

平成26年度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

急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序

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)
研究協力者 Irene Lorinda Indalao (徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生)

研究要旨

インフルエンザウイルス肺炎およびインフルエンザ脳症が進行したことによる最終的な結果として血管透過性の亢進による多臓器不全が原因である。このことは高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染でも同様であると考えられる。しかし、インフルエンザウイルス感染により血管内皮細胞の透過性亢進を引き起こす正確な分子メカニズムは解明されていない。我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にインフルエンザウイルス (IAV) /Puerto Rico/8/34(PR8)(H1N1) を感染させて透過性亢進のメカニズムを調べた。血管内皮においてカドヘリンと カテニンのレベルは細胞接着複合体を形成するための重要な分子であるが、IAV 感染後にタンパクレベルで カテニンの発現が減少することが明らかとなった。更に、透過性の評価の指標として transendo-thelial electrical resistance (TEER)を用いて測定したところ、血管透過性が亢進したことにより抵抗値の減少が認められた。次に、プロテアソーム阻害剤であるラクタシチンを添加すると カテニンの分解が抑制された。プロテアソームによる分解の開始段階で GSK-3 が示唆されたことから、我々は、HUVEC において GSK-3 をノックダウンしたときの カテニンの抑制の効果を調べた。その結果、IAV 感染によって誘発される カテニンの分解は、GSK-3 -ノックダウン細胞で有意に抑制された。また、カテニンを細胞にトランスフェクションすることで IAV 感染時の透過性亢進が抑制された。この結果は、IAV 感染がアドヘレンスジャンクションにおける GSK-3 を介して カテニンの分解を誘導し、血管の透過性亢進を誘導することを示唆している。更に、マウスをモデルとした動物実験においても同様で、IAV 感染後 0 日目から 6 日目の肺を経時的に調べたところ カテニンの分解と GSK-3 の活性化が確認された。これらの知見から、アドヘレンスジャンクションにおいて GSK-3 を介した カテニン分解がインフルエンザ重症化を引き起こす血管透過性亢進の重要な機構の 1 つであることが示唆された。

A . 研究目的

これまでに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てきた(*J. Infect. Dis.* 202:991-1001, 2010、*Cardiovasc. Res.* 89:596-603, 2011)。IAV 感染により血管内皮細胞の透過性が亢進するが、相互作用のメカニズムについては解明されていない。本研究では、アドヘレンスジャンクションにおける細胞間接着分子である VE カドヘリンと カテニンについて IAV 感染との関与を明らかとする。

B . 研究方法

感染：(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に IAV(PR8) を MOI=1 で 1 時間感染させて、培地交換後 28 時間培養した。(2) C57BL/6CrSlc マウスに PR8 を 100 PFU で経鼻感染させて体重をモニターした。動物実験に関しては徳島大学の規定に基づき行った。

ウェスタンブロッティング：培養細胞及びマウス肺のホモジネートは RIPA バッファーで作製し、使用した。

RT-PCR：HUVEC より RNA を抽出し、One-Step RT-PCR Kit を用いて、それぞれの遺伝子発現を検出した。

C . 研究結果

(1) IAV 感染により、血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションにおいてカテニンが有意に減少した

アドヘレンスジャンクションにおいて重要な分子である カテニンと VE カドヘリンの発現をウェスタンブロッティングによって検出した。その結果、

カテニンの発現は非感染コントロールと比べて 24%まで低下した(図 1A)。一方、VE カドヘリンの発現に有意な変化は認められなかった。また、遺伝子発現に関しては カテニンの発現に有意な差は認められていない(図 1B)ことから、タンパク合成後にプロテアソームによる分解の可能性が示唆された。

(2) IAV 感染細胞においてプロテアソーム阻害剤により カテニンの分解が抑制された

IAV に感染させた HUVEC 細胞にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを添加することで、カテニンの分解が抑制され、未処理と比べて 1.8 倍まで回復した(図 2)。この結果より、IAV 感染で、プロテアソームによる分解が増強されることが明らかとなった。

