



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウスCommunity-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus 肺炎モデルにおける Interleukin-17の役割 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	渋谷, 寧
Description	配架番号 : 2153
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11671号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59040
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasushi_Shibue_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 渋江 寧

学位論文題名

マウス Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
肺炎モデルにおける Interleukin-17 の役割
(Role of Interleukin-17 in a Murine Community-Associated
Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia Model.)

【背景】Th17系のサイトカインが好中球を誘導し、膠原病、腫瘍、アレルギーなど様々な分野で病態に関与していると報告されている。感染症領域におけるTh17系サイトカインの役割を示した報告もあり、その多くはTh17サイトカインが欠損した状態では様々な病原体に対して易感染性を示すという結果が報告されている。*Staphylococcus aureus*とIL-17の関連を示したものでは、特に皮膚・軟部組織感染症が代表的である。

昨今の耐性菌の代表格であるMRSA(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)は院内感染症の起炎菌と考えられていたが、近年CA-MRSA(community-associated MRSA)が世界中で検出され、その感染により皮膚・軟部組織感染症、敗血症をきたしたとする報告が相次いでなされている。USA300はその代表株であり、その病原性を説明するものとしてPVL(Panton Valentine Leukocidin)、 α -hemolysin、PSM(Phenol-soluble modulins)などの病原因子の関与が指摘されている。皮膚・軟部組織感染症に比べると頻度は低いながらもUSA300による壊死性肺炎の報告もあり、特に免疫不全宿主ではない市中発症の若年者が致死的な経過を辿ったとする報告が散見される。その病原因子に焦点を当てた研究は多くみられるが、それに比べると宿主の免疫応答に焦点を当てたものは少なく、CA-MRSAによる肺炎の病態は現時点では明らかではない。

つまり、CA-MRSAの宿主免疫の役割はまだ明らかにされておらず、それはIL-17サイトカインに関しても例外ではない。

【目的】IL-17サイトカインとして中心的な役割を担い、感染症に対する宿主の免疫反応に重要とされるIL-17A、IL-17Fを含むサイトカインのマウスCA-MRSA肺炎モデルに対する役割を検討した。

【方法】6-10週齢オスのBALB/cマウスである、野生型(WT)マウス、IL-17Aノックアウトマウス(*Il-17a^{-/-}*)、IL-17A+IL-17Fノックアウトマウス(*Il-17a^{-/-}Il-17f^{-/-}*)を使用し、これらにMRSA(USA300, ATCC BAA-1556)を経鼻投与で感染させた。マウス肺炎モデルを作成し、各群での生存率を確認したのち、右肺の肺内菌数を測定し、左肺のサイトカイン、ケモカインmRNA発現量をReal time RT-PCR(SYBR Green 法)で測定した。また、各群のマウスに肺胞洗浄を施行し、得られた肺胞洗浄液からフローサイトメトリーを用いて細胞数を測定した。さらに、WTマウス肺をコラゲナーゼ処理して得た細胞に対し、USA300死菌刺激を行い、これに対して抗IL-17A抗体とコントロール抗体を投与し、ELISA法でサイトカイン、ケモカインのタンパク質産生量を測定した。統計処理に関しては、2群間の比較にはt検定を用い、群間比較には1元配置の分散分析(ANOVA)、Tukey法を用いた。生存曲線はKaplan-meier法を用い、解析はlog rank検定を行った。P値が0.05未満を統計学的有意とみなした。

