

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

感染重症化とプロテアーゼ：高病原性鳥インフルエンザウイルスの HA 解列酵素 MSPL の作用と、インフルエンザ心筋炎における MMP-9 の関与についての研究

研究分担者 高橋 悦久
徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教

研究要旨

我々はインフルエンザ感染における重症化は血管内皮と各臓器で誘発される “ インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ ” サイクルが主要原因で、このサイクルを介する血管内皮細胞障害が多臓器不全の根底にあることを明らかにした。MSPL は、II 型の膜結合型セリンプロテアーゼとしては初めて連続した塩基性アミノ酸を基質として認識し、特異的に加水分解する唯一の酵素であった。また、全身臓器での発現解析から MSPL がヒトと鳥に広く分布することが明らかとなったことから高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) ウイルス HA の解列に関与することが示唆された。HPAI ウイルスは HA の切断部位配列として R-X-K/R-R と K-K/R-K/T-R (P4 位に R 又は K) の 2 型を持つことより、A/crow/Kyoto/53/2004 をもとにリバースジェネティクス法を用いて 2 種類の切断部位配列を持つ HPAI ウイルス株を作成した。この変異株を用いて、ウイルスの増殖性を蛍光染色で見ると、MSPL が発現していない細胞株では増殖性が低いことが明らかとなった。この結果より、これまで高病原性鳥インフルエンザウイルス HA の解列に関与すると言われてきた Furin や PCs は、P4 位が K の場合 processing しないが、MSPL は P4 位が R/K のいずれに対しても作用するため、全ての高病原性鳥インフルエンザウイルスの増殖への関与が示唆された。更に MSPL-KO マウスに解列部位の異なる 2 型の HPAI を感染させて感染 3 日後と 6 日後の肺を HE 染色した結果 P4 位を K に置換したウイルスをノックアウトマウスに感染させたときの炎症が軽度であることが明らかとなった。また肺のホモジネート中では IL-1beta、INF-gamma の減少が確認された。これらの結果より MSPL の特異的阻害剤を用いることで高病原性鳥インフルエンザの重症化が阻止できると考えられる。(2) インフルエンザ感染により “ インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ ” サイクルを介するプロテアーゼとして MMP-9 の発現上昇が認められている。本研究でクラリスロマイシン (CAM) を経口投与したマウスでは、ゼラチンザイモグラフィとウエスタンブロットングで確認した結果 MMP-9 の発現が低下することが明らかとなった。また、インフルエンザウイルスの活性化酵素であるトリプシンとともに MMP-9 の発現調節に関与している NF-kappaB の発現が感染 6 日目の肺において低下することが明らかとなった。更に、肺の HE 染色で炎症が軽減したことが確認された。

A . 研究目的

インフルエンザ脳症、多臓器不全の病態解析から、重症化は血管内皮と各臓器で誘発される“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルが主要原因で、このサイクルを介する血管内皮細胞障害が多臓器不全の根底にあることを明らかにした(*J. Infect. Dis.* 202:991-1001, 2010、*Cardiovasc. Res.* 89:596-603, 2011)。また、我々はインフルエンザ治療薬として使われているクラリスロマイシン(CAM)が免疫増強作用を有すること(*J. Virol.* 2012 Oct;86 (20): 10924-34)を報告してきた。本プロジェクトでは(1)高病原性鳥インフルエンザの活性化酵素として見出されたMSPL についての酵素学的性状解析とMSPL-K0(knock-out)マウスの解析から本酵素の阻害剤を用いた重症化の治療を検証する。(2)インフルエンザ感染により誘発される心筋炎などの心機能低下に関与すると考えられるMMP-9の発現をCAM投与により抑制が可能かどうかを調べることにより重症化阻止につなげる。

B . 研究方法

(1)高病原性鳥インフルエンザウイルスが活性化されるかを調べるため、MSPL-K0 マウスに、ヘマグルチニン(HA)の解列部位を高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染に関わるとされているFurinが認識できるRKKRタイプからFurinが認識出来ないKKKRタイプに変異させ、感染による体重変化、致死率、組織のHE染色像を確認した。また感染マウスから採取した肺ホモジネートを培養細胞(MDCK)に添加することで増殖したウイルスを蛍光染色で確認した。更に、肺ホモ

ジネート中の炎症性サイトカインを調べた。

(2)マウスに季節性インフルエンザ(PR8)を感染させてCAMを経口で投与した。感染3日目と6日目の血液・肺・心臓を採取しMMP-9の発現をゼラチンザイモグラフィ、ウエスタンブロットティングにより評価した。更に、MMP-9 に関与する転写因子であるNF-kappaBの発現についてもウエスタンブロットティングにて確認した。

C . 研究結果

(1)MSPL-K0 マウスに高病原性鳥インフルエンザを感染させたとき、感染3日後と6日後の肺で増殖したウイルスはWTマウスにFurin認識タイプのRKKR株を感染させた時よりMSPL-K0マウスが有意に減少することが明らかとなった(図1)。またKKKR株でも同様にK0マウスにおいて感染細胞数の減少が認められた。この時採取した肺のHE染色像でも、ウイルスの増加と相関して炎症が広がっていることが確認された(図2)。更にMSPL-K0マウスでは炎症性のサイトカインであるIL-1beta、TNF-alpha、IFN-gamma、MIP-1-alphaが減少していることが明らかとなった(図3)。

(2)PR8を感染させてCAMを経口投与したマウスではコントロール群と比べてMMP-9の発現が低下することがゼラチンザイモグラフィによる解析により明らかとなった(図4A)。この時、活性型への変換効率が低下していることが示された(図4B)。また、感染3日後の肺の気管近傍でメチルセルロース(MC)に比べてCAMを投与することで炎症が軽減されることをHE染色像で示す(図5)。エバンズブルーを静脈にインジェクションして肺組織への漏出を確認した結果CAM投与群

で軽度であった。更に感染 6 日目の肺では転写因子 NF-kappaB の発現低下も認められた (図 6)。

D . 考察

(1)高病原性鳥インフルエンザ感染において MSPL は RKKR、KKKR タイプの株共に HA 解列に大きく関与していることが示唆された。したがって MSPL の酵素学的性状を明らかにし、新たな阻害剤を探索することが高病原性鳥インフルエンザ感染の重症化の治療に有用であると考えられる。

(2)季節性インフルエンザ感染で CAM の服用で MMP-9 の発現が低下することが確認できた。更に NF-kappaB の低下も認められていることから MMP-9 の活性化酵素であるトリプシンの発現低下も示唆される。今後、心臓のエコー解析によりインフルエンザ重症化により引き起こされる心筋炎の治療に関して CAM の有用性を検証する。

E . 結論

G . 研究発表 (平成 25 年度)

論文発表

(1)Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, Echigo N, Kido H, Nakamura S, Mashino T, Okutani T, Kuzuhara T. Correction: Anti-Influenza

Activity of C₆₀ Fullerene Derivatives. PLoS One. 2013 Nov 12;8(11)

(2) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai M, Hirotsu N, Kido H. Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors: A retrospective analysis., *PLoS ONE*, Vol.8(7), e70060, 2013

(3) Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, Echigo N, Kido H, Nakamura S, Mashino T, Okutani T, Kuzuhara T. Anti-Influenza Activity of C60 Fullerene Derivatives, *PLoS ONE*, Vol.8(6), e66337, 2013

学会発表

1. 高橋悦久、片岡宏介、Irene Lorinda Indalao、堺 聡子、木戸 博、Airway mucosal IgA which reduced by oseltamivir is improved by combination with Clarithromycin in mice infected with influenza A virus、第 86 回日本生化学会大会

