

(資料7)

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

研究要旨

本研究プロジェクトに平成 25、26 年度参加し分担研究を以下のように実施した。

1) 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」の発症因子の解明と早期診断マーカーの候補である Flu Alarmin を、実際の患者血清等を対象に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、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の連携により、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。

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長
- ・手島伸 同上 外科医長

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、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」の発症因子の解明と早期診断マーカーの候

補であるFlu Alarminを実際の患者血清等を対象に検索する。それによって重症化の早期診断バイオマーカーが明らかになる。

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た。

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が、さらに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。その一方で、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りうると考えられる。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 Alamin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。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。

B . 研究方法

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いるが、そうした症例について急性期や回復期血清やFlu Alarmin 検索のための検体の送付を受けた。

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：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し、Flu Alarmin の候補の検索対象とした。

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行った。

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はCPT2のみを対象とされていたが、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、上記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、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 Consent 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た。

4-3) さらに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。

5) 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 TMPRSS2 と HAT と膜結合型のセリンプロテアーゼが知られている。だが、その分布や作用は、実際のヒトの初代呼吸器系細胞での解析はほとんどない。そこで、前者に注目してヒトの初代細胞で検討した。さらに同細胞におけるインフルエンザウイルス感染による種々のサイトカインの産生とそれらの同細胞への影響の関係を解析した。

C . 研究結果

平成 25 年度

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

液や血液の収集：2013-2014 年インフルエンザシーズンは、それまで鳴りを潜めていた 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た。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、それらについての 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した。

そのほか、ヒトパラインフルエンザ 3 型による脳症についても数例分、ペア血清を確保し、将来の解析に備えた。また、ヒト・メタニューモの施設内流行を捉えており、そこでも重症化例のペア血清を確保した。

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：協力研究者の山谷がつくった 3 人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。(図 1)

さらに、これらについて培養時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を試みた。しかし、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が、最終的にはどれも培養を継続できないまま、実験の一時中断のやむなきに至った。

3) 消化器外科手術材料由来の十二指腸細胞の初代培養と、その不死化の試み：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 回で培養に成功した(図 2)。十二指腸上皮細胞部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を試み、こちらは成功した。

平成 26 年度

1) 25 年度に引き続き、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を収集し、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。

2) 病理解剖由来の気管支上皮細胞の培養系について、26 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 SV40 の Large T 抗原遺伝子導入による不死化を 26 年度も試みた。26 年度は 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も試みた。しかし、それでも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が、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。

2) 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、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不死化に成功した。(図 2)

作成したヒト十二指腸由来の細胞の初代継代細胞と、その後その不死化に成功した細胞で、インフルエンザウイルスを含む種々のウイルスの感受性の検討を行った。だが、現在までのところ、一部のライノウイルス以外、

インフルエンザウイルスを含め、ウイルス感受性は認められていない。

26 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ものの、不死化には成功せず、最終的に繊維が細胞に置き換わってしまった。ただし、同細胞を後述の遊離型 TMRSS2 の解析の材料には用いることができた。

4-3) 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 TMRSS2 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/amin 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、研究期間の最後の方で集中して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4)

F . 健康危険情報

なし。

G . 研究発表 (平成 24-26 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.
- 6) Takashita E, Ejima M, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)odm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* 19: pii=20666, 2014
- 7) Nguyen, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishihara M, Matsui. Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinic in Iwaki, Fukushima, Japan. *Am J Infection Control*, 2014, 42:

- 551-553.
- 8) Nishimura H, Sakata S, Kaga A: A New methodology for studying dynamics of aerosol particles in sneeze and cough using a digital high-vision, high-speed video system and vector analyses. PLoS ONE 8: e80244. doi:10.1371/journal.pone.0080244
 - 9) Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Nadine L, Kubo H, Nagatomi R: Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Physiol Rep* 2013. 1: e00041.
 - 10) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, Ahiko T: Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011. *Microbiol. Immunol.* 57: 400-405, 2013.
 - 11) S Yamayoshi, S Iizuka, T Yamashita, H Minagawa, K Mizuta, M Okamoto, H Nishimura, K Sanjoh, N Katsushima, Ts Itagaki, Y Nagai, K Fujii, S Koike: Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71. *J. Virol.* 86: 5686-5696, 2012.
 - 12) A Takeyama, K Hashimoto, M Sato, S Kanno, K Takano, M Ito, M Katayose, H Nishimura, Y Kawasaki, M Hosoya: Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. *J. Med. Virol.* 84: 1135-1142, 2012.
 - 13) Yamaya M, Nishimura H, Hatachi Y, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, Mizuta K, Kubo H, Nagatomi: Levofloxacin inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4052-61, 2012.
 - 14) Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, Yamada S, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Ohkouchi S, Tamada T, Nishimura H, Ishizaka A, Maruyama I, Okada Y, Takashi K, Nukiwa T.: Gradual increase of high mobility group protein b1 in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Med*, 91: 64-86, 2012.
 - 15) M Yamaya, H Nishimura, Y Hatachi, H Yasuda, X Deng, T Sasaki, H Kubo and R Nagatomi: Inhibitory effects of Tiotropium on rhinovirus infection in human airway epithelial cells. *European Respiratory J.*, 40: 122-132, 2012.
 - 16) K Shirato, M Kawase, Watanabe, C Hirokawa, S Matsuyama, H Nishimura and F Taguchi: Differences in neutralizing antigenicity between laboratory and clinical isolates of HCoV-229E isolated in Japan in 2004-2008 depend on the S1 region sequence of the spike protein. *J. Gen. Virol.*, 39: 1908-1917, 2012.
 - 17) T Kooriyama, M Okamoto, T Yoshida, T Nishida, T Tsubota, A Saito, M Tomonaga, T Matsuzawa, H Akari, H Nishimura, T Miyabe-Nishikawa: Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees.

- Primates, DOI 10.1007/s10329-012-0320-8, 2012.
- 18) Asada M, Yoshida M, Hatachi Y, Sasaki T, Yasuda H, Deng X, Nishimura H, Kubo H, Nagatomi R, Yamaya M: l-carbocysteine inhibits respiratory syncytial virus infection in human tracheal epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol.*, 180: 112-118, 2012.
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 山口育男、青山知枝、山本優、木下恵子、伊藤由美、西村秀一: イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キットBDベリターシステムFluにおける機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討. *日本臨床微生物学雑誌* 23: 39-44, 2013.
- 24) 西村秀一: 殺菌性能を有する空中浮遊物質の放出を謳う各種電気製品の、寒天平板培地上の細菌に対する殺菌能の本体についての解析. *感染症学会誌* 86: 723-733, 2012.
- 25) 西村秀一: 殺菌能力を謳う各種空気洗浄電気製品の、塗布乾燥状態の細菌に対する効果の有無の検証. *日本環境感染学会誌* 27: 342-345, 2012.

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
- 4) 特許取得 特許第 5325007 号 登録日 2013 年 7 月 26 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、林利雄、西村秀一、クリーンブース
- 5) 特許取得 特許第 5263697 号 登録日 2014 年 5 月 10 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、診療ブース
- 6) 特許取得 特許第 5180032 号 登録日 2013 年 1 月 18 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、林利雄、西村秀一、感染防止クリーンブース装置
- 7) 特許取得 特許第 5180024 号 登録日 2013 年 1 月 18 日、発明者 阪田

総一郎、上村泰、西村秀一、感染防止
クリーンブース
8) 特許取得 特許第 5261046 号 登

録日 2013 年 5 月 2 日、発明者 阪田
総一郎、西村秀一、インフルエンザ感
染防止クリーンブー

図 1
成人由来気管支上皮初代培養細胞

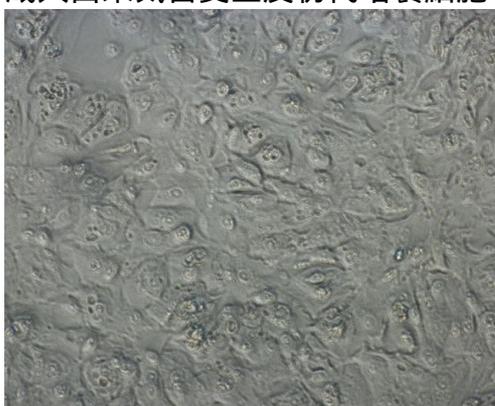


図 3
小児扁桃腺由来初代細胞



図 2
成人十二指腸由来初代培養細胞

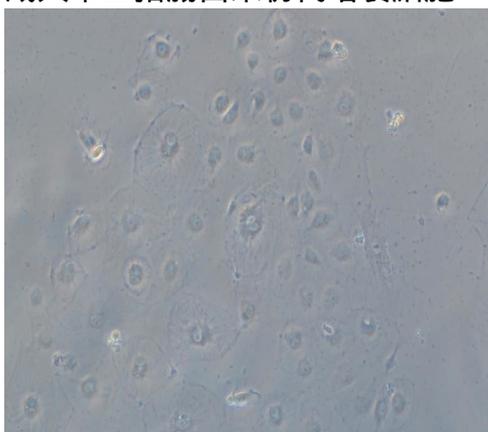


図4 今後の課題

