフルエンザウイルス感染 4 日後またはコントロール群に蛍光染色 (PKH26 染色) した緑膿菌を 1×10^7 cfu/mouse 感染させた。感

染 6 時間後に BALF を回収した。BALF 細胞を Fc block 後、FITC 標識 anti-Ly-6G 抗体で染色をおこない、洗浄、ホルマリン固定後、Flow cytometry (FACS) にて解析をおこなった。また同時に蛍光顕微鏡下での観察もおこなった。

(5) G-CSF 投与による好中球機能回復の検討

インフルエンザウイルス感染 4 日後、緑膿菌感染の 12 時間前と 1 時間前に 100ng/mouse の recombinant G-CSF を腹腔内投与した。その後、緑膿菌を 1×10^7 cfu/mouse 感染させ、緑膿菌感染 6 時間後に肺を摘出し、緑膿菌菌数の測定をおこなった。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルス感染後の肺二次感染緑膿菌排除能についての検討

図 1 が示すように、インフルエンザウイルス感染群とコントロール群における肺二次感染緑膿菌排除能を検討した結果、緑膿菌感染 6 時間後および 24 時間後においてインフルエンザウイルス感染群では細菌の排除能が著しく低下することが示された。とくに 24 時間後ではコントロール群ではほぼ排除されているのに対し、インフルエンザウイルス感染群では菌数にして 100 倍以上の差が認められた。これらの結果よりインフルエンザウイルス感染は細菌二次感染の排除能を低下させることが示唆された。

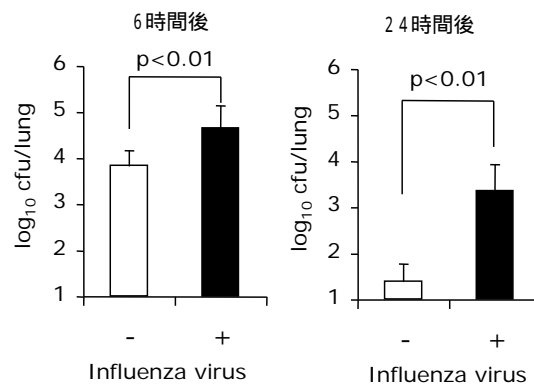


図1. 肺中の緑膿菌菌数

(2) 緑膿菌感染後の肺中のサイトカインの検討

緑膿菌感染 6 時間後の肺中のサイトカインを測定した結果、図 2 が示すように炎症性サイトカインである IL-1 と IL-6 が細菌排除が遅れるインフルエンザウイルス感染群において有意に上昇していた。またその一方で、G-CSF はインフルエンザウイルス感染群ではコントロール群と比較し有意に減少していた。

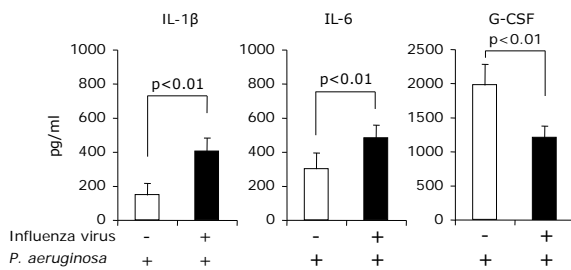


図2. 緑膿菌感染6時間後の肺中のサイトカイン量

(3) 緑膿菌感染後の肺中の好中球細胞数および活性化の解析

上記の実験により好中球活性化因子である G-CSF がインフルエンザウイルス感染群で減少していたため好中球の機能に違いがあるか検討をおこなった。緑膿菌感染 6 時間後の BALF を回収し、BALF 細胞中の好中球細胞数および MPO 活性について測定をおこなった。その結果、緑膿菌感染後の肺中の好中球細胞数には有意な差は認められなかった (図 3)。しかしながら好中球活性化の指標である MPO 活性に関してはインフルエンザウイルス感染群で有意に低下していた。

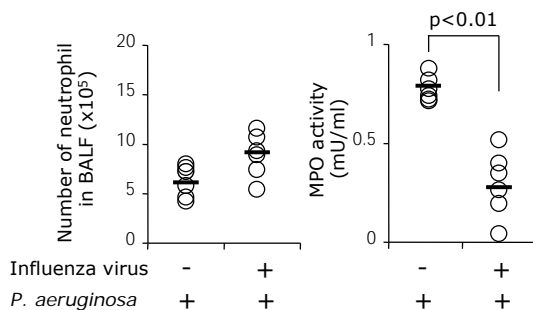


図3. 緑膿菌感染後の肺中好中球細胞数とMPO活性

(4) 好中球の貪食作用相違の検討

好中球の貪食能に相違があるか確認するため、インフルエンザウイルス感染群およびコントロール群に蛍光標識した緑膿菌を感染させ、FACS および蛍光顕微鏡による解析をおこなった。その結果、インフルエンザウイルス感染群ではコントロール群と比較し、好中球による緑膿菌の捕食については差がないが、その後の殺菌・消化が不十分であることを示唆する結果が得られた。

(5) G-CSF の投与によるインフルエンザウイルス感染群の好中球機能回復の検討

これまでの結果より、インフルエンザウイルス感染群では好中球による細菌排除能の低下が示され、可能性の 1 つとして肺中の G-CSF 量の低下が原因と考えられる。そこで G-CSF の投与により緑膿菌排除能を回復できるかどうか検討をおこなった。図 4 が示すように、これまでのようにコントロール群と比較してインフルエンザウイルス感染群では緑

