

表1 臨床診断名とウイルス検出状況

	InfV	RSV	HMPV	HRV	HEV	Others	ND	Total
気管支炎	367	195	95	47	66	19	1515	2488
肺炎	50	113	52	7	61	54	1065	1482
細気管支 炎	1	59	4	2	6	4	69	144
クループ 様	11	3	0	3	3	0	102	128
気管支喘 息	4	6	4	3	3	0	81	108
喉頭炎	0	1	3	0	2	2	25	36
気管支肺 炎	4	15	3	3	1	-2	53	83
その他	108	21	6	2	14	12	142	331
	545	413	167	67	156	400	3052	4800

ND; Not detected

表2 小児科における重症度別入院患者

	症例数(人)	入院例(人)
軽症	112 (46.3)	36 (32.1)
中等症	86 (35.5)	77 (89.5)
重症	44 (18.2)	43 (97.7)

表3 成人COPD急性増悪症例の臨床像

No.	年齢 (歳)	性別	入院 期間 (日)	ウイルス 検出	臨床的 改善 (日)	ADL 自立	重症 治療	予後 不良	細菌	合併 疾患	CO PD 病期	検体 採取 月
1	67	女	16	RSV	16	×	○	死亡	-		IV	8
2	70	男	9	-	4	○	×	生存	S.p		III	8
3	84	女	10	RSV	7	○	×	生存	-		†	8
4	64	男	31	-	4	○	×	転院	H.flu	§	IV	9
5	76	男	31	-	31	×	○	死亡	H.flu		IV	9
6	64*	男	6	-	**	○	×	生存	-	¶	IV	10

* 検体採取後他院に転院

** 転院のため不明

§ 肺塞栓症・タコツボ心筋症・肺癌

¶ 心不全

† 不明

S.p 肺炎球菌

H.flu インフルエンザ菌

表4 成人喘息発作症例の臨床像

No.	年齢 (歳)	性別	入院 期間 (日)	ウイルス 検出	呼吸不全の 改善(日)*	臨床的 改善(日)	ADL 自立	重 症 治 療	予 後 不 良	検体 採取 月
1	58	女	19	-	12	12	○	×	0	8
2	91	女	35	HMPV	17	23	×	×	1	8
3	90	女	34	-	6	6	×	×	0	8
4	50	女	11	RSV	8	8	×	×	0	9
5	28	男	7	HRV	5	5	○	×	0	10
6	47	男	10	HRV	5	5	○	×	0	10

*呼吸不全の改善はSpO₂ 90%以上になるまでの入院期間とした。

重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン解析に関する研究

種々の呼吸器ウイルス感染によってヒト肺線維芽細胞から産生が誘導されるサイトカインとシグナル伝達経路との相互関係に関する研究

研究代表者

木村博一 国立感染症研究所感染症情報センター

研究協力者

吉住正和 塚越博之 小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所

関恵理奈 杏林大学大学院

岡山吉道 日本大学大学院

野田雅博 国立感染症研究所

研究要旨

幼少期における呼吸器ウイルス感染は、喘息の発症と増悪に密接に関連していることが強く示唆されている。また、呼吸器に存在する線維芽細胞は、喘息患者に生じる気道リモデリングに重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、respiratory syncytial ウイルス、ライノウイルスおよび、パラインフルエンザ 3 型ウイルス感染ヒト胎児肺線維芽細胞(MRC-5 細胞)が産生するサイトカインのプロファイリングを行うとともにサイトカイン産生に重要なシグナル伝達機構解明を目的とした研究を行った。さらに、炎症性疾患に対する治療に広く用いられているステロイド (Fluticasone propionate) の抗炎症効果を *in vitro* で検証した。その結果、これらのウイルス感染 MRC-5 細胞は、種々の炎症性サイトカインや気道リモデリングに関連するサイトカインを多量に産生することが明らかになった。また、このサイトカイン産生には I κ B α および p38MAPK をはじめとするタンパクのリン酸化が密接に関与することも明らかになった。以上のことから、炎症性サイトカインを中心としたサイトカインの異常産生による生体反応機構は、単に呼吸器感染症として急性の気道炎症を惹起するだけでなく、喘息の発症や増悪および、気道リモデリングの重要な機構になっていることが示唆された。

A. 研究目的

呼吸器ウイルスは、単にかぜ様症候群を引き起こすだけでなく、ある一定の割合で気管支炎や肺炎などの重症呼吸器感染症を引き起こすことがよく知られている (1)。本邦において、重症呼吸器感染症による年間死亡者数は推定で 10 万人を超えており、少なからず呼吸器ウイルスの関与が推定されているが、その実態は不明である。重症呼吸器疾患の一つである小児喘息発作は、原因ウイルスとしてライノウイルス (HRV)、respiratory syncytial ウイルス (RSV)、エンテロウイルス、パラインフルエンザウイルス (PIV)、インフルエンザウイルスなどが指摘されている (2, 3)。

幼少期におけるこれらの呼吸器ウイルス感染は、喘鳴の発症や増悪の病態に関与しており、さらに喘息の発症・増悪(virus-induced asthma)の誘導に深く関与することが報告されている (4, 5)。この病態には、ウイルス感染によって、感染細胞から産生が誘導されるさまざまなサイトカインが深く関与することも示唆されている (6, 7)。また、これらのサイトカイン産生と気道リモデリングには、肺組織に多く含まれる線維芽細胞が深く関与していることが推察される (8)。また、強い抗炎症効果を有するコルチコステロイドは、喘息などのアレルギー性疾患を含め、臨床において広汎に用いられている。その作用機序について、多くの知見が集積しつつあるが(9, 10)、ウイルス感染によって引き起こされる過剰な炎症反応や virus-induced asthma の本剤の抑制機構に

ついては、いまだ解明に至っていないと思われる。

そこで、本研究においては、種々の呼吸器ウイルス感染肺線維芽細胞によって惹起されるサイトカイン産生ならびにサイトカイン産生に関与するシグナル伝達機構解明、さらに、これらサイトカイン産生系へのステロイド抑制機構の解明を目的とした以下の内容の研究を行った。