(3) IAV 感染により GSK-3 が活性化される

カテニンは、活性化した GSK-3 によってリン酸化されることでユビキチン化されてプロテアソームの分解を受けるが、IAV に感染することで不活性化型である phospho-GSK-3 の発現が有意に低下(図 3)したが全体の GSK-3 の発現には有意差は認められなかった。更に、GSK-3 をロックダウンすると カテニンの発現が回復した(図 4)。これらの結果から PR8 に感染した HUVEC において、アドヘレンスジャンクションでの VE カドヘリンと カテニンの複合体形成の制御には GSK-3 が関与していることが明らかとなった。

(4) IAV 感染マウスの肺における VE カドヘリンと カテニン及び GSK-3 の発現変化

マウスに PR8 を経鼻感染させた時、非感染コントロールと比べて 3 日目より体重の減少が認められた。また、NP 抗体で検出した肺のウイルス量は 2 日目から増加し始めて 3 日目にピークを迎えた (図 5-A)。肺における カテニンは 2 日目から 6 日目まで減少が続き、それに伴い不活性型の phospho-GSK-3 の減少が認められた (図 5-B)。

D . 考察

現在、一般的にノイラミニダーゼ阻害剤がインフルエンザ治療薬として使用されている。しかし、“インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼ (トリプシン、MMP-9)” サイクルを通して起こる循環不全、低酸素血症、内皮細胞における血管透過性の亢進による重症化の治療には適していない。そこで、重症化の新たな治療法のターゲットとして血管透過性亢進機序の解明を行った。血管内皮細胞では VE カドヘリンが発現しており、細胞間接着において カテニンと複合体を形成することで重要な役割を果たしている。本研究では、IAV 感染により カテニンの分解が亢進されることを明らかとし、その制御が GSK-3 の活性化により起こることを証明した (図 6)。更に GSK-3 ノックダウンにより カテニンの分解が抑制されたことから GSK-3 に対して新たな阻害剤を探索することがインフルエンザ重症化の治療につながると考えられる。

E . 結論

インフルエンザに感染させた HUVEC で VE カドヘリンと複合体を形成する カ

テニンが減少することが明らかとなった。IAV 感染によって カテニンのプロテアソームによる分解が亢進されたためであった。これらの結果から、VE カドヘリン- カテニンの結合がインフルエンザ重症化発症機序の一つである可能性が示唆された。ユビキチン-プロテアソーム経路の GSK-3 によって調節されることが明らかとなったことで、新たな創薬ターゲットになり得ると考えられる。

G . 研究発表 (平成 26 年度) 論文発表

(1) Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Hiroshi Kido; Oral Administration of Lactobacillus pentosus Strain S-PT84 Enhances Anti-Influenza Virus-Specific IgG Production in Plasma after Limited Doses of Influenza Virus Vaccination in Mice, *Journal of Vaccine & Immunotechnology*, Vol.2, Issue 1. 2015.1

(2) Hiyoshi M, Indalao I.L, Yano M, Yamane K, Takahashi E, Kido H; Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3b-mediated b-catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability, *Archives of Virology*, 10.1007/s00705-014-2270-5. 2014.11

