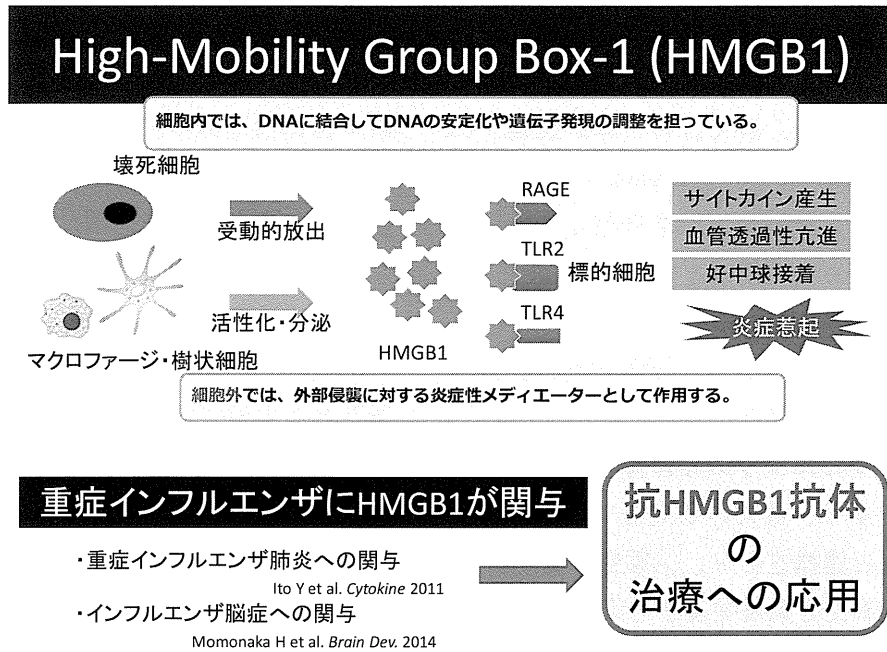


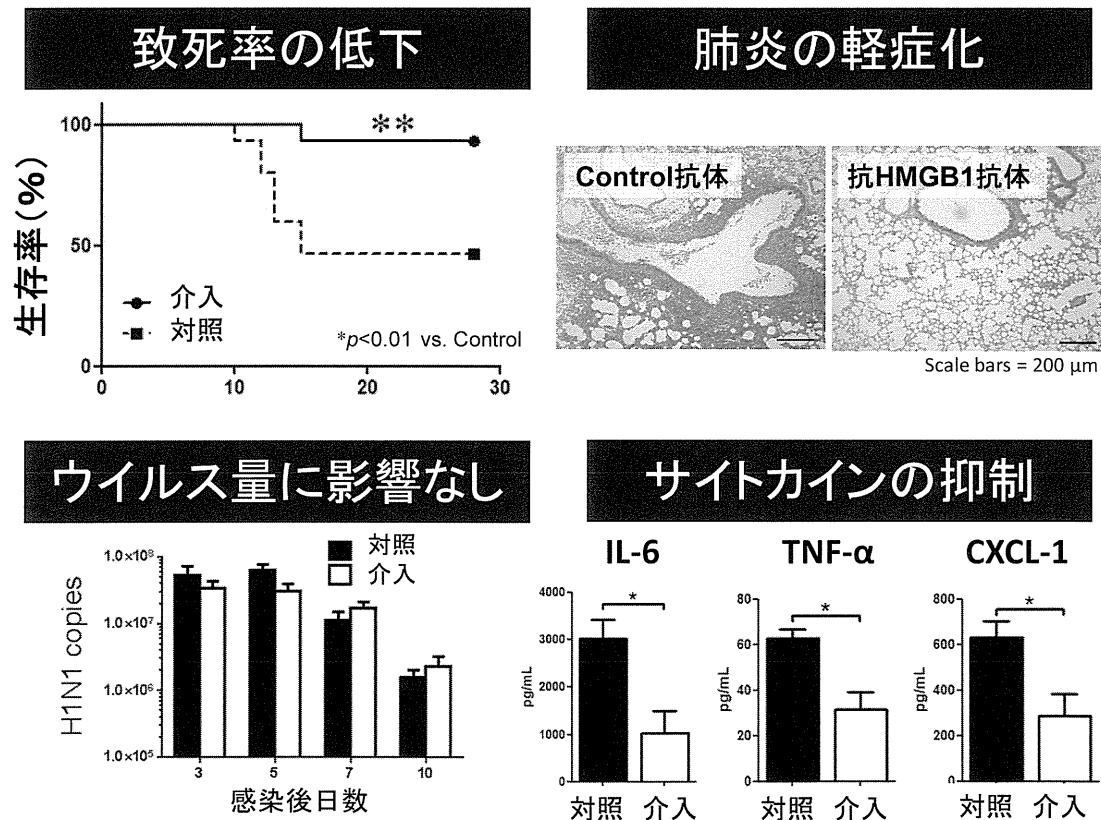
図 5.



方法：抗 HMGB1 モノクローナル抗体をインフルエンザウイルス PR8 感染マウスに静脈注射し、マウスの生存率、肺の病理像、気管支洗浄液中の好中球数、サイトカイン/

ケモカイン濃度、酸化ストレスマーカーなどの推移を検討した。結果を下の図 6 に示す。

図 6.



結果：抗 HMGB1 抗体はマウスの肺炎による致命率を著明に改善させた。その効果は TRX と同様ウイルスの肺での増殖抑制によるものではなかった。肺では好中球の浸潤を抑制しまた、IL-6、TNF α 、CXCL-1 などのサイトカイン・ケモカインを抑制し、酸化ストレスマーカーも低値を示した。

3. 重症インフルエンザの診療体制の整備とガイドラインの作成：

重症インフルエンザの診療体制整備は重要な課題であり、我々の研究班では厚生労働省大石班と連携をとり、①厚生労働省担当部局、②厚生労働省関連研究班（森島班・大

石班）、③関連学会の参加により「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同班会議」を組織した。計 4 回の会議の中で AH7N9 などのウイルス学的特徴および臨床像と病態が討議され、国内侵入時の対策の必要性が協議された。またこの過程で、成人のインフルエンザ肺炎に対する診療ガイドラインが初めて作成された。また 2014 年 WHO の呼びかけによる講習会が中国で開催され、日本から 2 人の研究者（うち 1 人は清水分担研究者）を派遣し、帰国後成果を国内にフィードバックした。その概要について下の図 7 に示した。

図7 「新型インフルエンザ」の診療体制整備

重要な事項

- ・国内侵入前から、病態解明を実施し、
- ・「既存薬」によるガイドライン策定（想定）
- ・新規治療薬の開発
- ・速やかな連携組織を構築していく。※

※「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同会議」

2013-2014

厚生労働省 + 対応研究班（森島班・大石班）+ 関連学会

（日本感染症学会、日本小児科学会、
日本呼吸器学会、日本集中治療学会、その他）

ガイドラインの作成・改訂とその普及

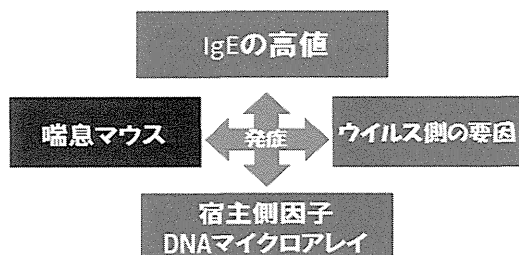
今後、この組織の維持・発展が「新型インフルエンザ」対応に極めて重要となる。

D. E. 考察とまとめ：

2009年の「新型インフルエンザ」AH1pdmにおいて、小児の重症インフルエンザが多発した。また図1に示したようにアレルギー素因特に気管支喘息を有する児で重症肺炎がみられた。この機序について研究を進めたところ、DNAマイクロアレイ解析により宿主の急性期遺伝子発現において、IgE関連遺伝子群および酸化ストレスマーカー関連遺伝子の高発現が認められ興味深い結果となった。一方、中枢神経症状を示す群においては、種々の神経疾患関連遺伝子群やCOX-2遺伝子の高発現を認め、すなわち、脳症と重症肺炎では異なる宿主の背景が存在することが示唆された。興味深いことに本稿では詳細は省いたが、同じ痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎とインフルエンザでは、それぞれ異なる急性期遺伝子の発現が認められ、ウイルスによっても宿主の反応が異なることが明らかになった。2013/14インフルエンザシーズンでは、久しぶりにAH1pdmの流行がみられ、その中で小児および成人にパンデミックの時と同様に肺炎の多発がみられた。今後これら肺炎およびアレルギー素因と関連するAH1pdmウイルス学的要因を探ることが大きな課題である。

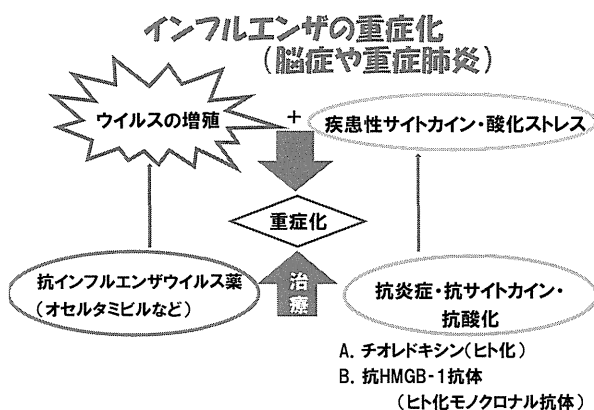
図 8.

何故AH1N1pdm肺炎はアレルギー素因を背景に？



新規治療薬の開発は重要である。今回特にインフルエンザウイルス増殖抑制効果を示さず、抗炎症・抗サイトカイン・酸化ストレス効果を示し、結果としてマウスの致命率を著明に改善する2つの薬剤が確認された。今後AH7N9やAH1pdm薬剤耐性株など抗インフルエンザ薬の効果が低い可能性が示唆されているため、これらの効果を示す薬剤の開発は急務である。従来はインフルエンザ脳症においてステロイドがパルス療法として用いられてきた。これは脳内でインフルエンザウイルスの増殖は認められないため使用が可能となった側面もある。一方、肺内でウイルスが増殖する場合、ステロイドが使いにくい状況が考えられる。その時この2剤は極めて重要となろう。特に抗HMGB1抗体についてはヒト化モノクローナル抗体がすでに完成しており、現在岡山大学においてインフルエンザ肺炎に対する治療薬として特許申請中である。

図 9.



F. 研究発表

論文 (英語論文)

- ・Yamashita N, Tsukahara H, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T. Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int* 55 (5): 572-577, 2013.
- ・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* 20 (1): 73-84, 2014.
- ・Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med* 41(1):166-176, 2013.
- ・Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*.26, 357-369, 2013
- ・Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194-200.
- ・Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; in press.
- ・Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K,

Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013; 63: 194-200.

・Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Ishida C, Tanaka S, Morishima T, Ichiyama T. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; 35: 626-9.

・Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(5):759-60.

・Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol*. 2013;56(1):25-30.

・Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: Relation to maternal and neonatal characteristics. *J Clin Biochem Nutr* 52(1):27-31, 2013.

国際会議発表

・Morishima T. Overview Acute encephalitis /encephalopathy in Japan. PAS (Pediatric Academic Societies Annual Meeting) 2013 meeting in Washington, DC (2013,5.3-5)

G. 知的所有権の取得状況

抗 HMGB1 抗体によるインフルエンザ肺炎の治療 岡山大学において特許出願中

H5N1 およびパンデミックウイルスのウイルス学的解析

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスがアジアの家禽で蔓延しておりヒトへの感染も続いている中、本研究二年度目初頭の平成 25 年春、中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染した。現在も感染者が増え続け、次のパンデミックに発展する危険性が懸念されている。本研究では、初年度に H5N1 ウイルスのオセルタミビル耐性獲得のメカニズムを、二、三年度目に H7N9 ウイルスの性状を解析した。H5N1 ウイルスの NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸変異がウイルスとオセルタミビルの結合親和力を弱め、生体内でのオセルタミビル感受性を低下させていることを明らかにした。また、H7N9 ウイルスのマウスを用いた病原性解析では、H7N9 ウイルスが通常の鳥の H7 ウイルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも病原性が強いことを明らかにした。さらに、H7N9 ウイルス感染者は高齢男性に多く、喫煙歴や慢性呼吸器疾患の合併が見られることが特徴であることから、喫煙マウスモデルを用いて喫煙と H7N9 ウイルス感染との関連を解析した。その結果、タバコ煙暴露群はコントロールの空気暴露群と比較して H7N9 ウイルス感染に対して抵抗性を示すことが分かった。

本研究で得られた成果は、H5N1 ウイルスおよび H7N9 ウイルスの監視をする上で重要であるのみならず、感染者を治療する際にも有用な情報となる。

A. 研究目的

・ H5N1 ウイルスのウイルス学的解析

抗インフルエンザ薬のオセルタミビルは、インフルエンザの治療に広く使われている。近年、NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸のイソロイシンからバリンへの変異が、オセルタミビル耐性に関与することが明らかになってきた。しかし 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビル治療中に出現したものではなく、家禽からの分離株で見つかったものであり、その耐性機序は不明な点が多い。そこで、117 番目のアミノ酸変異による耐性化のメカニズムを明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

・H7N9 ウイルスのウイルス学的解析

平成 25 年春、中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルス感染者が発生した。この H7N9 ウイルスは、ヒトからヒトへの伝播はほとんど起こっていないが、死亡例や重症化例が多数確認された。さらに平成 27 年に入ってから感染者が急増しており、次のパンデミックに発展する危険性が懸念されている。H7N9 ウイルス感染例の疫学的な特徴として、高齢男性での感染例が多く、喫煙歴や慢性呼吸器疾患の合併が見られた。そこで、ヒトから分離された H7N9 ウイルスの哺乳類における病原性、および喫煙と H7N9 ウイルス感染との関連を検討した。

B. 研究方法

・H5N1 ウイルスのウイルス学的解析

本研究では、遺伝的背景の異なる H5N1 ウイルス 3 株 [A/Vietnam/1203/2004 (VN1203, クレード 1)、A/duck/Vietnam/ TY114/2007 (TY114, クレード 2.3.4)、A/Vietnam/UT31412II/2008 (VN31412, クレード 2.3.4)] を用いた。

各ウイルスの NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸を、イソロイシンからバリンに変えたウイルス (NA-I117V) を作製した。これらのウイルスの NA 酵素活性やオセルタミビル感受性を、in vitro、in vivo および in silico で、それぞれの親株と比較解析した。

・H7N9 ウイルスのウイルス学的解析

中国の患者から分離された H7N9 ウイルス (A/Anhui/1/2013(H7N9); Anhui/1) のマウスにおける感染性・病原性を、2009 年のパンデミックウイルス (A/California/04/2009(H1N1pdm09); CA04)、および中国の患者から分離された H7N9 ウイルスとは別系統の H7N9 ウイルス (A/duck/Gunma/466/ 2011(H7N9); DK/GM466) と比較解析した。

さらに、喫煙曝露システムを用いて 180 日間のタバコ煙曝露を C57BL/6 マウスにおこない、喫煙マウスモデルと、コントロールとして空気曝露群を作製した。Anhui/1 株を経鼻感染し、14 日間の体重モニタリングと、感染 2 日目と 5 日目に肺を採取しウイルス力価の測定、病理解析、マイクロアレイ解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

動物実験は、東京大学医科学研究所実験動物委員会の承認のもと、東京大学動物実験規則に従って実施した。

C. 研究結果

・H5N1 ウイルスのウイルス学的解析

in vitro において、NA-I117V 変異による NA 酵素活性は 3 株とも親株と比べ大きな変化はなかったが、オセルタミビル感受性は 1.3-6.3 倍と、わずかであるが低下した。

in vivo では、マウスにおけるオセルタミビル感受性試験により、VN1203 NA-I117V ウイルスと VN31412 NA-I117V ウイルスの 2 株で、親株に比べ感受性が低下した。

さらに、in silico では、分子動力学シミュレーションにより、NA-I117V の変異が NA 蛋白質の 118 番目のアルギニンと、オセルタミビルのカルボキシル基との水素結合を弱め、ウイルスとオセルタミビルの結合親和力の低下をもたらすことが示唆された。

これらの結果から、NA の 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビルとウイルスの結合

親和性を弱めることにより、生体内でのタミフル感受性を低下させていることが明らかとなった。

・ H7N9 ウイルスのウイルス学的解析

ヒトから分離された Anhui/1 のマウスにおける体重減少および致死率は、鳥から分離された GM466 並びに 2009 年のパンデミックウイルス CA04 よりも高いことが明らかとなった。また、Anhui/1 および CA04 の感染後 3 日目の肺および鼻甲介のウイルス力価は、GM466 よりわずかであるが高かった。このことから、中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのマウスでの病原性は、通常の鳥のウイルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも強いことが明らかとなった。

喫煙マウスモデルでの解析では、感染前のタバコ煙暴露群の肺には炎症細胞の浸潤がみられたが、慢性閉塞性肺疾患(COPD)に特徴的な肺胞壁の破壊は顕著ではなかった。H7N9 ウイルス感染後は、タバコ煙暴露群に比較して空気暴露群の方が体重減少が大きく、生残率も低かった。一方で、肺のウイルス力価は両群間に明らかな差は認められなかった。組織学的解析では、両群ともに気管支上皮と肺胞にウイルス感染細胞が分布していたが、炎症細胞の分布を比較すると、空気暴露群のほうが、気管支周囲の炎症細胞の浸潤が強かった。この組織学的な相違について検討するために、肺の遺伝子発現解析をおこなった結果、空気暴露群では、感染 2 日目と 5 日目にウイルス感染によって多くの遺伝子発現の変動がみられたが、タバコ煙暴露群では少数の遺伝子だけが発現変動していた。さらに、細胞浸潤に関連するケモカイン CCL24 と CXCL3 は、空気暴露群では発現上昇していたが、タバコ煙暴露群では、ほとんど変化していなかった。

D. 考察

本研究により、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの NA-I117V によるオセルタミビル耐性メカニズムの新たな知見が得られた。今後、H5N1 ウイルスに感染した患者を治療する際にも本研究で得られた情報は有用となる。

また、中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのマウスにおける病原性が、2009 年にパンデミックをおこしたウイルスよりも強いことが明らかとなった。

喫煙マウスは、我々の予想に反して、H7N9 ウイルスの攻撃に対して抵抗性を示した。H7N9 ウイルス感染による気管支の炎症に対して、タバコ煙暴露による抑制効果が示唆された。タバコ煙暴露は、H7N9 ウイルス感染によるケモカインの発現誘導を阻害する可能性が示唆された。

E. 結論

本研究で得られた成果は、H5N1 ウイルスおよび H7N9 ウイルスの監視をする上で重要であるのみならず、感染者を治療する際にも有用な情報となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le MQ, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y. Molecular

mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the neuraminidase of subtype H5N1 avian influenza A viruses. *J Infect Dis* 207:89-97, 2013.

Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. *J Infect Dis* 207:262-271, 2013.

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shiraikura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 26:551-555, 2013.

Yamayoshi S, Yamada S, Fukuyama S, Murakami S, Zhao D, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Macken C, Neumann G, Kawaoka Y. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. *J Virol* 88:3127-3134, 2014.

Neumann G, Macken CA, Kawaoka Y. Identification of amino acid changes that may have been critical for the genesis of A(H7N9) influenza viruses. *J Virol* 88:4877-4896, 2014.

Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Yamada S, Uchida Y, Saito T, Takahashi K, Sugaya N, Tashiro M, Kawaoka Y. Detection sensitivity of influenza rapid diagnostic tests. *Microbiol Immunol* 58:600-606, 2014.

2. 学会発表

坂井（田川）優子、高山育代、影山勉、内田裕子、西藤岳彦、田代真人、河岡義裕「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは迅速診断キットで判定可能か？」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ —剖検例からわかること—

研究分担者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所・感染病理部 部長

研究協力者 中島 典子 国立感染症研究所・感染病理部 室長

研究要旨

2000 年から 2014 年まで国立感染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼されたインフルエンザ死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本を解析した。主な重症インフルエンザには脳症、心筋症、肺炎があげられるが、どの病態においてもインフルエンザウイルスのゲノムは呼吸器官に限定して検出され、ウイルス血症はみとめられない。季節性インフルエンザに併発する肺炎の肺組織では、ウイルス抗原は気管・気管支・細気管支上皮細胞には検出されたが、肺胞上皮細胞には検出されない。一方、2009 年パンデミックインフルエンザの初期の剖検例では病理組織学的にび慢性肺胞障害を呈し、肺胞上皮細胞にウイルス抗原が検出された。パンデミック終息後にも A/H1N1pdm09 感染に ARDS が併発して死亡する例がみられたが、ウイルス性肺炎による ARDS ではなく、敗血症や DIC などの全身性の炎症反応による ARDS であると考えられた。2013 年に中国で H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が報告され、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例のように重症肺炎で死亡している。ヒトから分離された H7N9 インフルエンザウイルスの特徴を感染動物の気管・気管支・肺組織の病理学的解析により明らかにした。ヒトから分離された H7N9 は鳥から分離された H7N9 はヒトから分離された H7N9 (Anhui) は、マウス、サル、気管・気管支・細気管支上皮細胞、気管支腺上皮細胞、および肺胞上皮細胞に感染した。

A. 研究目的

インフルエンザの病理が注目されるようになったのは、2000 年以降、小児の脳症死亡例が増加し、脳症の病態の解析が急務となってからである。さらに致死率 50%以上の鳥インフルエンザや 2009 年のパンデミックインフルエンザによる死亡例の病理学的解析の報告が加わり、重症インフルエンザ

の病態の解明に助けとなる知見が集積してきた。本研究班において我々の分担研究の目的は、集積されたインフルエンザ剖検組織の解析により重症インフルエンザの病態を解明することである。これまで国立感染症研究所に依頼され検査したインフルエンザ脳症、インフルエンザに併発する心筋炎、パンデミックインフルエンザなどの剖検組

織標本を新しい分子病理学的解析などにより再度解析し、新しい知見を得ることが研究目的である。

B. 研究方法

1. 材料：国立感染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼されたインフルエンザウイルス感染症死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）病理標本。

2. 方法

- ①ヘマトキシリンエオジン（HE）染色標本による組織所見。
- ②免疫組織化学および in situ hybridization 法によるウイルス抗原・ウイルス核酸の体内および組織内分布の解析。
- ③細胞マーカー蛋白抗体との二重染色による感染細胞同定。
- ④FFPE 組織切片中のインフルエンザウイルスおよびサイトカイン・ケモカイン mRNA の定量。

C. 研究結果

1. インフルエンザ例

2000年から2014年まで計56例のインフルエンザ死亡例の病理学的検索が依頼された。2000-2002年では小児脳症例が多く、2009-2011年ではパンデミックインフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 感染症が32例であった。

2. インフルエンザ脳症の病理

脳：19例の脳症の脳組織において、炎症細胞の浸潤はなく、血管壁の硝子化、血漿成分の漏出と微小繊維素血栓がみられた。一部の神経細胞の変性とグリア細胞反応もみられた。免疫組織化学でウイルス抗原は検出されず、パラフィン切片中のウイルスゲノムも陰性であった。脳症例でも脳組織において IL-6 mRNA の発現が亢進しているものから検出されないものまでさまざまであった。血液・髄液中の IL-6 蛋白が高い

ものでは脳組織での IL-6 mRNA が高かった。

気管・気管支・肺：気管・気管支には炎症所見があり、気管・気管支上皮細胞にインフルエンザウイルス抗原が検出された。肺野においては、肺胞病変は少なく、肺胞上皮細胞にウイルス抗原は検出されなかった。二次性細菌性肺炎の併発例が見られたものはあった。

3. 気管・気管支病変

インフルエンザ死亡例の全例で気管・気管支病変が見られた。上皮の剥離、軽度の炎症、うっ血、出血、浮腫がみられるものから壊死性出血性気管支炎像が見られた例もあった。死亡病日の早い例ではウイルス抗原が気管・気管支上皮細胞や気管支腺上皮細胞に検出された。A(H1N1)pdm09 インフルエンザでは好酸球の浸潤が目立つ例が多かった。

4. 肺病変

ウイルス性肺炎 A/H1N1pdm09 ウイルス感染の一部の症例は、肺の場所により異なる進行度のびまん性肺胞傷害 (DAD) の像を呈し、浮腫、硝子膜形成、出血、うっ血、炎症、線維化という所見が認められた。肺切片ごとにウイルス抗原量も異なり、肺の DAD の進行より先にウイルス抗原量の増加が認められたことから、肺組織の病理変化はウイルス感染によるものであると推測された。ウイルスは主に肺胞上皮細胞で感染増殖し、肺から鳥型レセプター ($\alpha 2, 3$ -シアル酸) に親和性の高い配列を有する A/H1N1pdm09 が検出された。鳥インフルエンザウイルス感染例と類似した病理所見であった。すなわちインフルエンザウイルス感染によるウイルス性肺炎による ARDS と考えられた。びまん性肺障害 臨床的に ARDS を呈した剖検肺組織ではびまん性肺障害 (DAD) を呈する。パンデミック終息後の症例であるが、臨床的には全身炎症反応が強く、呼吸器装

着時にすでに DIC や MOF がみられていた。病理像では肺全体にびまん性肺胞障害の滲出期像がみられ、肺局所で差がみられなかった。ウイルス抗原陽性細胞は少なく、ウイルスゲノム量は初期の症例 1 の 1/1000 であった。肺からヒト型レセプターに親和性の高い配列を有す A/H1N1pdm09 が検出された。臨床経過も併せて考えると、ウイルス性肺炎ではなく、敗血症、DIC が引き起こした ARDS ではないかと考えられた。

二次性細菌性肺炎 DAD は呈さず好中球が浸潤する細菌性肺炎を呈するものや、壊死性出血性気管支炎はあっても肺うっ血、肺水腫、肺出血などの非特異的な所見のみの例もあった。ウイルス抗原は気管支から細気管支上皮細胞に検出されても肺胞上皮細胞には検出されなかった。

5. ヒトから分離された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスの特徴

(東京大学医科学研究所河岡研究室との共同研究である)

2013 年 4 月に中国において H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス (以下 H7N9 ウイルス) のヒトへの感染例が報告された。ほとんどが重症の急性呼吸促進症候群 (ARDS) を併発して死亡している。中国から報告されたネクロプシー組織の病理学的解析によると、肺病理像は DAD で H5N1 と類似している。H7N9 は肺胞上皮細胞に検出されている。我々はヒトから分離された H7N9 ウイルス感染動物モデルの病理学的解析を行い、その特徴を明らかにした。

H7N9 流行初期に中国の患者から分離された H7N9 ウイルス、A/Anhui/1/2013 を鳥から分離された H7N9 ウイルス A/duck/Gunma/466/2011、2009 年にパンデミックとなった H1N1pdm09 ウイルス A/California/4/2009 を対照としてマウス、カニクイザル、フェレット、ミニブタに接

種し、接種後 3 日目と 6 日目の鼻腔、リンパ節、気管、気管支、気管支腺、肺組織の病理学的解析 (HE 染色、免疫組織化学) を行った。ヒトから分離された H7N9 ウイルスはカニクイザルの上気道と下気道の両方で感染増殖することが分かった。マウス、フェレットでは、鳥から分離された H7N9 ウイルスよりも強い炎症を引き起こし、サル、フェレットでは気管上皮細胞や気管支腺上皮細胞において、より多くのウイルス抗原が検出された。

H7N9 ウイルスのヒト体内での感染部位は気管～細気管支の上皮細胞および肺胞上皮細胞であり、ヒト-ヒト感染が起こりパンデミックにならないことから、上気道よりも肺胞上皮細胞で増殖能が高いと考えられる。

D. 考察

重症インフルエンザとして、脳症、臨床的心筋炎 (病理所見がない場合が多い)、肺炎が挙げられる。ウイルスが肺胞上皮細胞に感染するウイルス性肺炎が要因となる ARDS とウイルス感染により全身炎症反応、DIC が併発し肺外要因によって引き起こされる ARDS がある。後者の方がより一般的な ARDS かもしれない。しかしながらインフルエンザ感染後 3 病日で重症の低酸素症、ARDS を発症する機構には、発熱間もなく発症する脳症や心筋炎症状と同様、何らかの宿主因子が関与しているのではないかとと思われる。

E. 結論

重症インフルエンザの剖検組織を病理学的解析することで、重症インフルエンザの死亡原因を明らかにできると同時にウイルスの分布や、ウイルスゲノムの解析などが可能となった。重症インフルエンザの死因は呼吸不全だけではなく、脳症や心機能障害 (臨床的には心筋炎の疑い) の場合も多い。

ウイルス感染とこれらの症状がどのように関連するか解明するために病理標本を集積し、解析していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.
- 2) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Mar 16;7(3):552-62.
- 3) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections: thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 4) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4733-43. Epub 2012 Oct 11.
- 5) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):1-13.
- 6) 中島典子、長谷川秀樹 インフルエンザウイルス感染症の病理 医学のあゆみ 241巻1号:4/7, 2012
- 7) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neuman G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 Sep 26;501(7468):551-5. Epub 2013 Jul 10.
- 8) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of

- avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 26(3):357-69, 2013
- 9) Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida H. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. *PLoS One.* 2013 Jul 9;8(7):e68375.
- 10) Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine.* 2014 Oct;69(2):206-10. Epub 2014 Jul 6.
- 11) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe.* 2014 Jun 11;15(6):692-705.
- 12) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 2014 May;88(10):5608-16. Epub 2014 Mar 5.
- 13) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 ウイルス性肺炎 病理と臨床 32(10): 1146-1153, 2014.10
2. 学会発表
- 国際会議
- 1) Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management (Second isirv Antiviral Group Conference) (ハノイ・ベトナム)2012年10月
- 2) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Kawachi K, Suzuki K, Liem NT, Sata T, Hasegawa H. Pathological study of ARDS complicated by influenza virus infection Option for the Control of Influenza VIII September 4-10, 2013. CapeTown
- 国内会議
- 1) 長谷川秀樹 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応

- 答への影響 第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012 年 11 月
- 3) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012 年 11 月
 - 4) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果 第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012 年 11 月
 - 5) 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹 経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012 年 11 月
 - 6) 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 - 7) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 - 8) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 - 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 - 10) 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人 野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 - 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～ 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
 - 12) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡したベトナム小児例の病理学的解析 第 101 回日本病理学会総会（東京）2012 年 4 月
 - 13) 長谷川秀樹、中島典子 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ剖検例からの検討 第 102 回日本病理学会総会（札幌）2013 年 6 月
 - 14) 渡辺登喜子、今井博貴、村上晋、中島典子、富田有里子、山吉誠也、浦木隆太、西藤岳彦、内田裕子、長谷川秀樹、田代真人、河岡義裕 中国でヒトから分離された H7N9 鳥インフルエンザウ

- イルスのフェレットにおける飛沫伝播性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013 年 11 月
- 15) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、佐多徹太郎、長谷川秀樹 重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現 第 61 回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013 年 11 月
- 16) 鈴木 忠樹、川口 晶、相内 章、佐藤 由子、永田 典代、田代 真人、長谷川 秀樹 喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製 第 103 回日本病理学会総会（広島）2014 年 4 月
- 17) 中島 典子、渡辺 登喜子、佐藤 由子、高橋 健太、鈴木 忠樹、田代 真人、河岡 義裕、長谷川 秀樹 ヒトから分離された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス感染動物モデルの病理学的解析 第 103 回日本病理学会総会（広島）2014 年 4 月
- 18) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠 II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMRSS2 は、HA 開裂部位に mono - basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014 年 11 月
- 19) 渡辺登喜子、Gongxun Zhong、Colin Russell、中島典子、八田正人、Anthony Hanson、高橋健太、渡辺真治、今井正樹、長谷川秀樹、河岡義裕 スペイン風邪ウイルスに類似の鳥インフルエンザウイルスのパンデミックポテンシャル 第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014 年 11 月
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究（重症肺炎・脳症の実験病理学的研究）

研究分担者 新矢恭子 神戸大学・准教授
（現：滋慶医療科学大学院大学・客員教授）

研究要旨

病理学的アプローチにより、重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の原因・発症過程に関する理論的な根拠を得て治療に貢献することを目的とした。本研究では、マウスの脳浮腫モデルの解析で、カルシウムイオンの恒常性崩壊が脳症発症の一因となっている可能性を示した。

A. 研究目的

実験病理学的アプローチにより、重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の原因・発症過程に関する理論的な根拠を得て治療に貢献することを目的とした。

以前、インフルエンザ脳症死亡例の延・脊髄を病理学的に検査する機会を得たことで、脳症患者の中樞神経系で起こっている病態には血管症が含まれていると判断した。獣医感染症領域では、脳脊髄血管症は、豚の大腸菌症の一病態として見られており、発症には志賀毒素もしくは志賀毒素と腸管毒素の相乗作用が起因すると考えられている。脳血管の病理所見が酷似していたため、二つの疾患には、病因は異なれども、類似した病理発生機序が発動している可能性があると考えた。

最近、インフルエンザウイルスはウイルス株によって、動物の細胞表面にある自然免疫における病原体の認識タンパク質、

Toll 様受容体 2 と 4 を刺激するものがあることが判明した。そのため、ヒトの細胞表面にある Toll 様受容体もインフルエンザウイルス粒子表面の物質によって刺激される可能性があると考えられた。Toll 様受容体は、先行刺激があることにより、後の刺激によって引き起こされるサイトカイン反応が通常より増強される場合がある。そのため、インフルエンザウイルス感染を引き金として甚急性経過をとる小児の脳症の発生機序として、Toll 様受容体刺激の関与を考慮し、実験的に調べることは重要だと考えた。本研究では、細菌リポ多糖（LPS）による Toll 様受容体先行刺激後に、インフルエンザウイルス重感染をし、その脳浮腫発症における影響を調べ、脳内遺伝子発現プロファイリングを行った。

B. 研究方法

ウイルス：A/Puerto Rico/8/34; H1N1。50%

マウス致死量 (MLD50)は 6×10^2 pfu/50 μ l.
 動物: Balb/c マウス、SPF、5 週令、雌。
 実験計画(承認番号:神大・P110910): マウスを 4 グループに分類 (①PBS、②インフルエンザ (IAV)、③LPS、④LPS+IAV) し、先ず、PBS または LPS (1.25mg/kg, 100ul volume in PBS) を経鼻投与し、12 時間後に、PBS または IAV (100 MLD50 in 50ul PBS) を経鼻投与した。2 日後に、エバンズブルー (EB; 2% in PBS) を腹腔内投与した後、安楽死させ詳細な検索を行った。