B. 研究方法

1. ウイルス

RSV (Long strain, ATCC; VR-26)は、HEp-2 細胞にて培養・増殖した後、シヨ糖密度勾配法を用いて回収したウイルス液を試料として用いた。HRV (type 14, V-103-501-558 strain, ATCC; VR-1124AS/GP)をヒト胎児肺線維芽細胞(MRC-5, ATCC; CCL-171)にて培養・増殖した後、細胞培養液を 5,000rpm, 30 分, 4°Cにて遠心分離した。遠心分離した上清は、フィルターを用いて精製・濃縮し、試料として用いた。また、PIV 3 型(C243)を Vero E6 細胞にて培養・増殖した後、シヨ糖密度勾配法を用いて回収したウイルス液を試料として用いた。

2. 細胞

ヒト胎児線維芽細胞 (MRC-5, ATCC; CCL-75)を、常法により培養した後、マイクロプレートに播種した。

3. サイトカインおよびリン酸化シグナルタンパクの測定

MRC-5 細胞に 1 Multiplicity of infection (MOI)のそれぞれのウイルスを感染後、24 時間後の細胞上清を採取し、これらの試料中に含まれる 27 から 29 種類のサイトカイン解析を行った。さらに、それぞれのウイルス感染細胞から産生されたサイトカインとシグナルタンパクとの関連性について検討するため、それぞれのウイルス感染 MRC-5 細胞からタンパクを抽出し、12 種類のシグナル関連タンパク質のリン酸化について解析を行った。

C. 研究結果

RSV、HRV、および、PIV3 のウイルス感染 24 時間後では、炎症性サイトカインの IL-6、および TNF- α 、Th2 サイトカインの IL-5 および IL-10、好中球遊走サイトカインの IL-8、および IP-10 が有意に産生された(図 1, 3, 4)。これらのサイトカイン以外でも、それぞれのウイルスによって産生が増強したサイトカインが認められた。また、RSV によって産生が増強されたサイトカインは、ステロイド剤である Fluticasone propionate により有意に抑制された(図 1)。同様に、HRV 感染において産生が増強されたサイトカインは、Fluticasone propionate により有意に抑制された(図 3)。さらに、RSV 感染は、Akt、p38MAPK、ERK1/2、および I κ B α のリン酸化を有意に増強した(図 2)。これらのシグナルタンパクのリン酸化は Fluticasone propionate により有意に抑制されたが、I κ B α のリン酸化は阻害されなかった(図 2)。さらに、PIV3 感染による I κ B α 、および

p38MAPK のシグナル伝達経路とサイトカイン産生との関係について、それぞれの特異的阻害剤(BMS-345541,および SB203580)を用いて調べたところ、PIV3 によって誘導された多くのサイトカインの産生が明らかに阻害された(図 4)。また、PIV3 感染により、I κ B、および p38 MAPK のリン酸化が有意に増強したが、Akt のリン酸化は増強しなかった(図 5)。

D. 考察

本研究により、PIV3 感染はヒト胎児肺線維芽細胞から I κ B α 、および p38 MAPK のシグナル経路を介して、また RSV 感染は I κ B α 、p38MAPK、ERK1/2 および Akt のシグナル経路を介し多くのサイトカインを産生・放出することが明らかになった。これらの多量のサイトカイン産生とサイトカインバランスの不均衡が、部分的にはあるが喘息の病態生理や気道リモデリングに関与していることが示唆された。特に、HRV 感染においては、これらの多量のサイトカイン産生のなかで、Th1 細胞と Th2 細胞のバランスが Th2 細胞優位になることが、部分的にはあるが喘息の発症や症状の悪化に関与していることが示唆された。

今回の結果から、RSV、HRV、および PIV3 は、肺の気道上皮細胞のみならず線維芽細胞にも感染し、種々のサイトカイン産生を亢進することも明らかになった。このことは、これらのウイルス感染によって生ずる重症化、特にサイトカインストームへの関与も示唆する。さらに、これらのシグナル伝達経路とし

て I κ B α および p38MAPK のリン酸化が関与していることも推察された。RSV においては、ERK1/2 および、Akt のリン酸化も関与していた。

多くのサイトカインのシグナルタンパクとされる NF- κ B は、阻害蛋白である I κ B α により核内移行を抑制されているが、ウイルス感染などの刺激により I κ B α のリン酸化が起こり、I κ B α から遊離した NF- κ B の核内移行によりサイトカイン産生シグナルが核に伝達される(8)。ステロイドが I κ B α mRNA を誘導し、I κ B α を増加させることにより NF- κ B の核内移行を抑制しているとの報告もあり(9, 10)、本研究結果もこれに準ずるものと考えられる。このようにステロイドによるシグナル伝達機構の抑制がサイトカイン産生の抑制に関与することも示唆され、RSV 感染においては、このウイルスによって引き起こされる喘息の病態緩和につながっているものと考えられた。

また、HRV 感染 MRC-5 細胞からは、Th2 サイトカインである IL-13 の産生が明らかになった。IL-13 は気道過敏性の亢進、粘液産生、気道リモデリング等の気道組織における気管支喘息の病態形成といった免疫系機能に関与しているといわれ(8)、HRV 感染が自然免疫系を介して、IL-13 を主体とした Th2 免疫機構を増強し、このことが気道のリモデリングに至る主要なカスケードになっているのではないかと考えられた。

一方、IL-12 の若干の上昇は認められたもの

の、代表的な Th1 サイトカインである IFN- γ は、HRV 感染によっても産生が有意に上昇していないこともわかった。MRC-5 細胞への RV 感染は、弱い炎症を誘導したことから、乳幼児の気道における微小環境での Th1, Th2 免疫機構を傷害し、小児喘息の重要なメカニズムである Th2 免疫機構を増大することが示唆された。

RSV、HRV、および PIV3 感染による胎児肺線維芽細胞の炎症性サイトカインを中心としたサイトカインの異常産生による生体反応機構は、単に呼吸器感染症として、急性の気道炎症を惹起するだけでなく、喘息の発症や増悪および気道リモデリング等の重要な機構になっていると考えられた。

E. 結論

本研究により、RSV、HRV、および PIV3 感染により、ヒト胎児肺線維芽細胞から種々のサイトカイン産生が誘導されることが明らかになった。この産生機構には、I κ B α や p38MAPK 等をはじめとするシグナルタンパクのリン酸化が重要であることが判明した。また、産生された多量のサイトカインが種々の病態、サイトカインストーム、喘息の発症増悪および気道リモデリングに関与することも推察された。