図1 インフルエンザ感染によるアドヘレンスジャンクションの カテニンの発現変化

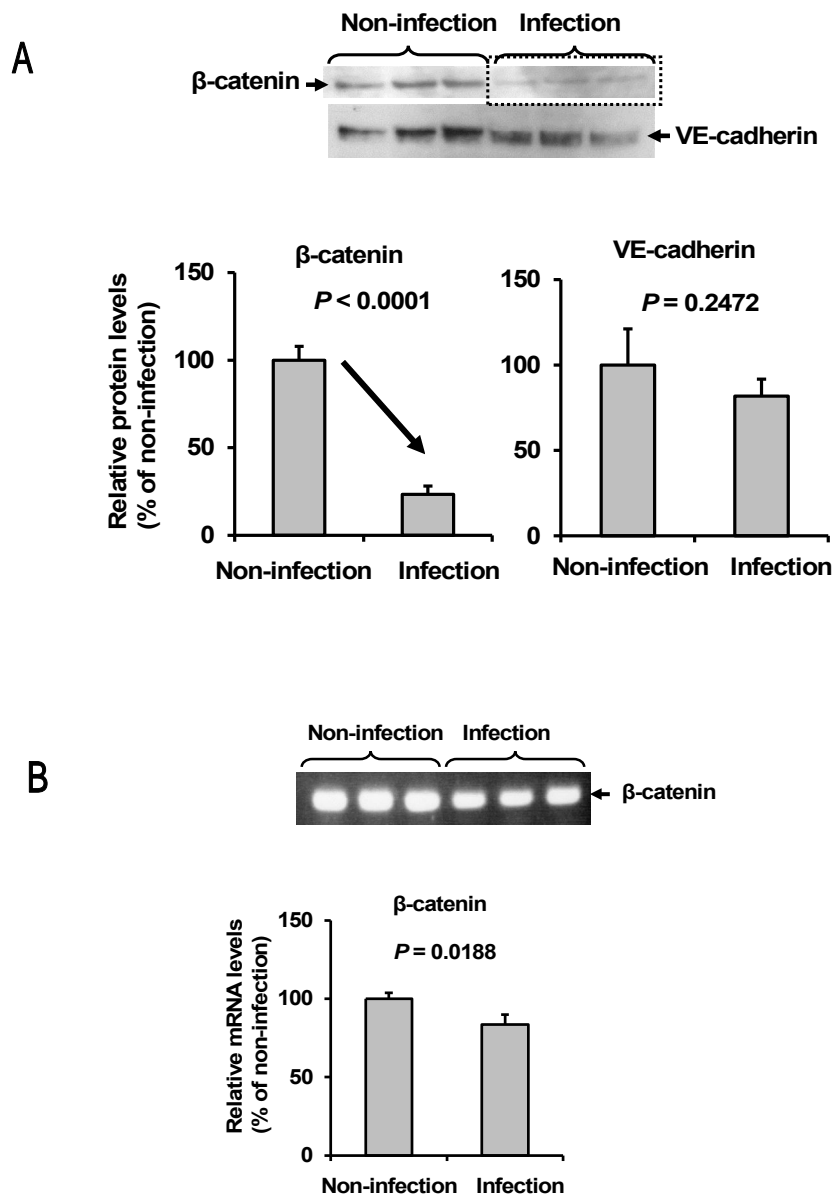


図2 プロテアソーム阻害剤による カテニンの分解抑制

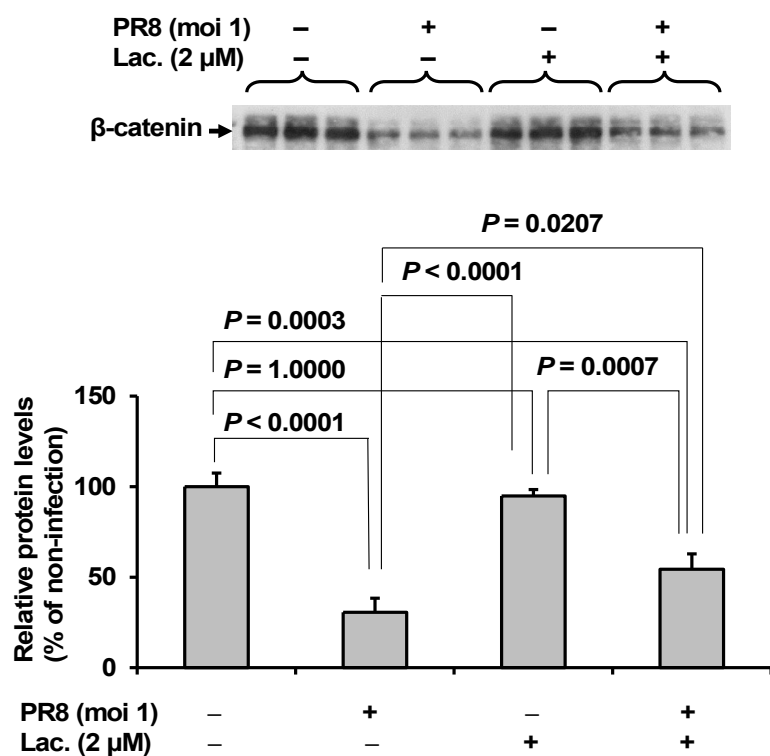


図3 インフルエンザ感染による GSK-3 の活性化