【結果】USA300経鼻投与(10^8 CFU)を行ったWTマウス、IL-17A+IL-17Fノック

アウトマウス、IL-17A ノックアウトマウスの生存率の結果では、感染 12-24 時間後で最も致命的となったのは IL-17A ノックアウトマウスであり、この時間帯で 62%死亡した。また、感染 60 時間以内には 92%が死亡し、他の群とは有意差をもって致命的な結果を示した (vs WT, $P < 0.01$; $Il-17a^{-/-} Il-17f^{-/-}$, $P < 0.05$)。感染 12 時間後に各群の肺内菌数の差を確認したところ、各群の肺内菌数に有意差を認めなかったが、サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量を測定したところ、最も致命的であった IL-17A ノックアウトマウスにおいて、IL-17F mRNA 発現量は WT マウスよりも有意に高値を示し (vs WT, $Il-17a^{-/-} Il-17f^{-/-}$, $P < 0.01$)、G-CSF mRNA 発現量も他の群に比べ、有意に高値を示した (vs WT, $Il-17a^{-/-} Il-17f^{-/-}$, $P < 0.01$)。また、肺胞洗浄液中の好中球数は IL-17A ノックアウトマウス群では他の群と比べて有意に増加していた (vs WT, $Il-17a^{-/-} Il-17f^{-/-}$, $P < 0.01$)。

上記の結果を踏まえ、コラゲナーゼ処理した WT マウス肺細胞に死菌刺激を加え、抗 IL-17A 抗体投与群とコントロール群を比較すると、有意に抗 IL-17A 抗体群で G-CSF 産生量が高値を示した (vs rat IgG2a, $P < 0.05$)。

【考察】本研究では、感染後早期に最も致命的であった IL-17A ノックアウトマウスにおいて、感染 12-24 時間後での各群の肺内菌数は有意差を認めなかった。しかし、G-CSF 産生は有意に高まり、肺胞洗浄液中の好中球が増加した。よって、各群での致死率の差は過剰な免疫反応の差である可能性を考えた。好中球は宿主防御の役割以外にも、急性肺障害との関与が示唆されており、肺胞の好中球集簇と低酸素血症や肺血管透過性の程度が相関し、好中球数の増加が予後不良因子と関連したという報告はある。また、USA300 を気管内投与したラット肺炎モデルにおける報告では、感染後 12 時間以内の早期に気道、肺への好中球増加や血液凝固因子の集積、また、肺胞構造の破壊を認めており、今回の我々の報告と同様に USA300 感染による早期の肺炎発症を支持するものと考ええる。ただ、今回の研究では PVL や α -hemolysin、PSM などの病原因子の検討はしていないため、これらの影響に関しては不明である。

肺における IL-17F の炎症への関与が示唆されている報告もあり、IL-17A の作用が減弱した状況でも好中球が増加した原因としては、IL-17F の増加の結果として起こる G-CSF の増加によるものと解釈できる可能性はある。*in vitro* では IL-17F の産生増加は有意差を示さなかったために、これらの結果に IL-17F がどこまで関与しているのかははっきりしていないが、*in vivo* との違いとして、死菌処理で菌の病原因子を排除したことが影響した可能性がある。IL-17A と IL-17F は相同性が高く、ヘテロダイマーを形成しているといわれているが、その機能に関してはまだはっきりとしない点が多い。しかし、IL-17A ノックアウトマウスでは WT マウスと比べて血漿中の IL-17F、G-CSF の発現が有意に高まるという報告もあり、これは我々の結果を支持する。また、ノックアウトマウスというモデル自体に相補的なサイトカインの働きがあった可能性を考慮し、*in vitro* で抗 IL-17A 抗体投与実験を行ったところ、*in vivo* と同様に IL-17A の作用が減弱した状況で G-CSF の産生が高まることが確認された。

今回の実験では G-CSF 増加の機序に関しては十分に解明されていないため、さらなる検討が必要であり、病原因子の関与についても検討する必要があると考える。しかし、CA-MRSA マウス肺炎モデルにおいて、これらの事象を示した報告は我々の知りうる限りなく、IL-17A と IL-17F の相互作用に関する知見として重要な結果と考える。

【結論】CA-MRSA によるマウス肺炎モデルにおいて、IL-17A 単独欠損下では、G-CSF が高値を示し、好中球性炎症の程度が増加する。その背景として IL-17F の増加により過剰な好中球性炎症をきたし、結果的に宿主にとって肺炎の増悪因子としても働く可能性があることを示した。また、IL-17A と IL-17F の相互作用の存在を示唆した新たな知見と考える。