F. 参考文献

1. Johnston, S. L. Overview of virus-induced

- airway disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004; 2: 150-156.
2. Lemanske RF Jr, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, Kirk CJ, Reisdorf E, Roberg KA, Anderson EL, Carlson-Dakes KT, Adler KJ, Gilbertson-White S, Pappas TE, Dasilva DF, Tisler CJ, Gern JE. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:571-577.
 3. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:137-141.
 4. Kotaniemi-Syrjänen, A., Vainionpää, R., Reijonen, T. M., Waris, M., Korhonen, K., and Korppi, M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111:66-71.
 5. Martinez, F. D. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2003; 22: S76-S82.
 6. Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 3546-3556.
 7. Barrett, N. A., and Austen, K. F. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*; 2009; 31: 425-437.
 8. Puxeddu, I., Bader, R., Piliponsky, A. M., Reich, R., Levi-Schaffer, F., and Berkman, N. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117: 103-110.
 9. Barrett, N. A., and Austen, K. F. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*; 2009;31:425-437.
 10. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Yamada N, Nakayama K, Ishizuka S, Kamanaka M, Morimoto T, Numazaki Y, Sasaki H. Effects of dexamethasone on rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278:L560-71.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Okabe-Kado J, Goya T, Kimura H. Cytokine profiles, signalling pathways and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human foetal lung fibroblasts. *Cell Biol Int.* in press.
 - 2) Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in

- parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front in Virol* 2010;1:124.
- 3) Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int*. 2011; 35(5):467-74.
 - 4) Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2010;63(5):378-80.
 - 5) Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Seto J, Mizuta K, Ahiko T, Tsukagoshi H, Nagano M, Noda M, Mizutani T, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis*. 2010;42(11-12):950-2.
 - 6) Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22(1 Pt 2):e87-94.
 - 7) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis*. 2011;11:168.
 - 8) Tanaka T, Yokoi H, Kobayashi K, Iwanade H, Noguchi Y, Mitsui Y, Okamoto A, Saitoh M, Noda M, Takeda M, Okabe N, Kimura H. First detection of measles virus genotype g3 in a Japanese woman: an imported case. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64:262-3.
 - 9) Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y. Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30:680-3.
 - 10) Nakamura M, Taira K, Tsukagoshi H, Itokazu K, Nidaira M, Okano S, Kudaka J, Noda M, Takeda M, Kimura H. Detection of various respiratory viruses in patients with influenza-like illness before and after emergence of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus in Okinawa. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64:87-9.
 - 11) Omura T, Iizuka S, Tabara K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Kimura H. Detection of human metapneumovirus

genomes during an outbreak of bronchitis and pneumonia in a geriatric care home in Shimane, Japan, in autumn 2009. Jpn J Infect Dis. 2011;64:85-7.

H. 知的財産の出願・登録状況

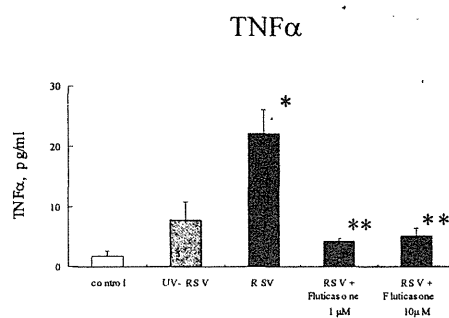
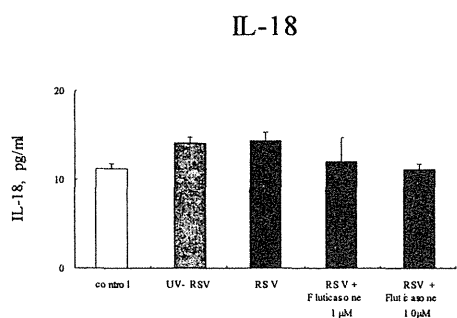
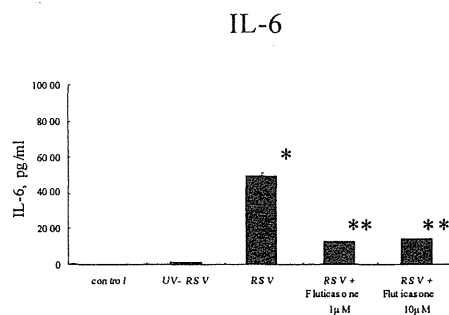
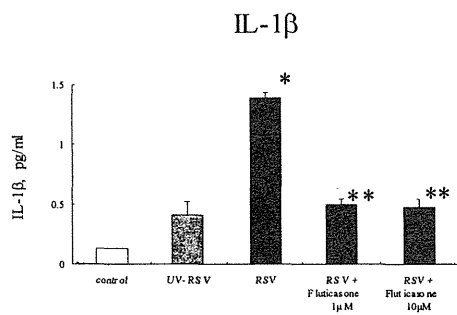
なし

Proinflammatory cytokines

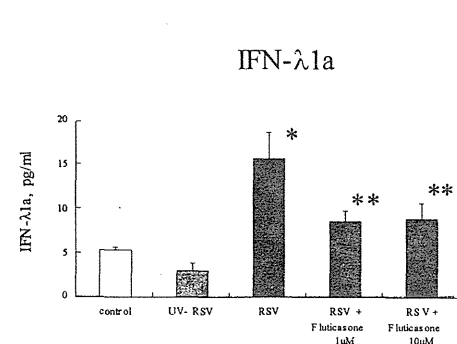
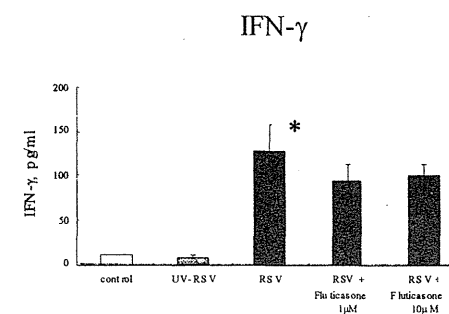
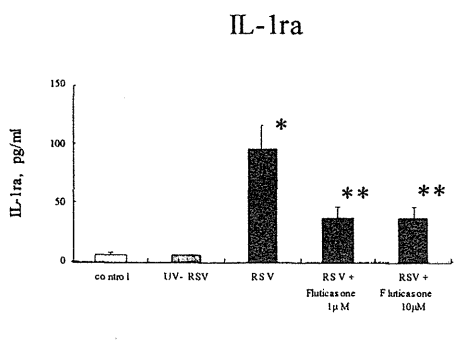
1 MOI / 24hr

