

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860830

研究課題名(和文) 気道免疫からの肺炎重症化カスケードの解明と抗炎症マネジメントへの展開

研究課題名(英文) The pathogenesis of severe infections and the immunity in respiratory tract - New approach for anti-inflammatory treatment -

研究代表者

森永 芳智 (MORINAGA, Yoshitomo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：30580360

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)：感染初期に生体内で観察されるTNF- α は、アポトーシスという細胞死を調節しながら細胞内寄生菌の増殖を抑制していることが確かめられた。嫌気性菌が産生する病原因子は、肺炎球菌が気道へ接着する際に必要な受容体を増やして、肺炎球菌性肺炎をより重症化させることが確認された。効果が期待される抗菌薬でも肺炎が重症化した場合には、効果が減弱する薬剤があることを指摘し、重症度を評価して適切な治療薬を選択する方法の開発が今後必要であることを認識した。

研究成果の概要(英文)：TNF α contributes to the inhibition of bacterial growth in cells with inducing apoptotic cell death. Anaerobes produces some toxins and they may induces the receptors on the airway, which pneumococcus requires to attach to the respiratory tract. The toxins produced by anaerobes can progress the severity of pneumococcal pneumonia. The severity of infection may affect the effectiveness of antimicrobials in the treatment of pneumonia. Therefore, we need further studies for the evaluation of severity of infections and progress the strategies of choice the appropriate treatment.

研究分野：感染症内科学

キーワード：HMGB1 細胞死

1. 研究開始当初の背景

肺炎は感染症関連死亡で最も多く、わが国の死因の第3位である。特に、重症肺炎では適切な抗菌薬を投与中でも悪化することがあり、“微生物と抗菌薬”という概念以外の未解明な機序の関与が考えられる。治療法の向上のためには、病態理解の基に生体側へのアプローチという新しい概念を含んだ、“多面的な重症肺炎マネジメント”を構築していく時期にある。

2. 研究の目的

われわれの研究の大きな目的は、抗菌薬だけでは治療が困難な重症肺炎の病態の理解を深め、感染症治療における個別化医療の概念を取り入れることで、適切な免疫応答に導く新しい治療と抗菌薬による従来からの治療が調和した、“新時代の重症肺炎マネジメント”を提唱することである。これまでの成果を踏まえ、本研究では特に気道免疫が果たす重症化の先導的役割の解明を通して、より病態早期からの抗炎症治療介入による効率的な重症肺炎治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) TNF- α による気道免疫

下気道感染症の初期に観察される TNF- α による気道免疫作用を *in vitro* で評価した。

細胞内での細菌増殖

細胞内に侵入し増殖可能な微生物である *Legionella* を用いた。微生物を気道上皮細胞 (NCI-H292) に接触・付着後の、経時的増殖菌数を固形培地上に発育してカウントした。

細胞傷害性の評価

細菌増殖に伴い、誘導される細胞死を細胞崩壊(培養上清中 LDH)、顕微鏡所見(Diff-Quik)、細胞死の質の評価(Caspase 3/7 による蛍光染色)で評価し、異なる細胞(単球様細胞株;THP-1)と比較した。

TNF- α 作用の評価

気道上皮細胞と微生物の共培養の条件に、リコンビナント TNF- α を添加することによる細菌増殖、細胞傷害性への影響を評価した。また、抗 TNF- α 中和抗体を用いて、その作用が抑制されるかどうかと検証した。

(2) 嫌気性菌と下気道感染症病態

マウスを用いて肺炎球菌と嫌気性菌との共作用が病態に与える影響を評価した。*Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* の3種の嫌気性菌を用いた。

生存に与える影響

肺炎球菌と、嫌気性菌あるいは嫌気性菌の培養上清をマウスに経気道的に接種し、生存期間を算出した。

菌量に与える影響

接種後の肺・血液・脾臓における肺炎球菌量を評価した。

気道における肺炎球菌受容体の評価

肺炎球菌受容体である PAFR の発現を *in vitro* では A549 細胞、*in vivo* では肺全体を用いて mRNA 発現量としてリアルタイム PCR で定量した。