脳浮腫の検証: マウスの脳 1.54g を、500 μ l ホルムアミド内で 2 日間 38°C で EB を抽出 (630nm 波長フィルターで測定)。

免疫染色 (IHC): 肺と脳組織を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定、パラフィン包埋切片にし、抗 H1 ウイルス抗体を用いた免疫染色を行った。

ウイルス学的検索: 肺と脳組織に対し、MDCK 細胞を用いたブラック法で検査を行った。

血清サイトカイン濃度測定: 血清 50 μ l を用いて ELISA 法により IL-6 および TNF- α 濃度を測定した (Quantikine Mouse Immunoassay; R&D Systems, USA)。

RNA 抽出とマイクロアレイ解析: 脳幹部分を採取し、全 RNA 抽出キットにて RNA を抽出した (Agilent Technologies, USA)。タカラバイオにマイクロアレイ解析を委託した (Agilent Expression Array、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray)。データマイニングは、Subioplatform (Subio Inc., Japan) を活用した。その後、Gene ontology (GO) 解析を行った (DAVID)。

C. 研究結果

脳浮腫の評価: LPS+IAV 群において、他群と比較して強い脳浮腫が認められた (図 1)。

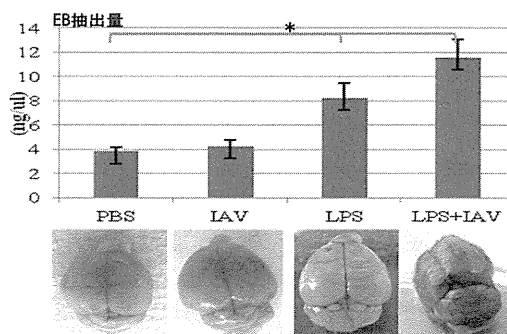
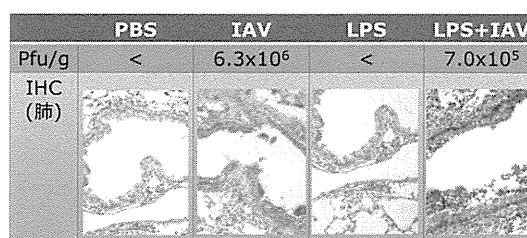


図 1

ウイルス学的/病理学的検索結果: ウイルス感染群では、LPS 処理の有無に関わらず肺へのウイルスの感染が確認された。脳ではウイルスが検出されなかった (図 2)。



<: 検出限界以下

図 2

血清中サイトカイン濃度: LPS+IAV 群において、血清中、IL-6・TNF α の著しい増加が見られた (図 3)。

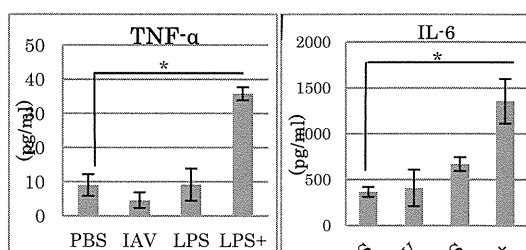


図 3

脳内遺伝子発現: LPS+IAV 群に特異的な遺伝子動態として、309 個の発現上昇、382 個の発現減少が観察された (図 4)。

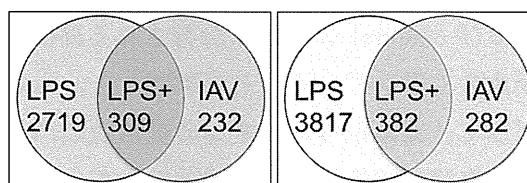


図 4

GO 解析によって、LPS+IAV 群に特異的に発現変動している遺伝子群は、主に、channel

activities、calcium、ion等であることが判明した(表1)。

表1

- calcium ion binding
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- gated channel activity
- cation channel activity
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding
- calcium channel activity
- ion binding
- metal ion binding

Up-regulated Gene Expression

- calcium ion binding
- channel activity
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- calcium channel activity
- cation channel activity
- ion binding
- gated channel activity
- metal ion binding
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding

Down-regulated Gene Expression

D. 考察

本実験で、LPS 先行刺激後の IAV 感染があった場合には、IAV または LPS の単独投与時よりも、強い脳浮腫が惹起されることが示された。この2つの物質投与による生体でのアナジー効果は、Toll 様受容体の先行刺激と引き続く IAV 感染の時間的な間隔によってその程度が変化し、12 時間という時間間隔でそのアナジー効果が最大になり易いことが、先行研究に続いて再確認された。

本実験モデルにおいて、強い脳浮腫が起こっている個体の脳内では、calcium、ion および channel の機能に分類される遺伝子が大きく動いていることが判明した。したがって、カルシウムイオンの恒常性のバランス崩壊が脳症発症の一因となっている可能性がある。実際、近年になって糖尿病性脳症の病理発生機序にカルシウムイオンの

関与が報告され、また、急性脳炎または急性脳症の罹患リスク判定にカルシウムイオンチャンネルのサブユニットの遺伝子多型を標的とした判定法が申請されている(特開2009-112251)。したがって、カルシウムイオンチャンネルの不均衡に陥る原因を探ることは脳症の病態解明の一助となる可能性がある。

E. 結論

脳症発症の一因に、血中高サイトカイン濃度に加えカルシウムイオンの不均衡が関与している可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shinya K, et al., J Virol. 2012; 86(11): 6055-66.

Kyan Y, et al., J Med Virol. 2014; 86(5):905-11.