* $P < 0.05$; control vs RSV 1MOI

** $P < 0.05$; RSV 1MOI vs Fluticasone



Anti-inflammatory cytokine



Th1 cytokines

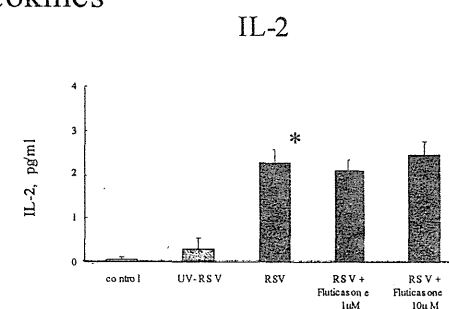
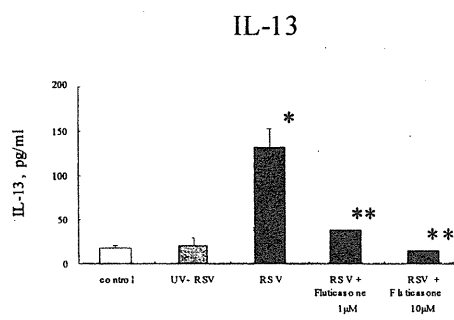
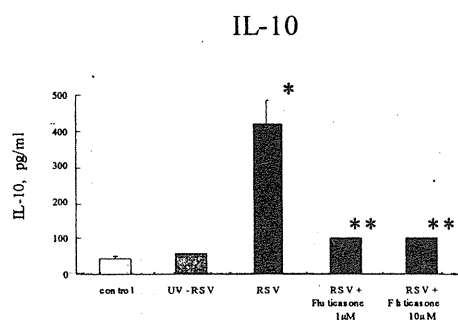
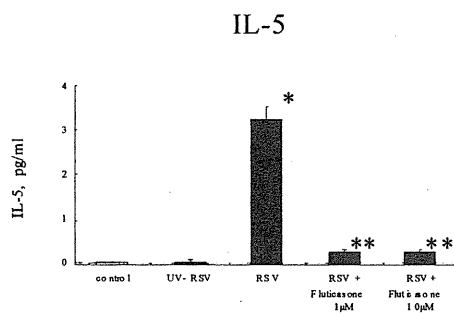
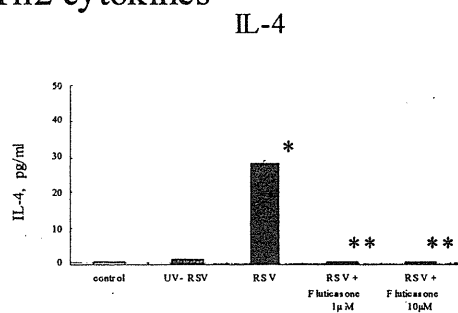
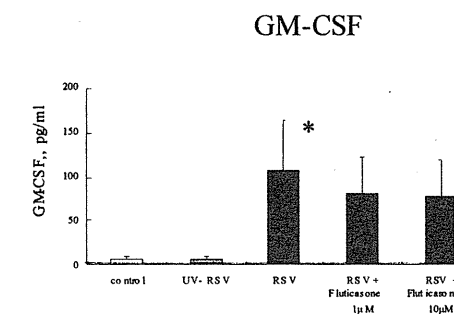
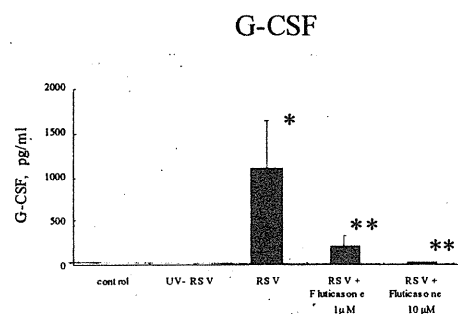


図1 RSV 感染 MRC-5 細胞からのサイトカイン産生

Th2 cytokines



Granulopoiesis-inducing cytokines



Neutrophil recruitment-inducing cytokines

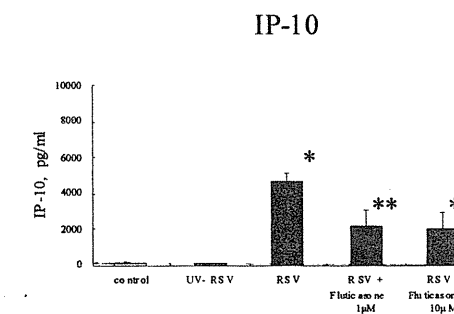
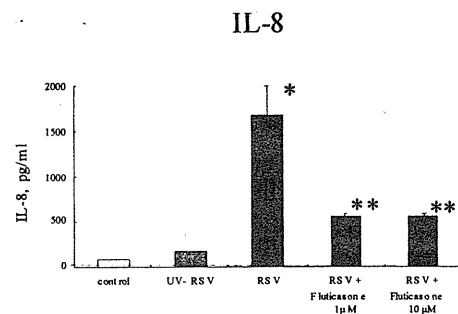
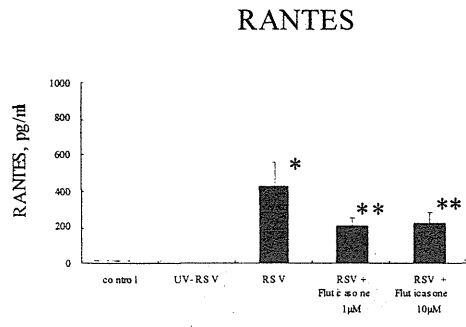
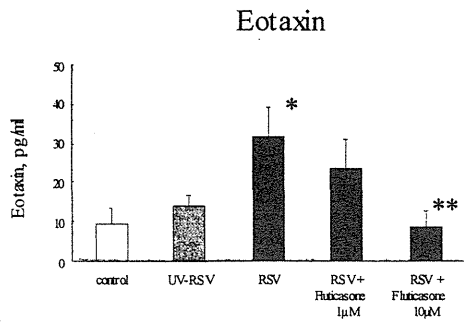


