

**重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：
検体収集とインフルエンザ重症化バイオマーカーの検索**

研究分担者 西村秀一

(国立病院機構仙台医療センター臨床研究部 ウイルス疾患研究室長)

研究協力者

山谷睦夫 (東北大学大学院医学系研究科先進感染症予防学寄附講座 教授)

織田慶子 (川崎医科大学附属川崎病院小児科 医師)

高橋洋 (宮城厚生協会坂総合病院呼吸器科 部長)

武田和憲 (国立病院機構仙台医療センター臨床研究部 部長)

手島伸 (国立病院機構仙台医療センター 外科 医長)

研究要旨

1) 実際の患者血清等を対象に、肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子やそれらの病態の早期診断マーカーの候補としての仮称 FluAlarmin を検索するための準備を行った。これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索において、脳症を含む多臓器不全にかかわる因子として検討されてきた CPT2 遺伝子や Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の解析を行う目的で、今年度も小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループや内科の成人・高齢者の肺炎研究グループ等と連携して、多方面で発症急性期の気道分泌液や血液検体等の検体収集ならびに臨床情報の収集を行った。

2) インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織であり、細胞自らが産生する蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られている実際のヒト呼吸器上皮細胞を実験系として得るために、病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養を試み、3 人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。さらに、インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所性トリプシン産生にかかわるエンテロキナーゼを産生する細胞として知られるヒト十二指腸上皮細胞を得る目的で、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の初代培養とその維持を試みた。それらを用いた感染実験を試み、その結果、初代ヒト気管上皮細胞にインフルエンザウイルスに感染性を与えるセリンプロテアーゼ TMPRSS2 の発現を確認した。さらに、膜結合型である同酵素を、前立腺がん細胞での所見と同様、培養上清中に 50 - 100ng/ml という濃度で検出した。また、同細胞に対するインフルエンザウイルス感染によって IL6 が誘導され、その IL6 自体が同細胞に障害を引き起こすことを見出した。

A . 研究目的

1) 新型インフルエンザや高病原性鳥インフルエンザの出現とその流行による肺炎・脳症・多臓器不全の多発が危惧され、健康危機管理として

の対策が急がれている。本研究では、実際の患者血清等を対象に、肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子やそれらの病態の早期診断マーカーの

候補としての仮称FluAlarminを検索する。

また、これまでは小児科領域における脳症を対象に研究を行ってきたが、本研究では、成人の肺炎の重症化例について研究範囲を拡げている。

2) ヒト呼吸器上皮細胞は、インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織と考えられる。そこでの増殖においては、細胞自らが産生するトリプシン様蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られている。そしてさらに我々の研究により呼吸器組織以外の異所性産生の同酵素がインフルエンザの脳症において重要な働きをしていることが明らかになっている。一方、膵臓以外のヒト組織細胞における同酵素の産生に関する研究は、ほとんど見あたらず、よって呼吸器上皮細胞が常に供給されるような状態であれば極めて重要な解析実験系となると考えられる。また、そうした細胞がインフルエンザ感染の再産生する何らかの物質がサイトカイン等のFlu Alarmin候補に何らかの影響を与える、あるいはその逆にサイトカイン等の物質が呼吸器系上皮にそのもの、あるいはそこでのインフルエンザ感染に何らかの影響を与える可能性についても検討の価値はあると考えられる。

さらに、そうした細胞にウイルス感染や種々の外的刺激を与えることでインフルエンザ重症化の本体の理解につながる可能性のある何らかの新たな所見が得られる可能性もある。我々は、そうした細胞系を種々の実験に用いることのできる態勢を整えるためのいくつかの試みを開始しているが、本年度もそれを継続した。

3) インフルエンザウイルスの感染に大きく関わる細胞由来のトリプシン

様の蛋白分解酵素の代表的なものにTPMRSS2とHATと膜結合型のセリンプロテアーゼが知られている。ただ、その分布や作用は、実際のヒトの呼吸器系細胞での解析は、ほとんどない。そこで、今年度は前者に注目してヒトの初代細胞で検討を開始する。

B . 研究方法

1) 本年度も引き続き臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液の収集：

1-1) 小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループならびに

1-2) 内科の成人・高齢者の肺炎研究グループとの連携により発症急性期の気道分泌液や血液検体を収集した。

1-3) さらに当ウイルスセンターには、ウイルス感染による重症肺炎や脳症についての検査目的で、仙台市内ならびに全国各地から臨床検体が寄せられており、そうした症例の主治医に対し、急性期ならびに回復期血清やFlu Alarmin 検索のための検体の送付を要請した。

2) これまでのインフルエンザ罹患者の凍結保存検体のピックアップ：Flu Alarmin の候補の検索対象とする目的で、これまでに種々の呼吸器感染症患者や急性脳症患者から採取した急性期血清ならびにペア血清を当院血清ライブラリーからのピックアップを試みた。

3) 上記 1)、2) で収集した検体について Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定を試みた。

また、これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索においては、脳症を含む多臓器不全の遺伝子解析を CPT2 を対象としていたが、重症肺炎症例医についても、イン

フォームドコンセントのもとCPT検査を試みた。

4) ヒト初代細胞の確保は、目的の項目で説明したとおり、インフルエンザの重症化の機序解明の研究材料として大きな可能性を有している。4-1) 協力研究者の山谷らによる病理解剖由来の気管支上皮細胞の培養系について、本年度もその一部凍結保存とライブラリーづくりとを行った。

また、そうした細胞の初代ではないが、その性質をある程度保ったまま長期継代が可能な系を作ることを目的に、上記細胞に対してSV40のLarge T抗原遺伝子導入による不死化を試した。4-2) インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所生産トリプシンがつくられるためには、トリプシノーゲンがPRSS3と呼ばれるエンテロキナーゼの作用によってトリプシンに変わる必要がある。ヒト十二指腸上皮細胞は、このエンテロキナーゼがつくられる組織として知られている。エンテロキナーゼのヒト細胞での種々の動きに関して解析のためには、ヒト十二指腸上皮細胞の初代継代細胞がぜひとも必要である。そこで、本研究では、インフォームドコンセントのもと、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養を試み、それらしき細胞を得、この細胞についても不死化を行い、ウイルス感受性の検討を行った。

また、今年度は耳鼻科の扁桃腺摘出材料からの扁桃腺上皮細胞の培養と不死化も試みた。

4-3) インフルエンザウイルスに感染性を与える膜結合型のセリンプロテアーゼTMPRSS2の初代ヒト気管上皮細胞における発現を、蛍光抗体法での確認を試みた。また、同酵素は、前立腺がんにおいては膜から外れて細

胞外に遊離することが知られており、同様のことが実際の種々のヒト初代細胞においても起きているのかを、培養上清を材料とするELISAで調べた。

C . 研究結果

1) 臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌物や血液の収集： 前回の2013-2014年インフルエンザシーズンは、A/H1N1pdm09亜型の再出現があり、このウイルス感染による成人の肺炎症例が全国で見られ、その中で当院に寄せられたいくつかの症例について、ペア血清ならびに急性期全血を確保し、それらについてToll-like Receptorの下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定ならびに、CPT2についての遺伝子解析のため徳島に送付できたが、本シーズンは、既往症を有する高齢者の肺炎が多く、全シーズンのような健康成人での重症肺炎例は少ない(毎年検体を送ってくれる臨床医の印象)。そのためか、ほとんど検体の確保ができなかった。

一方、比較的高齢者でヒトパラインフルエンザ3型やヒトメタニューモウイルスやRSウイルスによる肺炎入院例は多数経験しており、それらの検体の気管支洗浄液や血清の確保はできている。

2) 病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養とその不死化の試み：

昨年度は協力研究者の山谷がつくった3人のドナー由来の、気管支上皮細胞でレンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子等の導入による不死化を何度か試みたが、結果的に成功しなかった。この不成功を受け、本年度はさらにLarge T抗原遺伝子に加えて、c-mycあるいはH-ras

遺伝子の導入による不死化を試みた。しかし、また一時的には成功したかのように見えることがしばしばあったものの、最終的にはどれも培養を継続できず、現在に至るまで成功していない。

3) 外科手術材料由来の十二指腸および扁桃腺上皮細胞の初代培養と、その不死化の試み： 昨年度から本年度にかけ、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養の試みを3度行い、うち2回で培養に成功し、十二指腸上皮細胞の培養法を習得した。

それらの細胞についても凍結保存をするとともに、レンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子の導入による不死化と、それらの細胞のウイルス感受性の検討を試み成功している。本年度、本細胞については、インフルエンザウイルスを含む種々のウイルスに対する感受性を検討してきたが、残念ながら未だインフルエンザを含めた特定のウイルスに対する感受性は見出せていない。

さらに本年度開始した、扁桃腺上皮細胞の培養は、一応初代培養まで成功したが、その不死化には至らず、また継代培養しているうちに最終的に繊維芽細胞に置き替わってしまった。

4) インフルエンザウイルスに感染性を与えるセリンプロテアーゼTMPRSS2の初代ヒト気管上皮細胞における発現を、蛍光抗体法で確認した。さらに、培養上清を材料とするELISAで調べたところ、膜結合型である同酵素が、前立腺がん細胞での所見と同様、培養上清中に50 - 100ng/mlという濃度で検出された。また、同細胞に対するインフルエンザウイルス感染によってIL6

が誘導され、そのIL6自体が同細胞に障害を引き起こすことを見出した。

E . 結論

臨床応用可能な、最適なFlu A/Amnの同定にとっては、インフルエンザ等の急性感染症罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液等の臨床検体の収集と解析を今後も粘り強く継続していくことが必要である。

ヒトの気管支上皮ならびに十二指腸と扁桃腺上皮の初代培養細胞に成功し、一部は今後の応用のために凍結保存を完了しており、また通常種々の実験に頻繁に使えるように不死化を試みている。だが、不死化に成功した小腸上皮と思われた細胞は、未だインフルエンザを含め特定のウイルスに対する感受性は見出せておらず、また気管上皮と扁桃腺上皮の不死化は未だ成功していない。これらの試みは、あきらめることなく継続していく必要がある。

今回行ったヒト気管上皮初代細胞を用いた解析のような、蛋白分解酵素やIL6に関する仕事は、治療薬の選択も視野に入れつつ、今後も*in vitro*, *in vivo*で継続していく必要がある。(図1)

F . 健康危険情報

なし。

G . 研究発表(平成26年度)

論文発表

1) Nishimura H, Okusa Y. A verification of an overestimation of “deaths associated with influenza pandemic of 1918-1919, Japan” claimed in a demographic study. JJID, in press

- 2) Katsushima Y, Katsushima F, Suzuki Y, Seto J, Mizuta K, Nishimura H, Matsuzaki Y. Characteristics of mycoplasma pneumoniae infection identified by culture in a pediatric clinic. *Pediatr Int.* 2014, 57: doi: 10.1111/ ped. 12513
- 3) M Yamaya, LK Nadine, C Ota, H Kubo, T Makiguchi, R Nagatomi, H Nishimura. Magnitude of influenza virus replication and cell damage is associated with interleukin-6 production in primary cultures of human tracheal epithelium. *Resp Physiol Neurol.* 2014, 202, 16-23.
- 4) E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, H Nishimura. Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing. *PLOS ONE*, 2014, 9(8), e103560. doi: 10.1371.
- 5) Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R. Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Arch Pharm Res.* 2014, 37: 520-529.
- 6) Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R. Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Resp Invest.* 2014, 52, 251-260.
- 7) M Yamaya, L Nadine, H Kubo, K Saito, R Saito, H Nishimura: Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells. *J Med Virol* 2014, DOI: 10.1002/jmv.23974.
- 8) 小山田厚子、三木祐、鈴木克之、佐々木悟、深瀬真由美、伊藤洋子、大宮卓、他 ICT メンバー、西村秀一. 地域流行前の一病棟内でのインフルエンザ集団発生と対応, 医療 (印刷

- 中)
- 9) 大宮卓、佐々木純一、西村秀一. イムノクロマト法を原理とする種々のアデノウイルス迅速抗原検出キットの、ウイルス検出感度の比較. 医学検査 (印刷中)
- 10) 菊地祐樹、鈴木優子、伊藤洋子、西村秀一. 噴霧式インフルエンザ生ワクチンの力価についての検討. 仙台医療センター医学雑誌 2014, 4: 39-41.
- 11) 菱川容子、橋本真帆、倉橋宏和、別府玲子、大谷可菜子、西村秀一. 重症心身障害児(者)施設におけるヒトメタニューモウイルスの集団感染と重症例の発生. 日本重症心身障害学会誌, 2014, 39: 379-383.

学会発表

とくになし

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1) 特許取得 特許第 685769 号 登録日 2015 年 1 月 30 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、感染防止ブース
- 2) 特許取得 特許第 5618169 号 登録日 2014 年 9 月 2 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、換気ブース
- 3) 特許取得 特許第 5531340 号 登録日 2014 年 5 月 9 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、換気ブース

図 1 今後の課題