(3) 抗菌薬存在下での気道免疫の解析
微生物と薬剤の関係の中での気道粘液ムチン産生、薬剤感受性上の抗菌力と感染症の重症化との関連を評価した。

ムチン MUC5AC

気道上皮細胞株(NCI-H292)を用いて、黄色ブドウ球菌あるいはアシネトバクターによる MUC5AC 産生量、また抗菌薬のリネゾリドやマクロライド系薬が MUC5AC 産生に与える影響を ELISA 法・リアルタイム PCR 法を利用してタンパク質・mRNA レベルで測定した。

抗菌力以外の抗菌薬作用の評価

アシネトバクター・肺炎桿菌性肺炎モデルマウスに、薬剤感受性が様々な条件の投与量で治療を行い、感染症の重症化を生存率、菌数、気道炎症細胞所見を測定した。

4. 研究成果

(1) TNF- α は細胞内の細菌増殖を抑制する気道上皮に感染した *Legionella* は時間依存性に増殖するが、TNF- α が存在すると、その増殖が著しく抑制された。この抑制作用は TNF- α の作用を中和することで解除され、自己免疫疾患などで標的治療として用いられる抗 TNF- α 製剤が、細胞内寄生菌感染症リスク上昇となっている機序のひとつを解明したものと考えられた。また、菌の増殖抑制には細胞死も同時に関与しており、その傾向は気道上皮細胞よりむしろマクロファージで顕著であった。細胞の種類により機能に差があり、病態の重症度にも関与しているものと推察するが、その具体的なシグナル分子としてはより具体的に解析を行う必要があり、現時点では caspase 3 を中心としてアポトーシスの経路が関わっていることが推察される。

(2) *Prevotella intermedia* は肺炎球菌性肺炎を重症化させる

嫌気性菌3菌種のうち、*P. intermedia* のみが肺炎球菌性肺炎の生存率を短縮させた。この作用は培養上清のみで誘導され、本菌が産生する何らかの病原因子が関わっていることが推測された。生存率の短縮化の背景には肺内での菌量の短時間での増加が関わっており、続発する菌血症がより早期に起こっていることが考えられた。その機序として、肺炎球菌の生体側の接着因子である PAFR の発現が亢進していることが *in vitro*, *in vivo* の両面で確認された。

(3) マクロライド・リネゾリドは気道粘液産生調節作用があり、マクロライドは感染症重症化を抑制する

黄色ブドウ球菌、アシネトバクターで誘導された MUC5AC 産生はそれぞれマクロライド、リネゾリドで抑制された。肺炎桿菌モデルでは、薬剤感受性上効果が期待できる量の抗菌薬を投与しても、重症になるとメロペネムの効果は維持されるがタゾバクタム・ピペラシリンの効果は減弱し、抗菌薬での有効性に差が出てくる。しかしながら、マクロライド系

薬は薬剤感受性上効果が期待できないにもかかわらず、アシネトバクター性肺炎の重症化を妨げる効果を示した。これらは、既述したマクロライド系薬の気道粘液産生抑制作用が生体に負の影響を及ぼしていないことの示唆に加えて、まだ未解明の作用の存在を暗示するものであった。

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5件)

