

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

中枢神経症状を示したインフルエンザ A(H1N1)pdm09 と
ロタウイルス胃腸炎における宿主遺伝子発現の解析

研究分担者 森島恒雄

研究協力者: 津下 充、齋藤有希恵、藤井洋輔、八代将登、塚原宏一
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学)

研究要旨

インフルエンザ A/H1N1 2009 pdm09 感染では重症肺炎や ARDS だけでなく、痙攣・意識障害等の中枢神経症状も合併することが報告されている。一方、ロタウイルス胃腸炎もまた痙攣重積等の中枢神経症状を合併することが知られている。痙攣重積を伴うインフルエンザ A/H1N1 pdm09 と痙攣重積を伴うロタウイルス胃腸炎の病態の違いを検討するために、患者末梢血を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

痙攣重積を示したインフルエンザ A/H1N1pdm09 では、immune response に関連した遺伝子群、特に IL1R/TLR といった自然免疫や T 細胞受容体シグナルに関与する遺伝子が発現変化していた。一方、痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎では、細胞内酸化ストレスに対する防御反応に関連する遺伝子群が発現変化していた。

これらの宿主遺伝子発現の違いから、インフルエンザ A/H1N1pdm09 とロタウイルス胃腸炎における痙攣重積の病態が必ずしも同一ではないことが示唆された。

A. 研究目的

2009 年に流行したインフルエンザウイルス A/H1N1 pdm09 感染では、小児や基礎疾患を有する患者を中心に重症肺炎、ARDS を呈する症例が多くみられた。また、呼吸器合併症だけでなく、痙攣や意識障害等の神経合併症を示す症例が多く報告された。

一方、ロタウイルス胃腸炎はしばしば痙攣重積を合併することが知られており、多くの症例で無熱性・群発性を示すことが知られている。

痙攣重積を伴うインフルエンザウイルス A/H1N1 pdm09 感染症と痙攣重積を伴うロタウイルス胃腸炎の病態の違いを明らかにするために、患者末梢血を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

B. 研究方法

対象は、インフルエンザ A/H1N1 pdm09 に罹患し痙攣重積を認めた 5 例 (Flu-seizure group)、痙攣重積を認めなかった 5 例

(Flu-control group)、ロタウイルス胃腸炎に罹患し痙攣重積を認めた 3 例 (Rota-seizure group)、痙攣重積を認めなかった 3 例 (Rota-control group) とした。全例で予後は良好で後遺症は認めなかった。急性期および回復期に末梢血を採取し、全血より RNA を抽出し cDNA・cRNA 合成、ラベリングを行なった。使用したアレイは Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affimetrix)を用いた。遺伝子発現の変化は急性期と回復期のシグナル比を算出し解析に用いた。

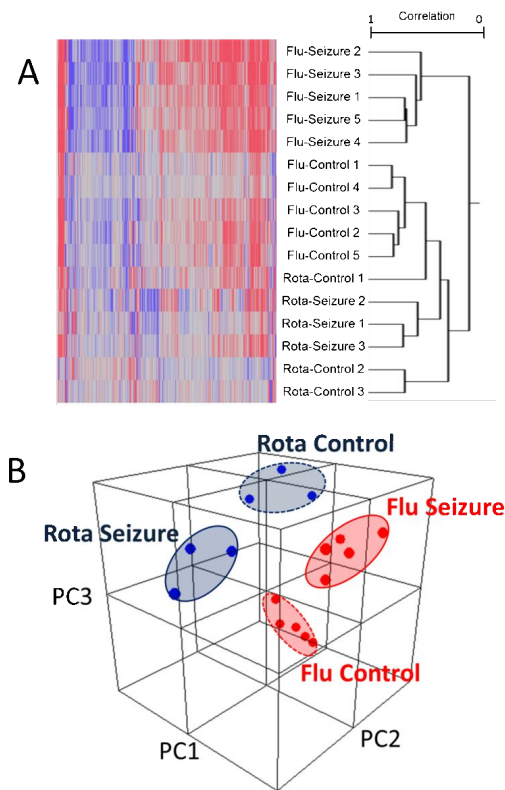
C. 研究結果

各症例の遺伝子発現パターンを、クラスター解析・主成分分析を用いて樹状図または三次元分布図で表した(図1)。その結果、4 つの group (Flu-seizure, Flu-control, Rota-seizure, Rota-control) は、樹状図および三次元分布図で明らかなクラスターを形成した。この結果から各 group はそれぞれ異なる遺伝子発現プロファイルを示すことを確認した。