2. 学会発表

Shinya K, et al., Gene expression profiling in the brains of mice suffering from respiratory disease. ByoDynamics2013: Sep11-13, 2013, Bristol, UK

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

マウスインフルエンザウイルス(H1N1)感染モデルでの炎症基盤解析

研究分担者 松川昭博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科免疫病理学・教授

研究要旨

マウスインフルエンザ(H1N1)肺炎モデルを用いて、炎症の分子基盤を解析した。H1N1肺炎は抗酸化物質チオレドキシシン(TRX)で抑制できることを見いだした。H1N1肺炎はERK経路に依存し、その内因性物質であるSpred2により制御可能であること、さらに、H1N1感染により誘導されるtype-I Interferonにより発現するSETDB2は、H1N1感染後の二次性細菌性肺炎に関与することが明らかになった。

A. 研究目的

人類の死因は感染症によるものが最も多く(WHO: World Health Report 2012)、新興および再興感染症は人類の脅威であり続けている。新興感染症の多くは未知のあるいは変異したウイルス感染である。これまで開発されてきた薬剤は、ウイルスの複製・増殖をターゲットとしたものが多い。しかし新興感染症には無効である場合が多く、新しい治療法の開発が求められている。2009年の新型インフルエンザ(H1N1)パンデミックは記憶に新しい。H1N1インフルエンザウイルス感染の病理組織像は、広範な肺胞・気道上皮傷害と炎症細胞浸潤、および肺水腫を示す。このときの病態形成に、酸化ストレスやサイトカインが深く関わることが知られている。本研究では、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルの解析を通じて、1) 抗酸化物質チオレドキシシン(TRX)によるH1N1インフルエンザ肺炎の治療効果、2) サイトカインシグナル伝達因子ERK/MAPKの内因性抑制因子Spred-2によるウイルス感染時の免疫制御機構、を明らか

かにする事を目的とした。また、3) H1N1インフルエンザウイルス感染症は細菌性肺炎などの二次感染の危険性を高め、二次感染を併発すると死亡率は飛躍的に上昇する。そこで、二次性細菌性肺炎の感受性を規定する因子を明らかにする事も目的とした。

B. 研究方法

C57BL/6マウスにA/PR8/34(H1N1)を経鼻的に感染させ、TRX投与による生体変化を観察した。

次に、野生型およびSpred-2欠損マウスにA/PR8/34(H1N1)を経鼻的に感染させ、H1N1感染後の生体反応を比較検討した。

また、野生型およびSpred-2欠損マウスにA/PR8/34(H1N1)を経鼻的に感染させ、その5日後に肺炎球菌を経気管的に投与し、感染後の生体反応を比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、岡山大学動物実験指針に基づき、3Rの原則に従って実施した。

C. 研究結果

H1N1 によるマウス生存率は、TRX 投与によりマウス生存率は改善した。この時、肺臓でのウイルス量に変化はみられなかったが、肺での好中球浸潤は有意に減少し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中や肺抽出液中の炎症性サイトカイン TNF α やケモカイン CXCL1 産生量は低下した。肺で発現する酸化ストレスマーカー (d-ROMs) は減少し、抹消血中の hydroperoxide も低下した。気管支上皮細胞株 MLE-12 に H1N1 を感染させた時に産生される TNF α や CXCL1 は TRX-1 で濃度依存性に減少した。TRX-1 は抗本抗炎症作用と抗酸化作用によりインフルエンザ肺炎は軽減したものと考えられる。

H1N1 マウス感染モデルで Spred-2 が有意に上昇する事を見出した。H1N1 感染マウスモデルでの Ras-Raf-ERK/MAPK 経路は活性化していた。Spred2-KO マウスでは ERK/MAPK 活性は上昇し、WT マウスと比較して生存率は有意に低下し、肺炎病態の悪化、炎症性サイトカインの亢進ならびに肺内ウイルス量の増加を認めた。Spred2-KO マウスに ERK inhibitor (U0126) を投与する事により、生存率ならびに肺炎病態の有意な改善が見られた。また siRNA を用いて Spred-2 をノックダウンさせた気道上皮細胞株 (MLE-12) を用いたマイクロアレイ解析では、コントロールと比較して PI3kinase の亢進 (p-AK 亢進) を認め、共焦点レーザー顕微鏡下では、endocytosis の亢進に伴うウイルス価の亢進を認めた。H1N1 感染での ERK/MAPK の活性化上昇は肺炎の増強と体内ウイルス増殖に関わることが示唆された。

マイクロアレイシステムを用いた解析にて、type-I IFN (IFN-I) またはインフルエンザウイルスの刺激を受けた気道上皮細胞やマクロファージでは、H3K9 のメチル化 (転写抑制) を誘導する酵素の一つである SET domain, bifurcated 2 (SETDB2) の有意な上

昇を認めた。この SETDB2 はヒストン修飾に関わる酵素の中では H1N1 感染により唯一有意な発現上昇を認める酵素であった。H1N1 感染で死亡した患者の剖検肺の検討でも、気道上皮細胞やマクロファージに SETDB2 の発現が認められた。また、SETDB2 の上昇は type-I Interferon (IFN-I) 依存性で、IFN-I のレセプター欠損 (IFN- \cdot R KO) マウスは、二次性細菌性肺炎の原因菌として最も頻度の高い肺炎球菌を用いて作成した二次性細菌性肺炎モデルでは、野生型 (WT) マウスと比較して有意な生存率の改善を認めた。H1N1 感染での SETDB2 の発現上昇は二次性細菌性肺炎に対する感受性のマーカーとなりうる事が示された。

D. 考察

TRX-1 は抗本抗炎症作用と抗酸化作用によりインフルエンザ肺炎は軽減したものと考えられる。

H1N1 感染での ERK/MAPK の活性化上昇は肺炎の増強と体内ウイルス増殖に関わる。

H1N1 感染での SETDB2 の発現上昇は二次性細菌性肺炎に対する感受性のマーカーとなりうる。

E. 結論

TRX の補充療法は、インフルエンザ感染後の抗炎症治療戦略になる可能性がある。

Spred2 を介した ERK 経路の制御はインフルエンザウイルス感染症のターゲットと考えられた。

インフルエンザウイルス感染により産生される type-I Interferon によって誘導される SETDB2 は、インフルエンザウイルス感染後の二次性細菌性肺炎のターゲットと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表