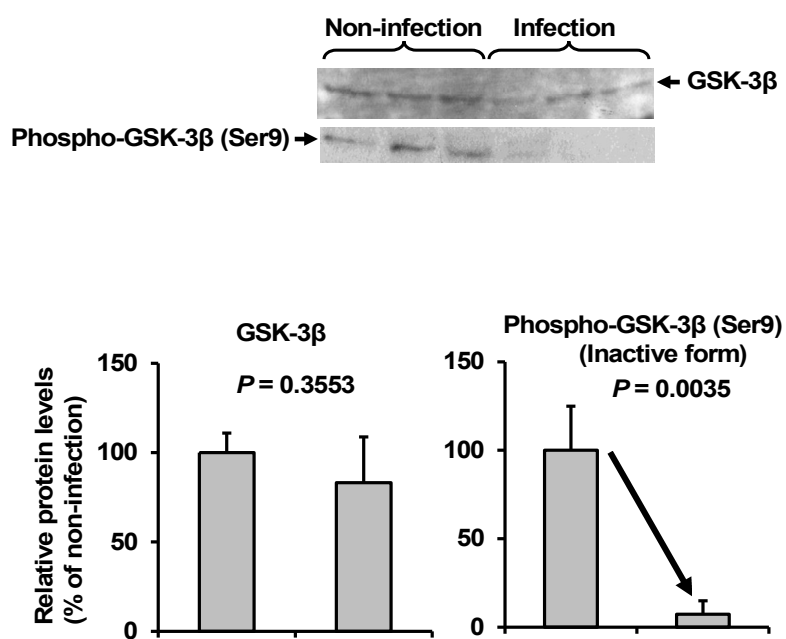


図4 GSK-3 ノックダウンによる カテニンの発現回復

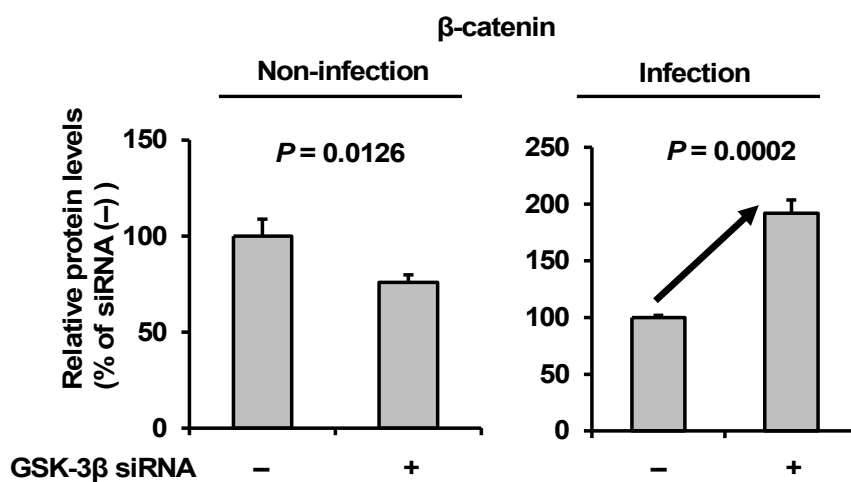
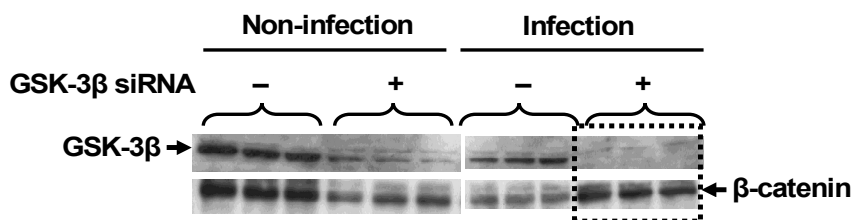
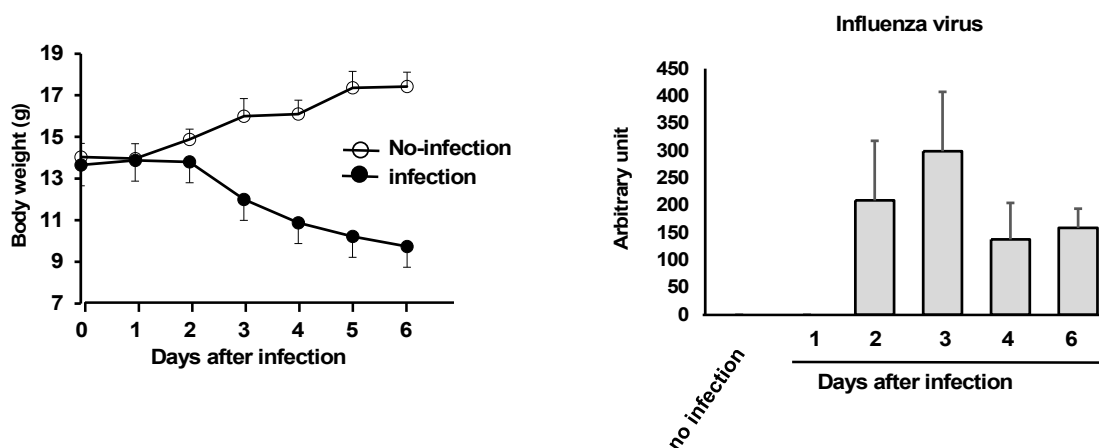


図5 インフルエンザ感染マウスの肺における VE-カドヘリンと β-カテニン及び GSK-3 の発現変化

A



B

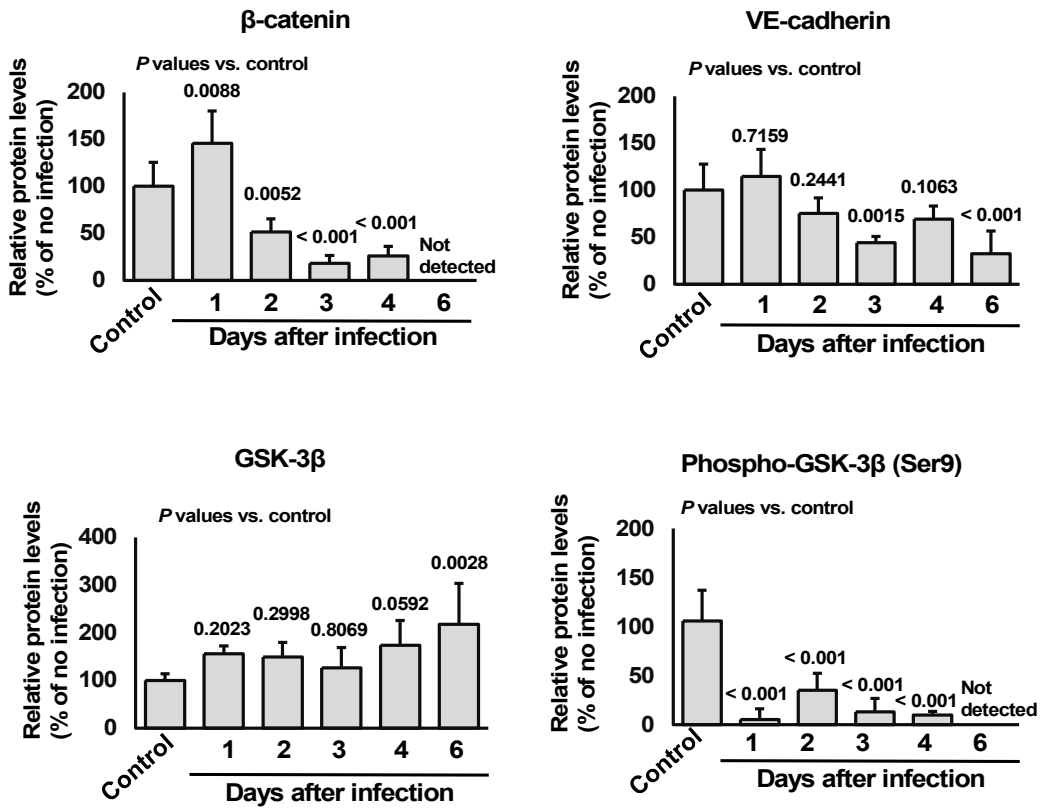


図 6 急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機構