図1 RSV感染MRC-5細胞からのサイトカイン産生(続き)

Eosinophil recruitment-inducing cytokines



Tissue remodeling-related cytokines

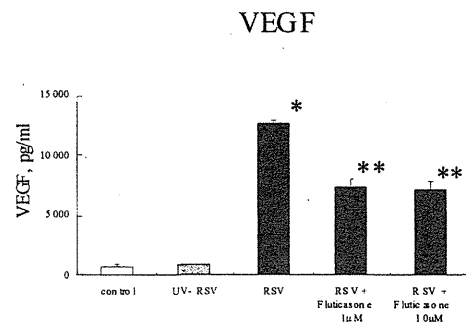
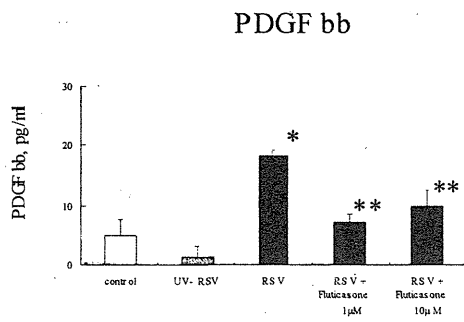


図1 RSV感染MRC-5細胞からのサイトカイン産生(続き)

1 MOI / 10hr

$P < 0.05$; control vs RSV 1MOI

** $P < 0.05$; RSV 1MOI vs Fluticasone

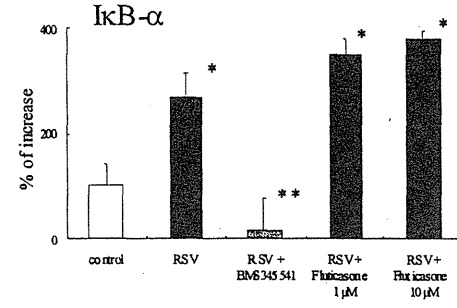
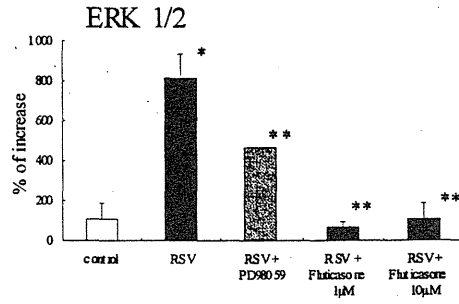
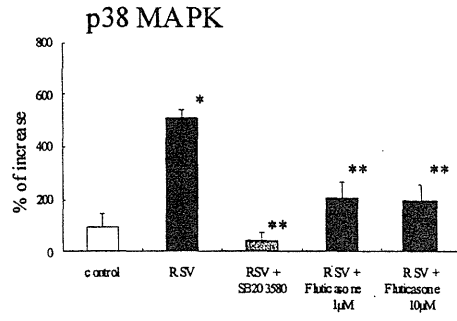
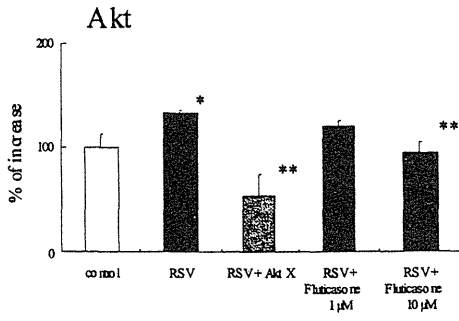
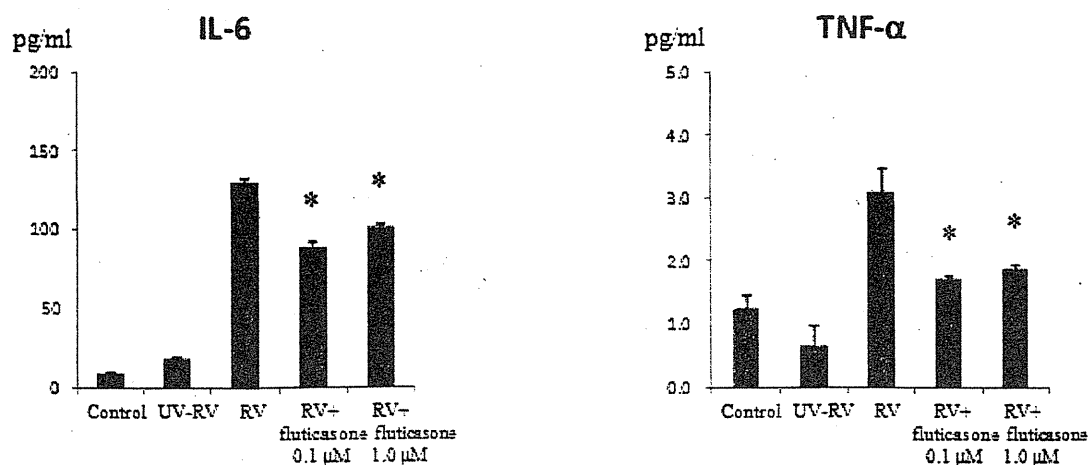


図2 RSV 感染 MRC-5 細胞からのリン酸化シグナルタンパク産生

* $P < 0.05$; RV 1.0 MOI vs Fluticason

Proinflammatory cytokines



Th1 cytokines

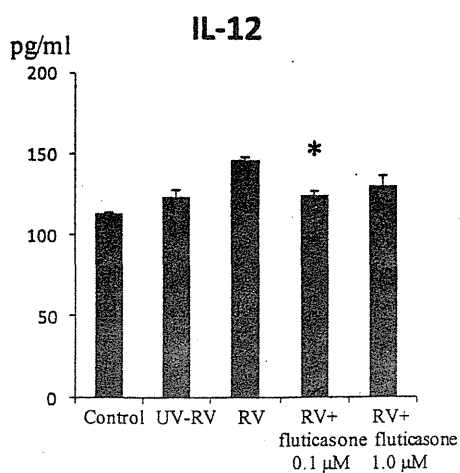
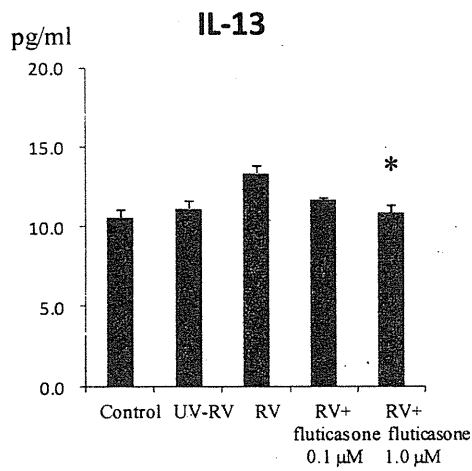
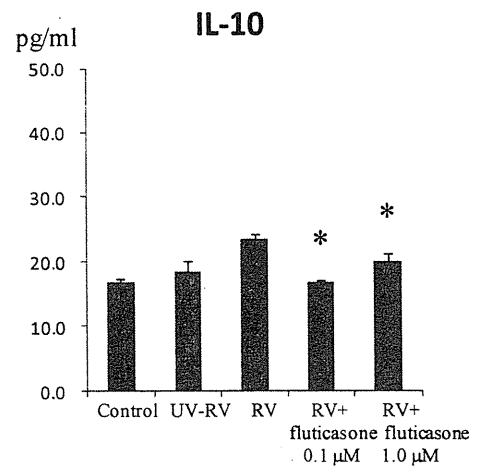
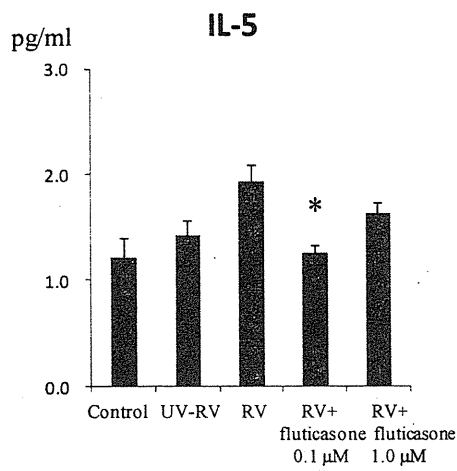


図3 HRV 感染 MRC-5 細胞からのサイトカイン産生

Th2 cytokines



Neutrophil recruitment-inducing cytokines

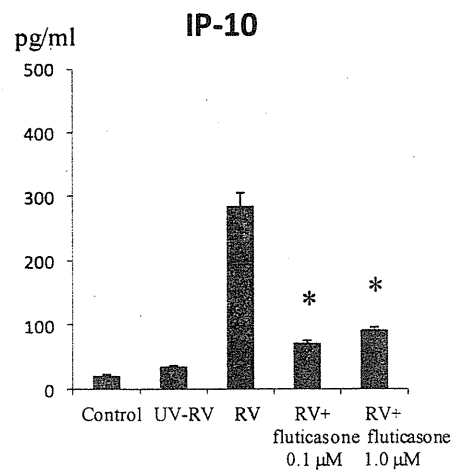
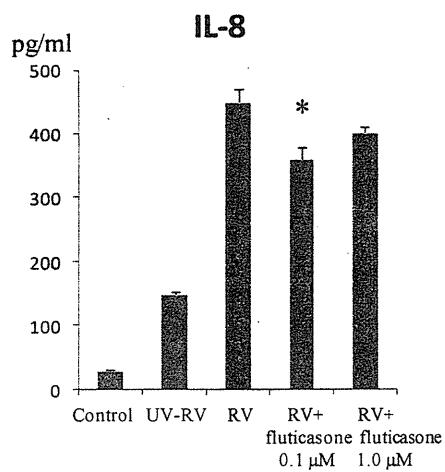
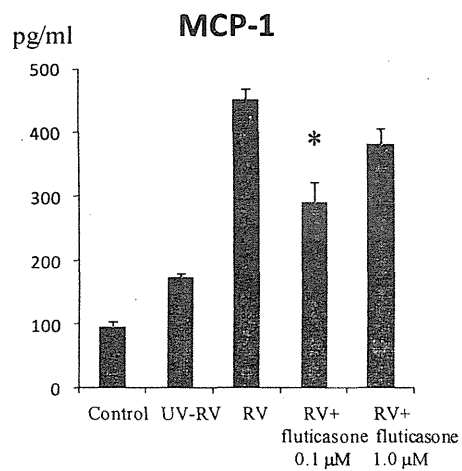


図3 HRV 感染 MRC-5 細胞からのサイトカイン産生 (続き)

Monocyte recruitment-inducing cytokine



Tissue remodeling-related cytokines

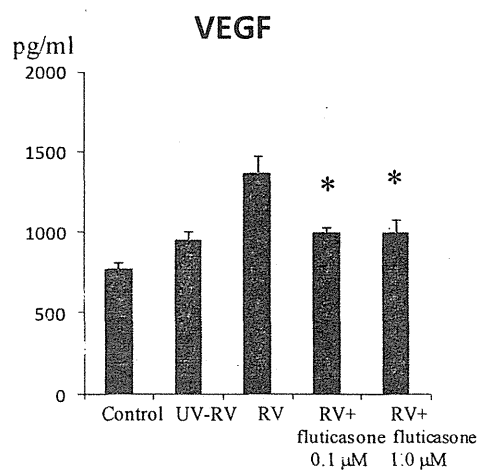
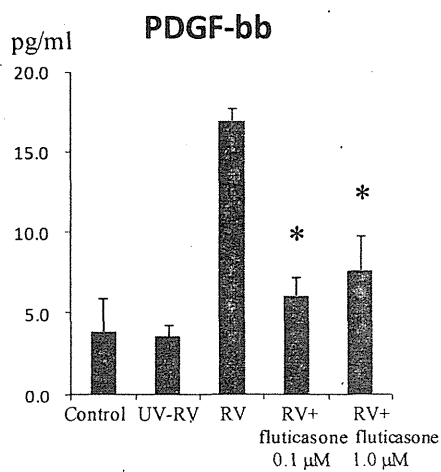
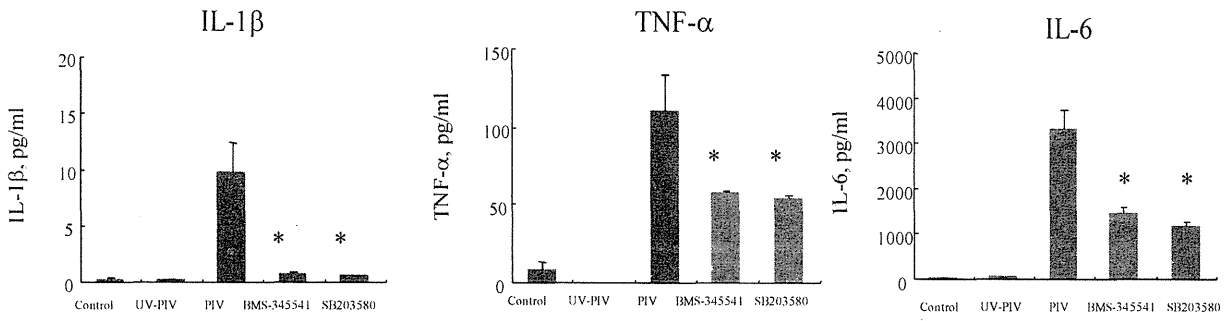
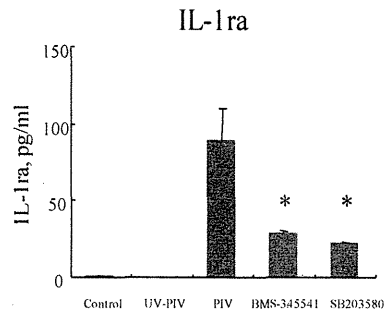


図3 HRV 感染 MRC-5 細胞からのサイトカイン産生 (続き)

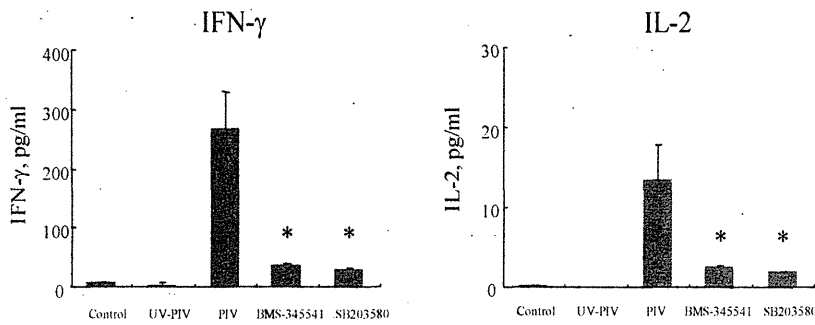
Proinflammatory cytokines



Anti-inflammatory cytokine



Th1 cytokines



Th2 cytokines

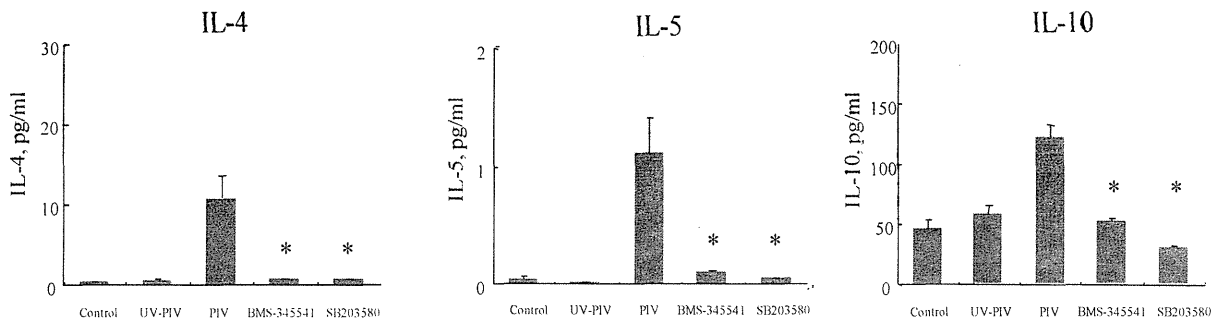
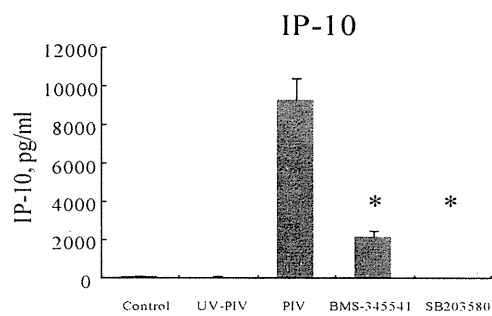
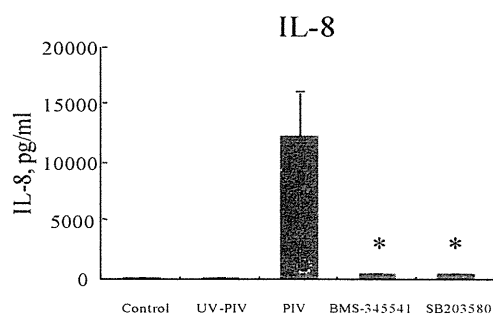
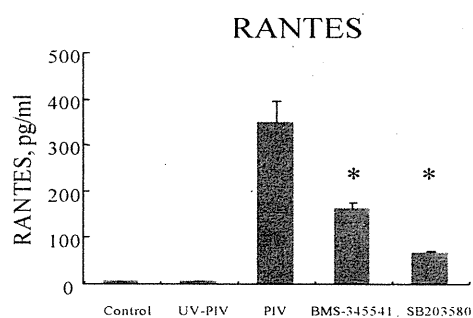
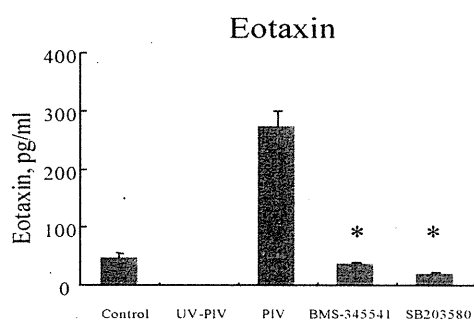


図4 PIV3 感染 MRC-5 細胞からのサイトカイン産生

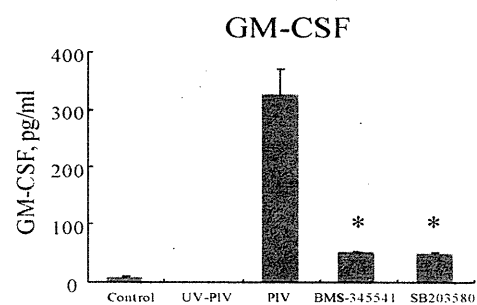
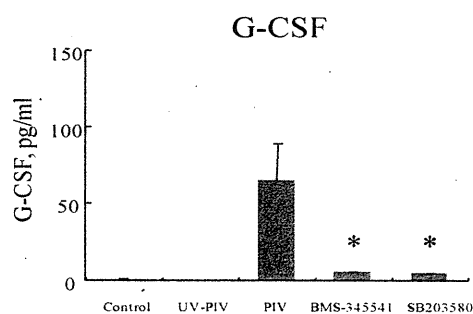
Neutrophil recruitment-inducing cytokines



Eosinophil recruitment-inducing cytokines



Granulopoiesis-inducing cytokines



Tissue remodeling-related cytokines

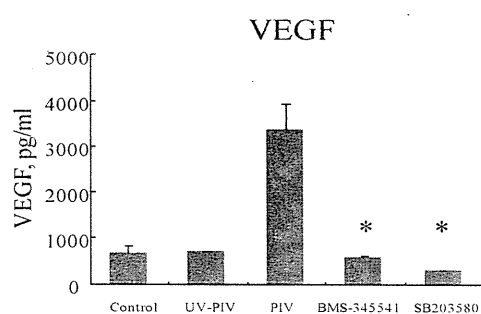
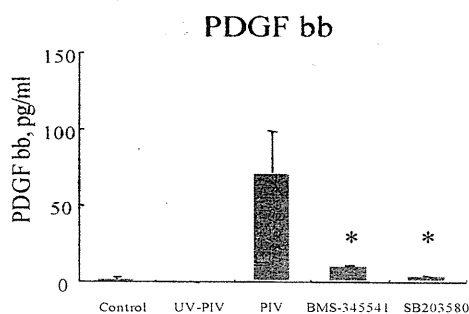


図4 PIV3 感染 MRC-5 細胞からのサイトカイン産生 (続き)

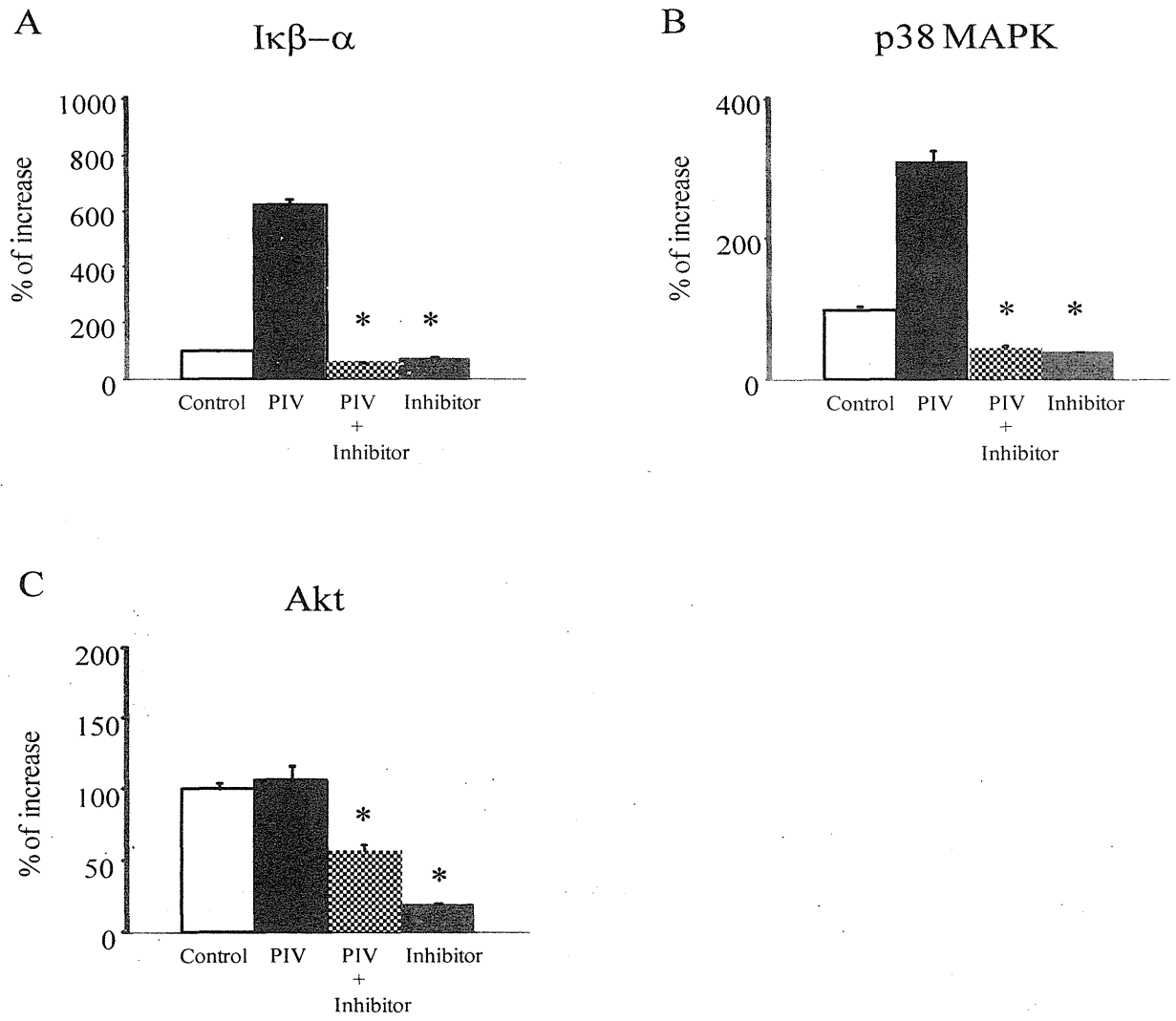


図5 PIV3 感染 MRC-5 細胞からのリン酸化シグナルタンパク産生