

### (資料3)

#### 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、インフルエンザ感染重症化の発症機序についての研究

研究分担者 奥村 裕司 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野・準教授)

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

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としてきた。(1) 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、MSPL は全てのタイプの高病原性鳥インフルエンザウイルス HA の解列に関与することが示唆された。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。肺ホモジネート中の IL-1 $\beta$ 、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発現が上昇するプロテアーゼとして MMP-9 が確認されている。一方、クラリスロマイシン (CAM) が MMP-9 の発現を抑制することが知られていることからインフルエンザ感染マウスに CAM を経口投与して MMP-9 の発現の変化を調べた。ゼラチンザイモグラフィとウエスタンブロッティ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- $\kappa$ B 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。(3) インフルエンザ感染重症化は血管透過性の亢進による多臓器不全が原因であり、

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。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 /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、インフルエンザ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。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と カテニンの分解が抑制されたことから、プロテアソームによる分解の開始段階での GSK-3 が示唆された。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結果、インフルエンザ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。マウスをモデルとした動物実験においても同様で、インフルエンザ感染後 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

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、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-KO(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關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。(3)インフルエンザ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。そこで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 カテニンについてインフルエンザ感染において重症化の発症機序について解明する。

## B . 研究方法

(1)高病原性鳥インフルエンザウイルスには大きく分けて Furin や PC が認識できる RKKR タイプと KKKR タイプの株が存在する。両方の株について活性化するか否かを調べるため、MSPL-KO マウスに、ヘマグルチニン (HA) の解列部位が異なる高病原性鳥インフルエンザウイルスをそれぞれ感染させて体重変化、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。

(2)マウスにインフルエンザウイルス(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、ウエスタンブロッティングにより評価した。更に、MMP-9に關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ティングにて確認した。

(3)ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に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。細胞を回収し、VEカドヘリンとカテニンの発現をウエスタンブロッティングとRT-PCRにより確認した。C57BL/6CrSlcマウスにPR8を100PFUで経鼻感染させて体重をモニターすると共に臓器を摘出し、細胞間接着分子の発現を確認した。

### C . 研究結果

(1)MSPL-KO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-KO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KO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-KO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)。エバンス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)。

(3)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エスタンブロッティングによって検出した結果、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7A)。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7B)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。感染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8)。これによりインフルエンザ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。

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。感染したHUVECでは不活性型であるphospho-GSK-3の発現が有意に低下(図9)したが、全体のGSK-3の発現は有意差が認められなかった。更に、GSK-3をノックダウンするとカテニンの発現が回復した(図

10)。アドヘレンスジャンクションにおいて VE カドヘリンと カテニンの複合体形成には GSK-3 が関与し、制御していることが示唆された。

次に、マウスに PR8 を経鼻感染させて生体分子での比較を行った。体重変化では非感染コントロールと比べて3日目より減少が認められ、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 11-A)。また、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 11-B)。

#### 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明らかとなった。また、以前の結果から炭疽菌毒素の解列にも関与する可能性も考えられる。更に、最近世界的に問題となっているエボラウイルスも解列部位の配列が高病原性鳥インフルエンザウイルス HA と類似しており、MSPL の関与が示唆される。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及び新興感染症の治療に関しても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。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やインフルエンザ肺炎に関して CAM の有用性を検証する。

(3)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。インフルエンザ感染により カテニンの分解が亢進され、その制御に GSK-3 が関与することを証明した(図 12)。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

MSPL が高病原性鳥インフルエンザウイルスの活性化酵素の一つであることが明らかとなり、本酵素の特異的な阻害剤の探索は高病原性鳥インフルエンザの世界的流行の阻止に役立つと考えられる。免疫増強効果のある CAM が MMP-9 の発現を抑制したことでインフルエンザ重症化に伴う肺炎や心筋炎の予防に対して有用であることが示唆された。更に、重症化発症機序の一つである血管透過性に関わる VE カドヘリン- カテニンを調節する GSK-3 は、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 25-26 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, Anti-influenza Activity of C60 Fullerene Derivatives, *PLoS One*, 12;8(6),e66337, 2013

(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)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

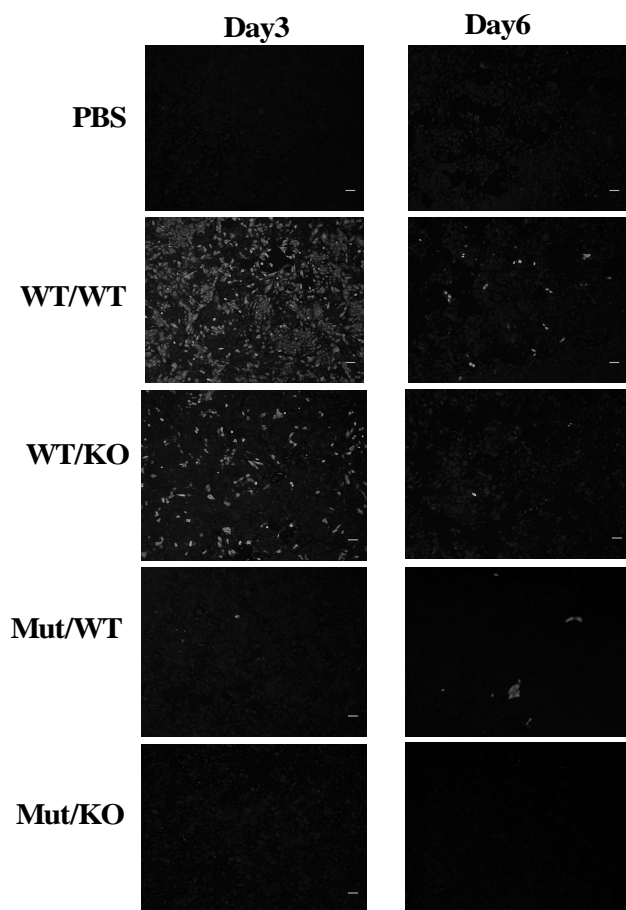
(4)Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa,

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

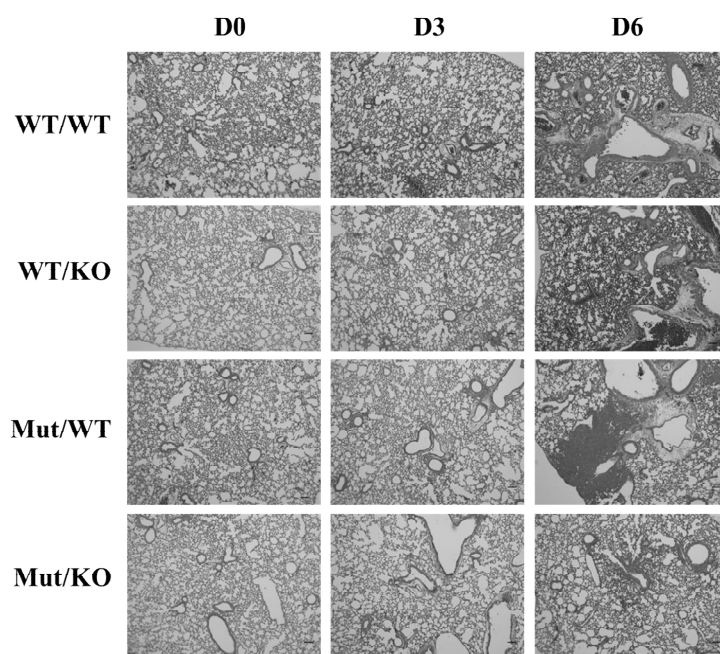
### 学会発表

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

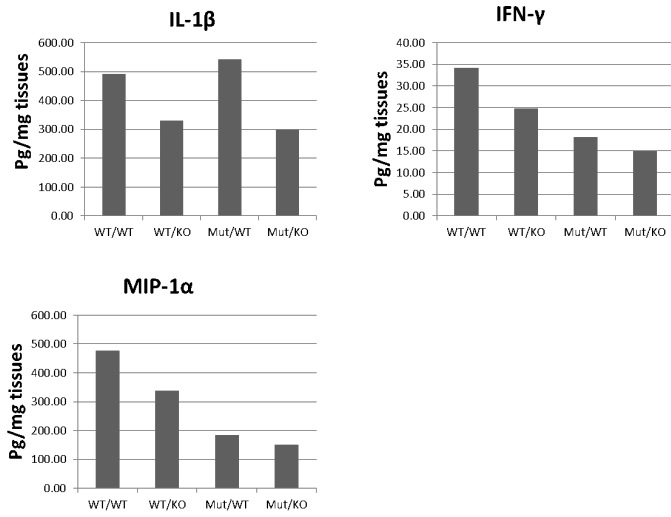
**図 1** MDCK 細胞に感染させた肺ホモジネート中のウイルス



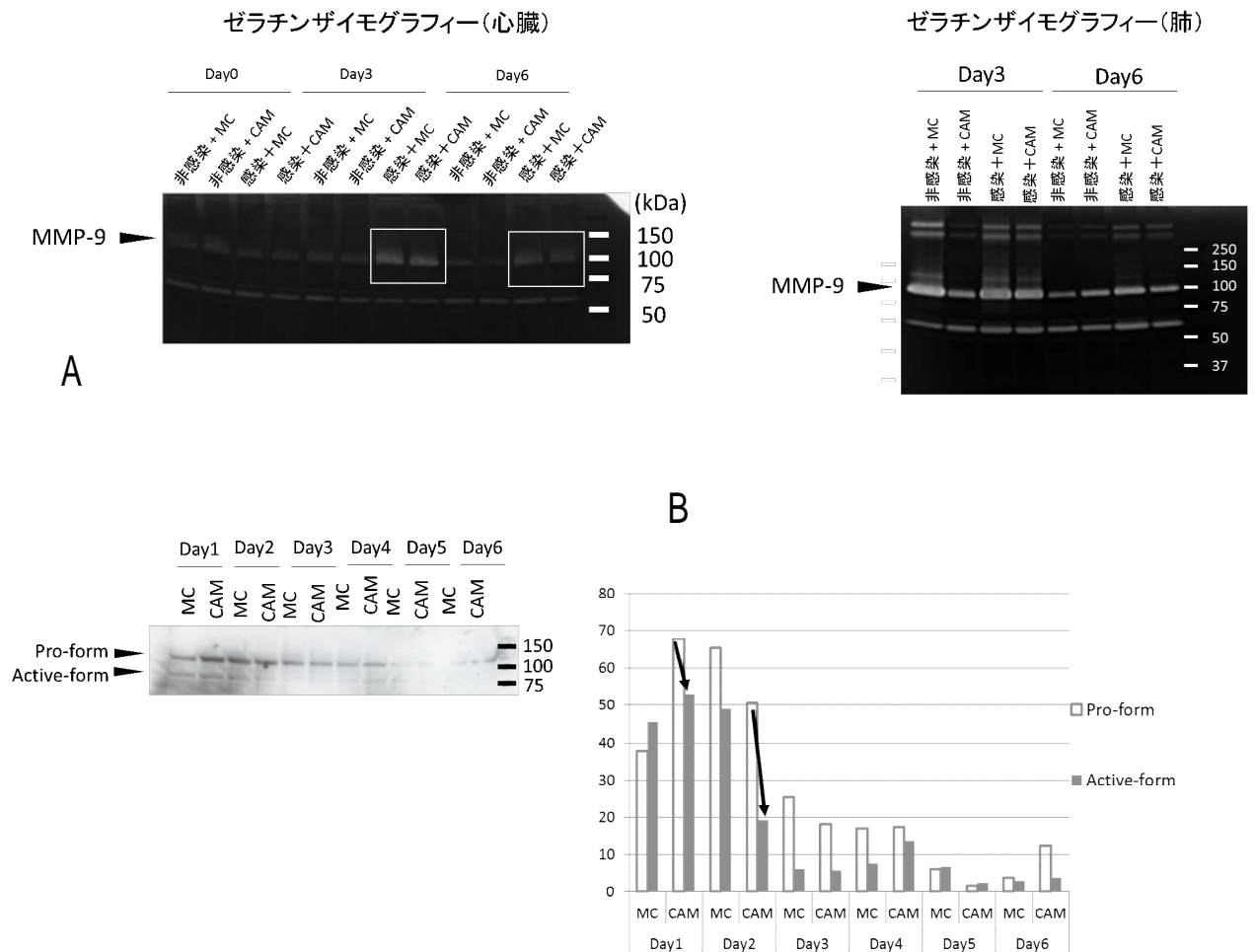
**図 2** 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺の HE 染色像



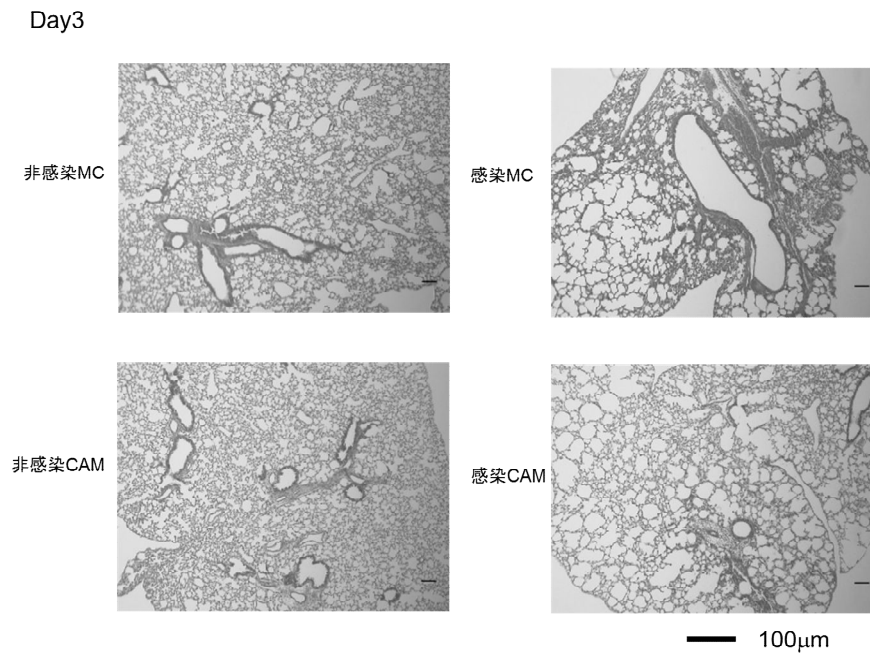
**図3 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウスの肺ホモジネート中サイトカイン**



**図4 CAM 投与による MMP-9 の発現変化**



**図5 感染3日目の肺のHE染色**



**図6 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**

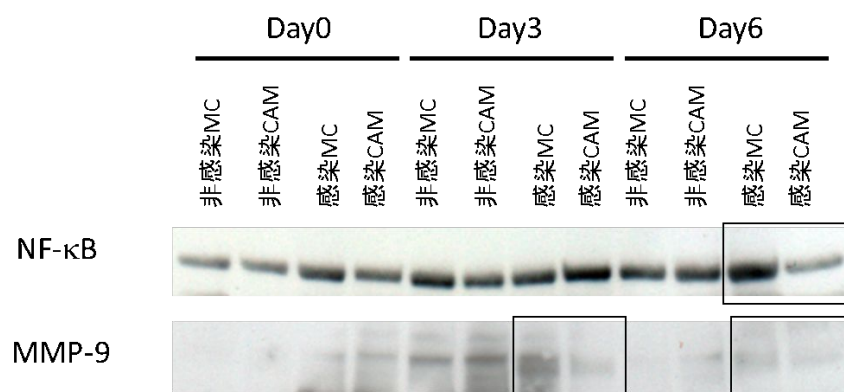




図7 インフルエンザ感染によるアドヘレンスジャンクションのカテニンの発現変化

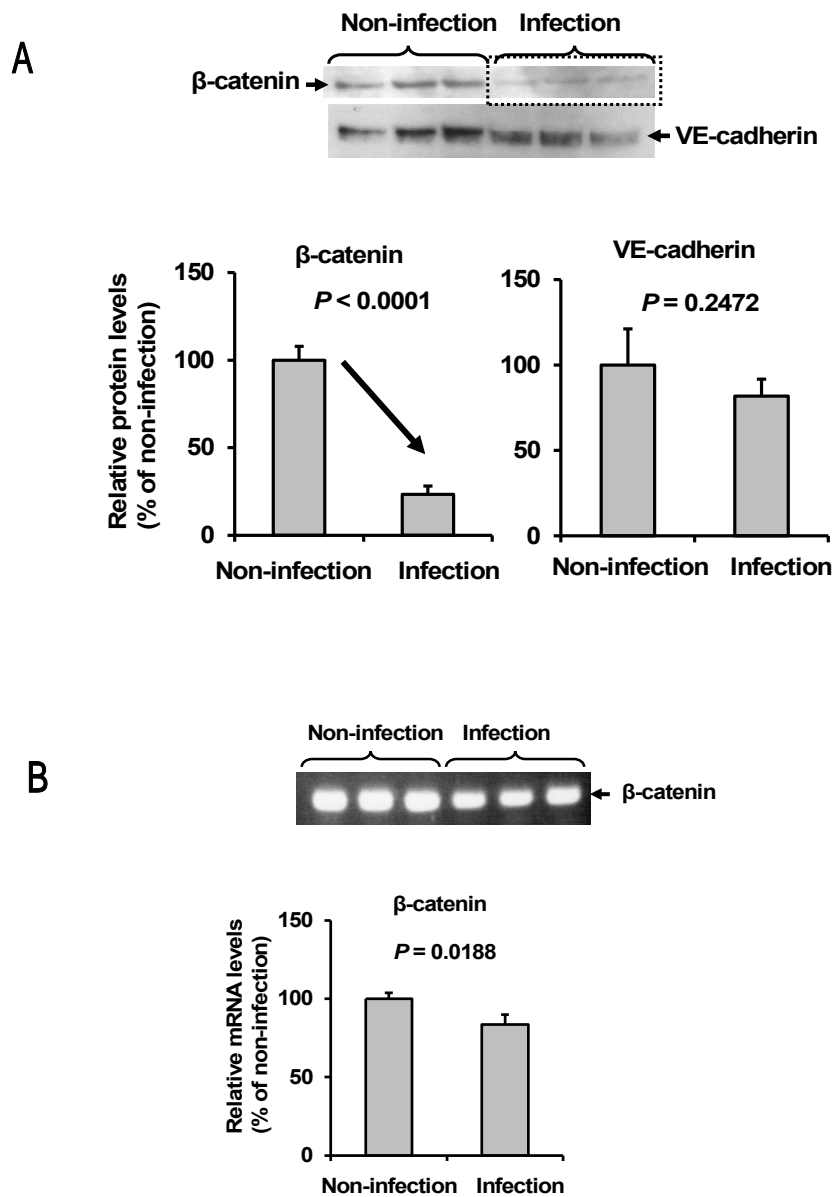


図8 プロテアソーム阻害剤による カテニンの分解抑制

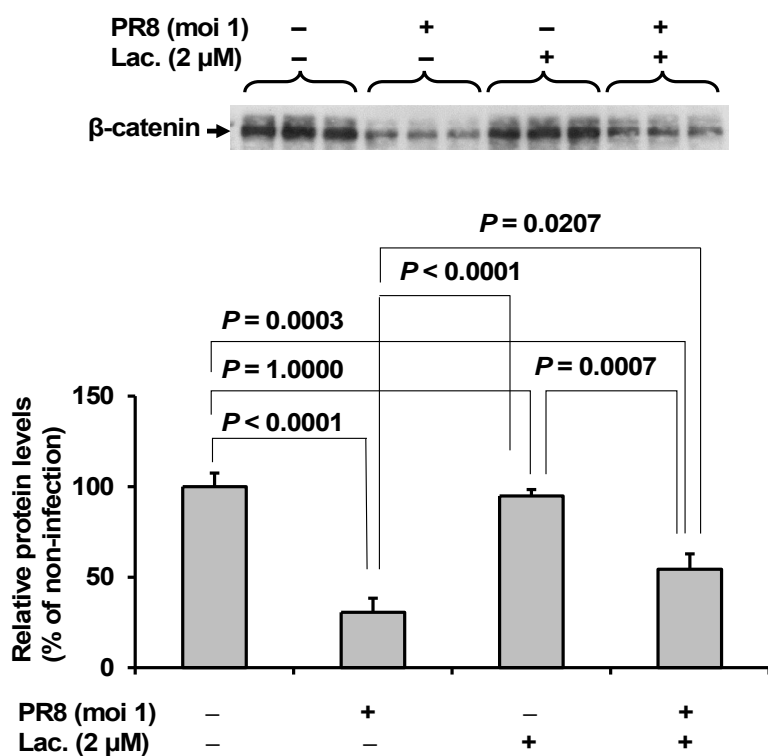
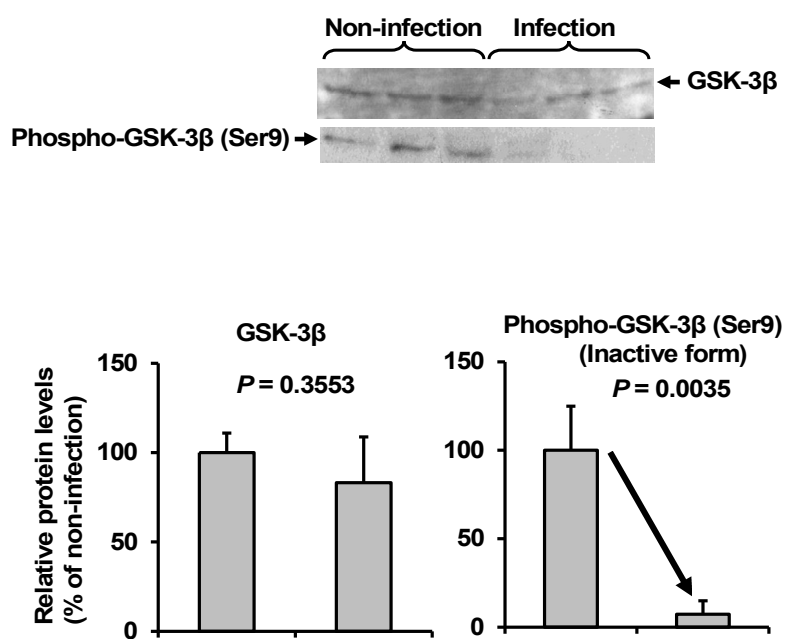
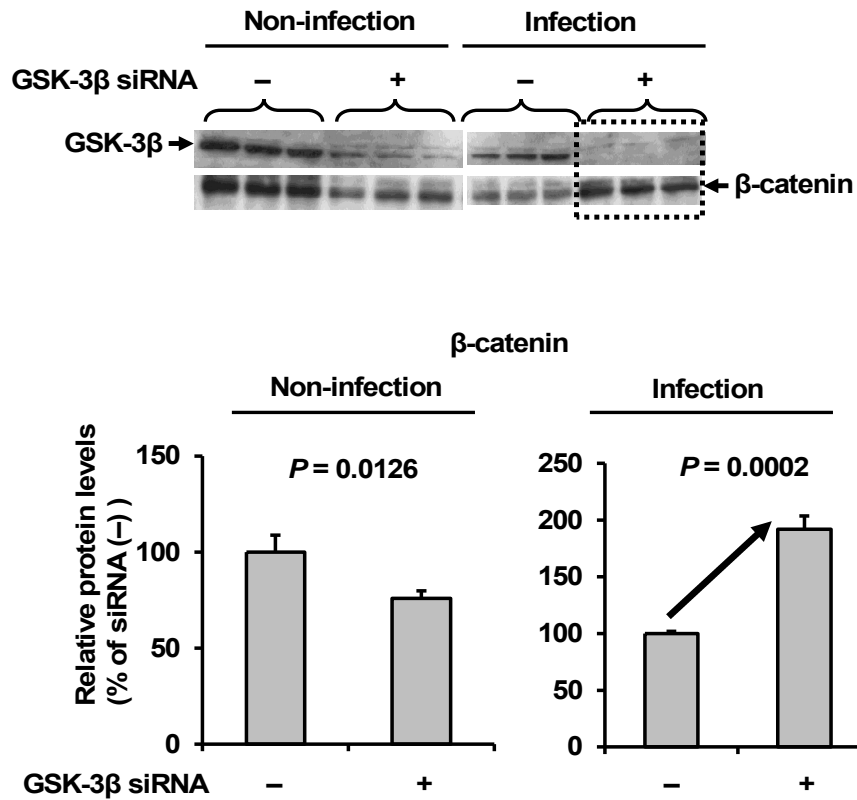


図9 インフルエンザ感染による GSK-3 の活性化

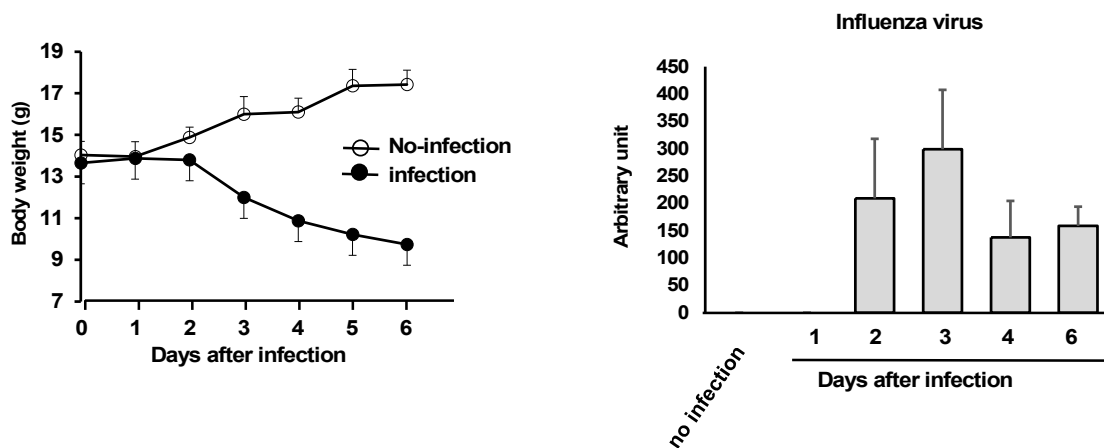


**図 1 0 GSK-3 ノックダウンによる カテニンの発現回復**



**図 1 1 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

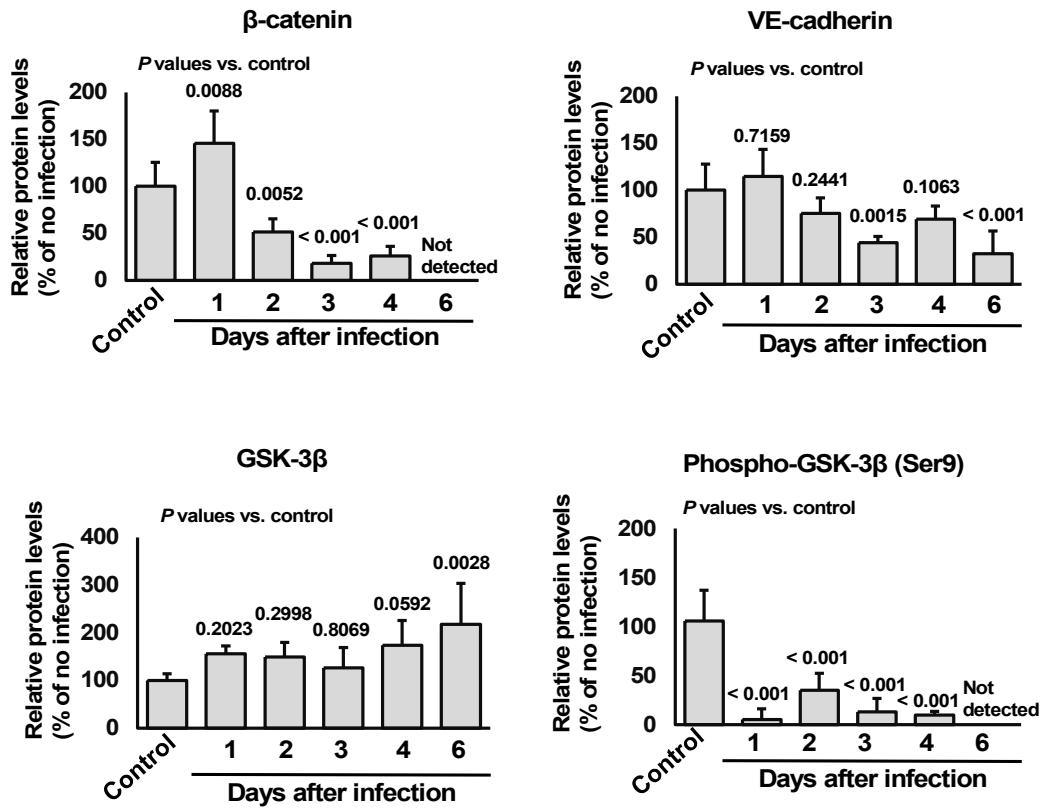


図 1 2 急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序