図 1 MDCK 細胞に感染させた肺ホモジネート中のウイルス

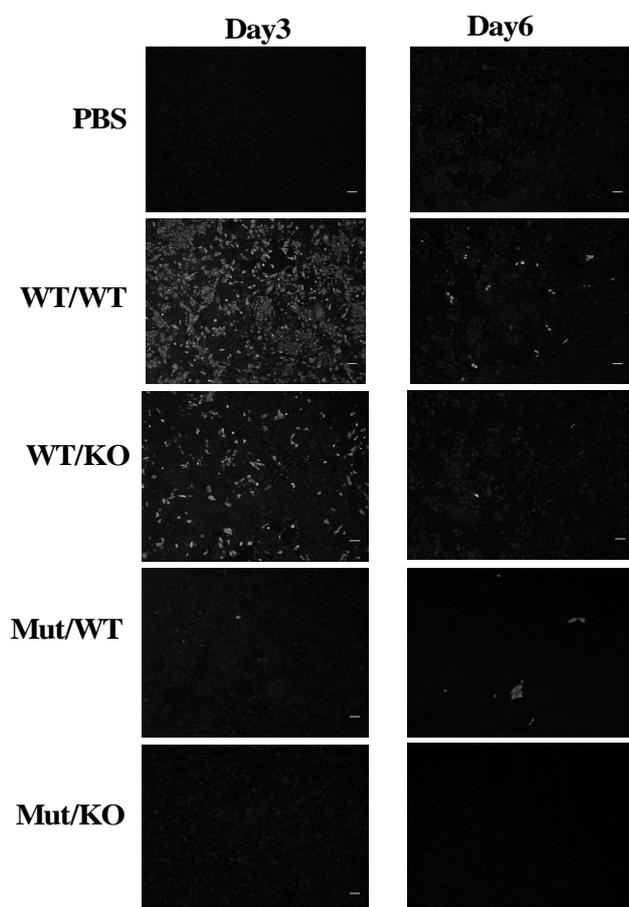


図 2 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺の HE 染色像

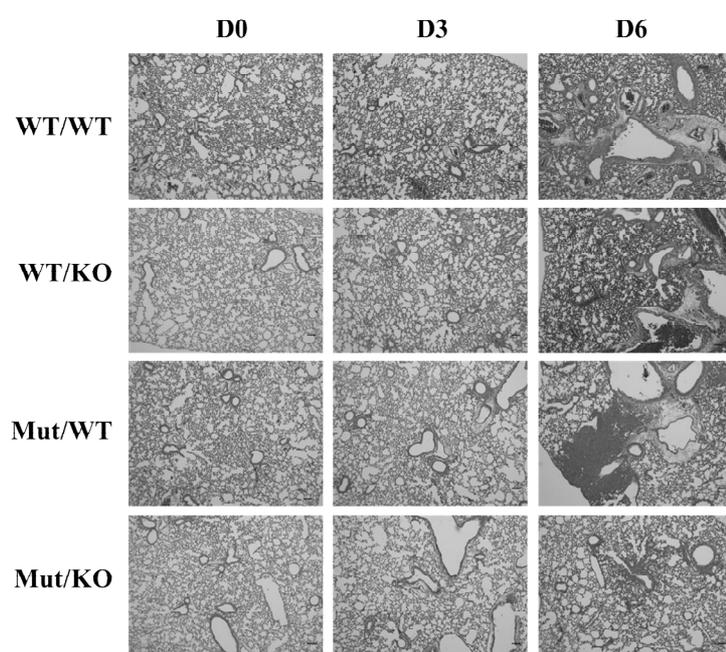


図3 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺ホモジネート中の各

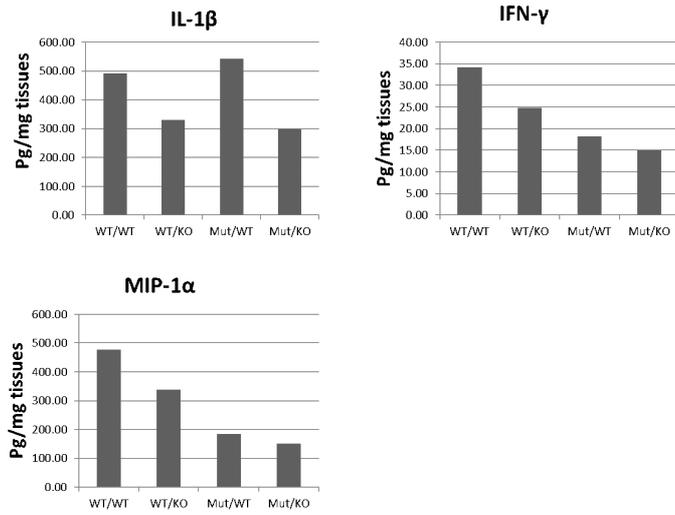
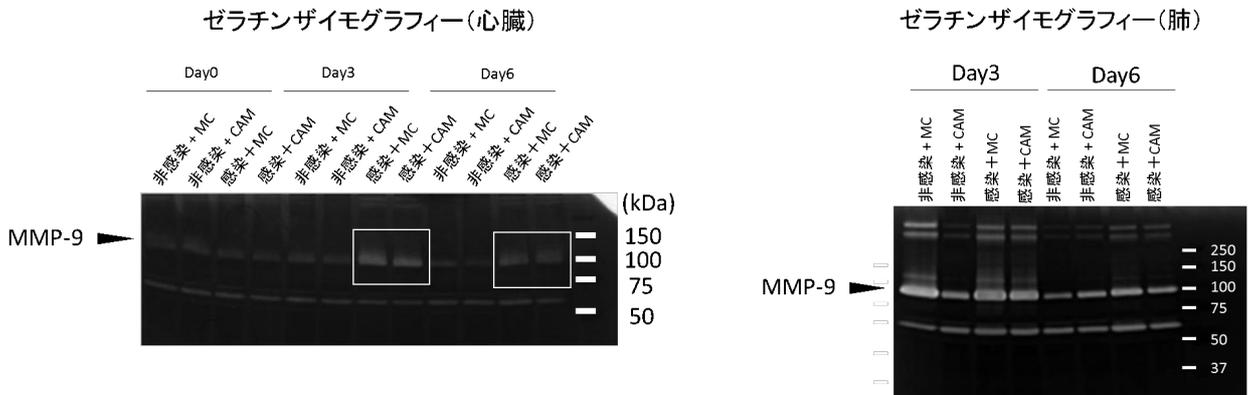


図4 CAM 投与による MMP-9 の発現変化

A



B

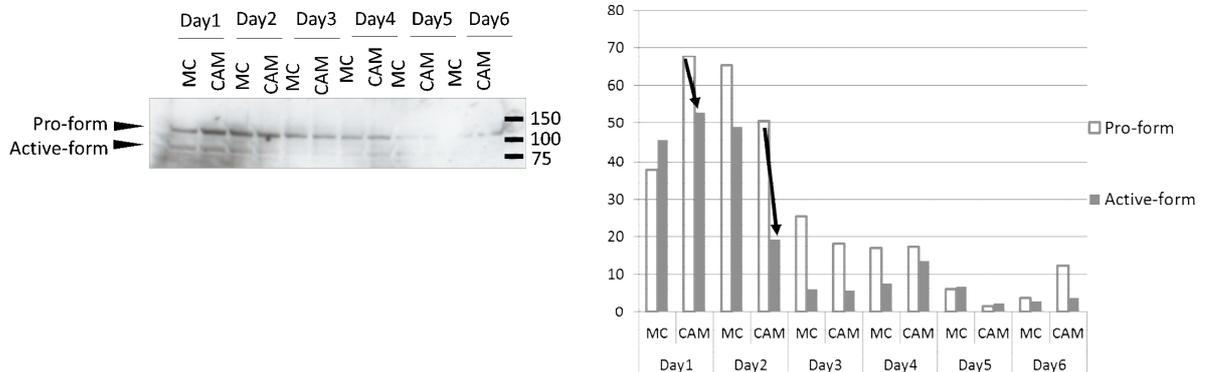


図5 感染3日目の肺のHE染色

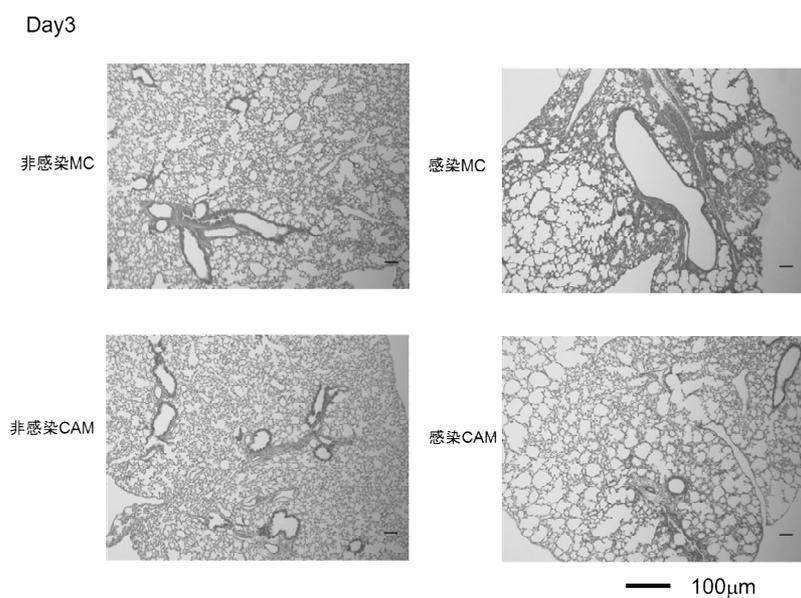


図5 ウェスタンブロッティングによるCAM投与マウスのNF-kappaBとMMP-9の発現変化