1. Harada Y, Morinaga Y, Kaku N, Nakamura S, Uno N, Hasegawa H, Izumikawa K, Kohno S, Yanagihara K: *In vitro* and *in vivo* activities of piperacillin-tazobactam and meropenem at different inoculum sizes of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Infect 20(11):O831-9, 2014.
2. Yamada K, Morinaga Y, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Uno N, Nakamura S, Imamura Y, Hasegawa H, Miyazaki T, Izumikawa K, Takeya H, Mikamo H, Kohno S: Azithromycin inhibits MUC5AC induction via multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in human airway epithelial cells. Pulm Pharmacol Ther 28(2):165-70, 2014.
3. Kaku N, Yanagihara K, Morinaga Y, Yamada K, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Nakamura S, Izumikawa K, Kohno S: Immunomodulatory effect of linezolid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* supernatant-induced MUC5AC overexpression in human airway epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother 58(7):4131-7, 2014.
4. Nagaoka K, Yanagihara K, Morinaga Y, Nakamura S, Harada T, Hasegawa H, Izumikawa K, Ishimatsu Y, Takeya H, Nishimura M, Kohno S: *Prevotella intermedia* induces severe bacteremic pneumococcal pneumonia in mice with upregulated platelet-activating factor receptor expression. Infect Immun 82(2):587-93, 2014.
5. Yamada K, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Takeya H, Hasegawa H, Mikamo H, Kohno S: Azithromycin attenuates lung inflammation in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 57(8):3883-8, 2013

[学会発表](計8件)

1. 原田陽介、森永芳智、賀来敬仁、宇野直輝、長谷川寛雄、中村茂樹、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、河野茂：ESBL産生 *Klebsiella pneumoniae* 肺炎マウスモデルにおける接種菌量と治療効果。第61回日本化学療法学会西日本支部総会, 2013年11月6日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪)
2. 賀来敬仁、柳原克紀、森永芳智、原田陽介、中村茂樹、今村圭文、泉川公一、河野茂：ムチンの過剰分泌にたいするリネゾリドの抑制効果。第61回日本化学療法学会西日本支部総会, 2013年11月6日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪)
3. Harada Y, Morinaga Y, Kaku N, Akamatsu N, Matsuda J, Uno N, Hasegawa H, Nakamura S, Imamura Y, Izumikawa K, Kohno S and Yanagihara K: *In vitro* and *in vivo* activities of piperacillin-tazobactam and meropenem in different inoculum sizes of ESBL *Klebsiella pneumoniae*. 53rd ICAAC, 2013年9月12日, デンバー(米国)
4. Kaku N, Yanagihara K, Morinaga Y, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Yamada K, Hasegawa H, Izumikawa K, Takeya H, Kohno S: Effect of linezolid on MUC5AC expression induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a human airway epithelial cell. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013年6月6日, パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
5. Nagaoka K, Yanagihara K, Harada Y, Yamada K, Migiyama Y, Morinaga Y, Hasegawa H, Izumikawa K, Takeya H, Kohno S: *Prevotella intermedia* induce severe bacteremic pneumococcal pneumonia in murine with up-regulating platelet-activating receptor. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013年6月5日, パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
6. 原田陽介、柳原克紀、賀来敬仁、右山洋平、長岡健太郎、山田康一、森永芳智、泉川公一、掛屋弘、河野茂：接種菌量によるESBL産生 *K. pneumoniae* に対するラクタム系薬の薬物効果。第87回日本感染症学会学術講演会, 第61回日本化学療法学会総会, 2013年6月5日, パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
7. Kaku N, Yanagihara K, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Yamada K, Morinaga Y, Hasegawa H, Izumikawa K, Takeya H, Kohno S: Effect of linezolid on MUC5AC expression induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human airway epithelial cells.

23rd ECCMID, 2013年4月27日, ベルリン(ドイツ)

8. 山田康一、柳原克紀、賀来敬仁、原田陽介、右山洋平、長岡健太郎、森永芳智、中村茂樹、今村圭文、宮崎泰可、泉川公一、掛屋弘、三鴨繁、河野茂：多剤耐性アシネトバクター(MDRAB)による人工呼吸器肺炎(VAP)モデルにおけるアジスロマイシンの有効性．第47回緑膿菌感染症研究会, 2013年2月22日, 札幌医科大学臨床教育研究棟講堂(北海道・札幌)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

森永 芳智 (MORINAGA, Yoshitomo)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
助教

研究者番号：30580360