膿菌の排除能が低下していた。そこでインフルエンザウイルス感染群に G-CSF を投与し緑膿菌排除能を測定したところ、G-CSF 非投与群と比較し有意に排除能は回復した。しかしながらコントロール群と比較するとその回復は完全ではなかった。

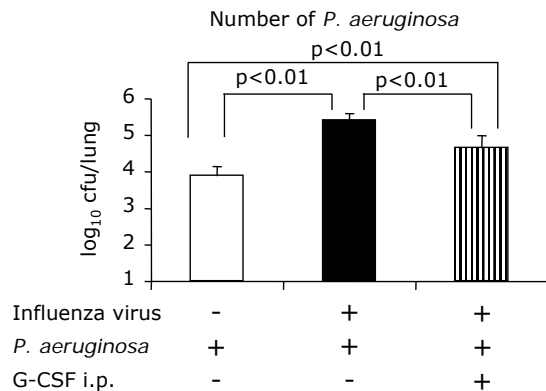


図4. G-CSF投与による緑膿菌排除機能の変化

(6) 研究成果のまとめ

本研究ではインフルエンザウイルス感染後の細菌二次感染抵抗性低下のメカニズムとその回復について検討をおこなった。その結果、ウイルス感染マウスでは肺に二次的に感染させた緑膿菌に対する排除能がウイルス非感染マウスと比較し、有意に低下していることが示された。またその排除能の低下は好中球の MPO 活性の低下に起因していると考えられ、そのため貪食した緑膿菌を十分に殺菌・消化できないことが示唆された。また、好中球活性化因子である G-CSF がインフルエンザウイルス感染マウスでは肺中で減少し、緑膿菌排除に重要な好中球の十分な機能を誘導することができないことが示唆された。また外部より投与された G-CSF は、このインフルエンザウイルス感染による緑膿菌排除能低下を回復させることが示された。今後は、なぜインフルエンザウイルス感染が肺中の G-CSF 減少を引き起こすかについて検討をおこなっていく予定である。

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7件)

H. Sasaki, H. Ishikawa, R. Asano, H. Ueshiba, T. Matsumoto, R. Boot and E. Kawamoto. Draft genome sequence of the rodent opportunistic pathogen *Pasteurella pneumotropica* ATCC 35149T. Genome announcements. 2014. 2(4); e00771-14. 査読有

石川裕樹、田中和生 インフルエンザウイルス感染に対する IL-12 経鼻投与の予防効果と病態増悪効果 臨床免疫・アレ

ルギー科 科学評論社 2014. 62(1); 84-89. 査読無
 H. Sasaki, H. Ishikawa, K. Kojima, M. Itoh, T. Matsumoto, T. Itoh, O. Hosomi and E. Kawamoto. Intranasal immunization with a non-adjuvanted adhesive protein descended from *Pasteurella pneumotropica* and its preventive efficacy against opportunistic infection in mice. Vaccine. 2013. 31; 5729-5735. 査読有
 H. Ishikawa, N. Awano, T. Fukui, H. Sasaki and S. Kyuwa. The protective effects of lactoferrin against murine norovirus infection through inhibition of both viral attachment and replication. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2013. 434; 791-796. 査読有
 H. Taguchi, T. Matsumoto, H. Ishikawa, S. Ohta and T. Yukioka. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on culture and PCR in inpatients at a tertiary care center in Tokyo, Japan. Journal of Infectious Chemotherapy. 2012. 18; 630-636. 査読有
 H. Ishikawa, H. Sasaki, T. Fukui, K. Fujita, E. Kutsukake and T. Matsumoto. Mice with asthma are more resistant to influenza virus infection and NK cells activated by the induction of asthma have the potentially protective effect. Journal of Clinical Immunology. 2012. 32; 256-267. 査読有
 H. Miyazaki, R. Kobayashi, H. Ishikawa, N. Awano, S. Yamagoe, Y. Miyazaki and T. Matsumoto. Activation of COL1A2 promoter in human fibroblasts by *Escherichia coli*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2012. 65(3); 481-487. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

石川裕樹. The exogenous IL-12 treatment has opposite effects depending on whether it is administrated before or after influenza virus infection. 第43回日本免疫学会総会. 2014.12.11.京都

石川裕樹. インフルエンザウイルス感染に対する IL-12 経鼻投与の有効性と病態増悪効果のメカニズム 第62回日本ウイルス学会総会. 2014.11.11.横浜

石川裕樹. インフルエンザウイルス感染に対する IL-12 経鼻投与は感染前投与では予防効果を示し、感染後投与では病態を悪化させる 第61回日本ウイルス学会総会. 2013.11.12.神戸

石川裕樹. The protective effects of intranasal administration of IL-12

given before influenza virus infection and negative effects of IL-12 given after viral infection. 第41回日本免疫学会総会. 2012. 12.7.神戸

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

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)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

東京医科大学微生物学講座

<http://www.tokyo-med.ac.jp/microbiology>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 裕樹 (ISHIKAWA HIROKI)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60433918

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号: