

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 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 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- α 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

- Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Matsutani 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.* 2013, 41(1):171-181.
- Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Hagiwara T, Mizutani N, Okada T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Matsukawa A, Haga T, Kakuta S, Iwakura Y, Hosokawa S, Dohi T. Chemokine receptor CCR8 is required for lipopolysaccharide-triggered cytokine production in mouse peritoneal macrophages. *PLoS One.* 2014 Apr 8;9(4):e94445
- Kuelling FA, Foley KT, Liu JJ, Liebenberg E, Sin AH, Matsukawa A, Lotz JC. The Anabolic Effect of Plasma-Mediated Ablation on the Intervertebral Disc: Stimulation of Proteoglycan and IL-8 Production. *Spine J.* 2014 Apr 18. pii: S1529-9430(14)00386-6.
- Xu Y, Ito T, Fushimi S, Takahashi S, Itakura J, Kimura R, Sato M, Mino M, Yoshimura A, Matsukawa A. Spred-2 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in mice. *PLoS One.* 2014 Oct 2;9(9):e108914
- MATSUKAWA A. Negative regulation of cytokine signaling in inflammation. The 5th International symposium for future technology creating better human health and society. March 15-16, 2012, Okayama (Invited Speaker)
- Ito T, Yoshimura A, Matsukawa A : Spred-2 negatively regulates influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia. 99th Annual Meeting, The American Association of Immunologists, May 4-8, 2012, Boston, USA
- 松川昭博、伊藤利洋：A型インフルエンザウイルス(H1N1)感染とMAPK経路 第102回日本病理学会総会 シンポジウム 2013年6月6-8日 ロイトン札幌(北海道)
- 板倉淳哉、伊藤利洋、佐藤美和、美野愛、伏見聡一郎、松川昭博:Spred2欠損マウスは敗血症抵抗性を示す 第102回日本病理学会総会 2013年6月6-8日 ロイトン札幌(北海道)
- 篠倉美理、木村亮二郎、伊藤利洋、松川昭博:Spred2発現ベクターの作製とその応用 第102回日本病理学会総会 2013年6月6-8日 ロイトン札幌(北海道)
- 高橋索真、平岡佐規子、伏見聡一郎、伊藤利洋、板倉淳哉、木村亮治郎、楊旭、篠倉美理、中川裕貴、住居優一、竹井大介、井口俊博、半井明日香、森藤油記、秋田光洋、原田馨太、岡田裕之、松川昭博、山本和秀：Ras/ERK系と大腸粘膜治癒-Ras/ERK系の阻害因子Spred-2の解析を通じてー 第50回日本消化器免疫学会総会 2013.8.1-2. ホテルグランドヒル市ヶ谷(所沢)

2. 学会発表

- 松川昭博：炎症の発現・制御におけるサイトカインシグナル伝達 第101回日本病理学会総会(企画招待講演) 2012年4月26-28日

- 松川昭博:Ras-Raf-ERK経路からみたA型インフルエンザ(H1N1)感染 第18回日本神経感染症学会総会 2013.10.11-12 シーガイアコンベンションセンター(招待教育講演)
- 伊藤利洋、板倉淳哉、河原明奈、小田晋輔、伏見聡一郎、松川昭博:インフルエンザ(H1N1)感染症ならびに二次性細菌性肺炎のエピジェネティクス解析 第103回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島
- 板倉淳哉、小田晋輔、河原明奈、佐藤美和、美野愛、伏見聡一郎、伊藤利洋、松川昭博:Spred2欠損マウスにおける敗血症抵抗性のメカニズム 第103回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島
- 水田亮、伊藤利洋、板倉淳哉、伏見聡一郎、松川昭博:間質性肺炎モデルにおける Spred-2 の役割 第103回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島

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