

	(所属)	(職名・学年)	(氏名)
研究者 (研究代表者)	京都府立医科大学 感染症態学	助教	西岡 敬介
研究の名称	重症呼吸器疾患形成における末梢気道細菌関与の解析		
研究の キーワード	ウイルス感染症、急性呼吸促拍症候群、細菌叢		
研究の概要	<p>現在新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の世界的な流行が見られている。ICUに入院した患者のうち、武漢市の報告では67-85%が急性呼吸促拍症候群(ARDS)と診断され、ARDSに対する治療法の確立はCOVID-19の致死率低下へ直接つながると考えられる。我々はこれまでに、ARDS発症/重症化における末梢気道細菌叢の関与を解析してきた。</p> <p>図. 本研究の概要と研究課題</p> <p>重症呼吸器疾患であるARDSの発症、重症化における末梢気道細菌叢の役割を解析する。本研究課題では実際に関係する細菌種の同定とそのメカニズムの解明を試みた。</p> <p>本研究の成果は、高い致死率を示すARDSにおいて治療の新しい標的を提供することが考えられ、新規の重症化予防法・治療法の確立への貢献が期待できる。</p>		
研究の背景	<p>集中治療室(ICU)における重症呼吸器疾患は致死率も高く対策が必須である。特に、多様な疾患を原因とする急性呼吸促拍症候群(ARDS)は治療法が確立されておらず致死率が40%に至るため、新規治療法の確立が急務である。我々はARDSの発症及び病態進行メカニズムの解明を目指し、ARDS患者の末梢気道細菌叢に着目し次世代シーケンシングによる網羅的解析を行ってきた。これまでにARDS患者の肺胞洗浄液(BALF)中の細菌叢において特定の細菌属の比が全身性の炎症、予後に関係することを明らかにしている。加えて、ARDS患者のBALF</p>		

	<p>から培養された特定のレンサ球菌属細菌の培養上清中タンパクは肺上皮細胞へ強い細胞傷害性を示し、インフルエンザウイルスの複製を促進することを見出している。</p> <p>これらの結果は、多様な疾患を原因とするARDSであるが、インフルエンザにおいて、その重症化からARDS発症、予後まで末梢気道細菌が関与することを示唆している。そこで本研究では重症ARDS患者でみられる強い全身性の炎症と関与する細菌の同定とそのメカニズムの解明を目的とした。</p>
<p>研究手法</p>	<p>ARDS患者のBALFから培養された培養された7種のレンサ球菌属細菌を液体で培養した。その培養上清を、ヒト単球様細胞株であるTHP-1細胞のマクロファージ様細胞株への分化過程において添加した。細胞からRNAを抽出し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析し、炎症への関与の検討を行った。</p> <p>次にその活性の区画を解析するために、限外ろ過を用いて培養上清を5つの区画に分けて同様の解析を行った。また、炎症反応を誘導するToll様受容体(TLR)の関与も調べるために、レンサ球菌属の構成成分であるペプチドグリカンを認識するTLR2を欠損した細胞を用いて解析を行った。</p>
<p>研究の成果</p>	<p>ARDS患者のBALFから培養された7種のレンサ球菌属のうち、特に2種類の細菌種の培養上清はマクロファージ様細胞株に作用し強く炎症性サイトカインの一種であるIL-6を誘導した。IL-6は重症COVID-19患者においても高いことが報告されており、インフルエンザだけでなく他のウイルス感染症においても炎症応答の誘導に関与していることが考えられた。</p> <p>ここからは一番強く誘導を示した細菌種を用いてメカニズムの解明を試みた。活性の区画を調べるために、限外ろ過を用いて5つの区画に分けたところ、100 kDa>のみで活性を示し、その活性は100°C処理で一部不活性化した。この結果はIL-6誘導物質が100 kDa>のタンパクであることを示唆している。また、レンサ球菌属は、グラム陽性球菌に分類され、その細胞壁は多量のペプチドグリカンが含まれている。ペプチドグリカンは宿主のパターン認識受容体のTLR2に認識され炎症反応を惹起することが知られており、IL-6も誘導されるためTLR2の刺激への関与も解析した。TLR2が欠損しているTHP-1細胞を用いて、IL-6誘導能がどのように変化するか解析した。TLR2をはじめとするTLR群は刺激が入ると転写因子NF-κBが誘導され、炎症性サイトカインの発現が誘導される。初めに培養上清によるNF-κB誘導を解析したところ、TLR2 KO THP-1細胞では誘導されないことがわかった。続いて、IL-6誘導能を解析したところ、IL-6誘導は非処理群と同様になり、また100°C処理においてはさらに減弱した。この結果は、TLRシグナリングとは別にIL-6誘導が見られていること、過剰な亢進はTLR2刺激に依存することが示唆される。通常、TLR4とTLR2の認識分子は異なる病原体に由来する分子のため、生体防御機構であることを考慮すると、そのシグナルが競合することは少ないと考えられる。実際に、大腸菌のLPS(TLR4リガンド)と黄色ブドウ球菌のペプチドグリカン(TLR2リガンド)を用いた実験ではシグナルはIL-6誘導を相加的に亢進することが観察されている。常在菌であるため、各パターン認識受容体に認識されにくくなっている可</p>

	<p>能性があるがその詳細なメカニズムは現状不明である。以上の結果から、特定の物質によるIL-6の誘導に加えて、これらTLR4やTLR2リガンドのバランスがARDS発症/重症化に関与することが示唆された。</p>
今後の期待	<p>本研究を通して、パターン認識受容体を介した今までに知られていない炎症応答メカニズムの存在が示唆された。ARDSの原因は多岐にわたり、患者ごとに重症化メカニズムは異なると考えられる。原因物質の同定と、これらメカニズムの解明は、治療法の選択の幅を広げることにつながり、致死率が高いARDSの新規治療法の確立の貢献が期待できる。</p>
研究発表	<p>原著論文： Downregulation of calcium-regulated heat stable protein 1 expression by low-temperature stimulation causes reduction of interferon-beta expression and sensitivity to influenza viral infection. Nishioka K, Daidoji T, Nakaya T. Virus Res. 2022 Feb;309:198659. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198659. Epub 2021 Dec 17.</p>