(図 1) 各症例の遺伝子発現プロファイル

(A) クラスタ解析による樹状図

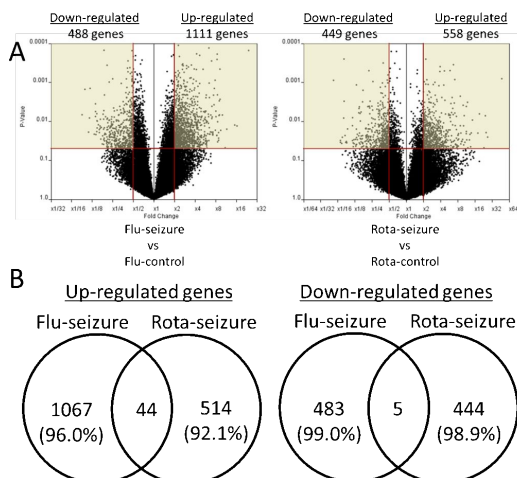
(B) 主成分解析による三次元散布図



さらに、痙攣重積を認めた群で発現が有意に増加もしくは減少した遺伝子の数を検討した(図2)。Flu-seizure group で発現が増加したのは 1111 遺伝子、減少したのは 488 遺伝子であった。Rota-seizure group で発現が増加したのは 558 遺伝子、減少したのは 449 遺伝子であった。Flu-seizure group と Rota-seizure group の両者に共通して発現変化した遺伝子は合わせて 49 遺伝子であり、少数であった。

(図 2) (A) 痙攣重積群における各遺伝子の発現変化とp値

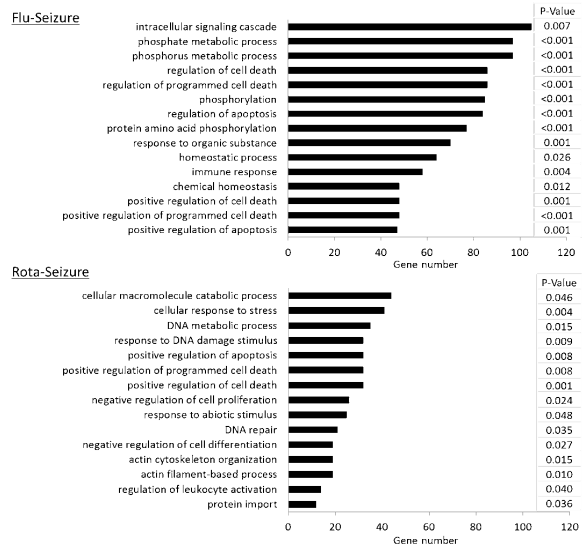
(B) 痙攣重積群で発現増加・減少を認めた遺伝子数



この結果より、痙攣重積発症に関わる遺伝子発現プロファイルはインフルエンザ AH1N1pdm09 とロタウイルス胃腸炎でそれぞれ異なっている可能性が示唆された。

次に遺伝子機能(gene ontology)解析を行った。その immune response に関連する遺伝子群の発現変化は、Flu-seizure group で有意に認められた(図3)。

(図 3) 痙攣重積を示したインフルエンザおよびロタウイルス胃腸炎で発現変化した遺伝子群の遺伝子機能(Gene Ontology)



Flu-seizure group で発現変化が強かった immune response 関連遺伝子には、IL18R1, IL1R1, IL1R2, IL1RAP, TLR4, TLR8 が含まれており、これらは自然免疫で重要な役割を果たす interleukin-1 receptor/Toll like receptor (IL1R/TLR) superfamily に属する。痙攣重積を伴うインフルエンザ AH1N1pdm09 の病態に IL1R/TLR の強い関与が示唆された(表1)。また、パスウェイ解析では、T 細胞受容体シグナリングに関連する遺伝子群が Flu-seizure group で有意に発現変化していた(図4)。

(図 4) 痙攣重積を示したインフルエンザおよびロタウイルス胃腸炎で発現変化した遺伝子群の関連パスウェイ

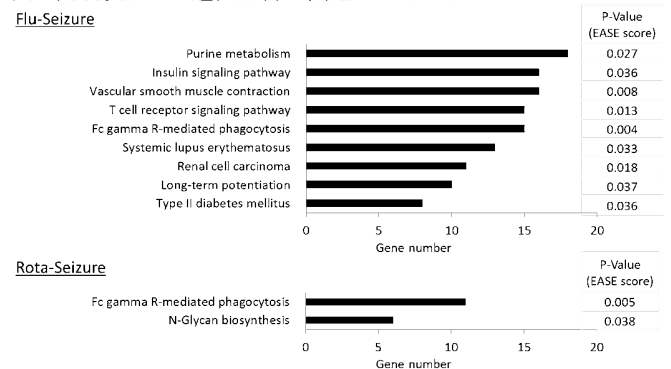


表1 痙攣重積を示したインフルエンザ AH1N1pdm09 で発現変化した immune response 関連遺伝子

Up-regulated genes

Probe ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold Change	P-Value
206618_at	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	7.562	0.004
220813_at	CYSLTR2	cysteinyl leukotriene receptor 2	4.949	0.023
206871_at	ELANE	elastase, neutrophil expressed	4.663	0.008
202948_at	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	4.557	0.011
1552773_at	CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	4.349	0.016
205844_at	VNN1	vanin 1	4.183	0.012
205227_at	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	3.902	0.016
208250_s_at	DMBT1	deleted in malignant brain tumors 1	3.782	0.007
202018_s_at	LTF	Lactotransferrin	3.728	0.021
215990_s_at	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	3.621	0.017
228938_at	MBP	Myelin basic protein	3.423	0.016
244313_at	CR1	complement component receptor 1	3.344	0.019
205403_at	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	3.255	0.029
213817_at	IRAK3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	3.250	0.005
221085_at	TNFSF15	tumor necrosis factor superfamily, member 15	2.929	0.003
219434_at	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	2.845	0.028
211574_s_at	CD46	CD46 molecule, complement regulatory protein	2.790	0.034
1555116_s_at	SLC11A1	solute carrier family 11 , member 1	2.731	0.037
221060_s_at	TLR4	toll-like receptor 4	2.623	0.021
205557_at	BPI	bactericidal/permeability-increasing protein	2.573	0.005
225330_at	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	2.546	0.008
211305_x_at	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for	2.504	0.007
208451_s_at	C4A	complement component 4A	2.485	0.009
201925_s_at	CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement	2.425	0.011
1555214_a_at	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	2.371	0.038
220832_at	TLR8	toll-like receptor 8	2.314	0.021
1569830_at	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2.201	0.010
211395_x_at	FCGR2C	Fc fragment of IgG, low affinity Iic	2.159	0.042
228891_at	SEMA4D	sema domain, immunoglobulin domain, transmembrane domain and short cytoplasmic domain, 4D	2.150	0.007
217236_x_at	IGHA1	immunoglobulin heavy constant alpha 1	2.143	0.003

Down-regulated genes

Probe ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold Change	P-Value
214214_s_at	IL23R	interleukin 23 receptor	0.089	0.007
231763_at	IL1RAPL2	interleukin 1 receptor accessory protein-like 2	0.207	0.047
1552912_a_at	EDA	ectodysplasin A	0.207	0.034
211005_at	SPN	Sialophorin	0.211	0.028
216207_x_at	CNGA1	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	0.387	0.037
206057_x_at	FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II	0.403	0.048
206653_at	IGKC	immunoglobulin kappa constant	0.419	0.023
217063_x_at	CD28	CD28 molecule	0.420	0.049
204203_at	POLR3A	polymeraseIII polypeptide A	0.424	0.003
211127_x_at	TRD	T cell receptor delta locus	0.433	0.032
211583_x_at	NCR3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	0.434	0.035
206417_at	POLR3G	polymeraseIII polypeptide G	0.446	0.030
221112_at	C1QBP	complement component 1, q subcomponent binding protein	0.468	0.002
206759_at	CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein, gamma	0.487	0.032
211856_x_at	LAT	linker for activation of T cells	0.488	0.019

一方、Rota-seizure group では、response to stress 関連遺伝子群が有意に発現変化しており、superoxide dismutase 2, oxidation resistance 1, hypoxia-inducible domain family, member 1Aといった、細胞内ミトコンドリアにおける酸化ストレス・低酸素への防御機構に関連する遺伝子が有意に発現変化していた。

E. 結論

痙攣重積を示したインフルエンザ AH1N1pdm09 と痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎では、宿主遺伝子発現のプロファイルが異なることを明らかにした。

痙攣重積を示したインフルエンザ AH1N1pdm09 では immune response、特に IL1R/TLR といった自然免疫や T 細胞受容体シグナルに参与する遺伝子群が変化していた。痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎では、細胞内酸化ストレスに対する防御反応に関連する遺伝子群が変化していた。

これらの宿主遺伝子発現の違いは、インフルエンザ AH1N1pdm09 とロタウイルス胃腸炎

における痙攣重積の病態が必ずしも同一ではないことが考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis J Neurovirol. 2014 in press

2. 学会発表

(1)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし