

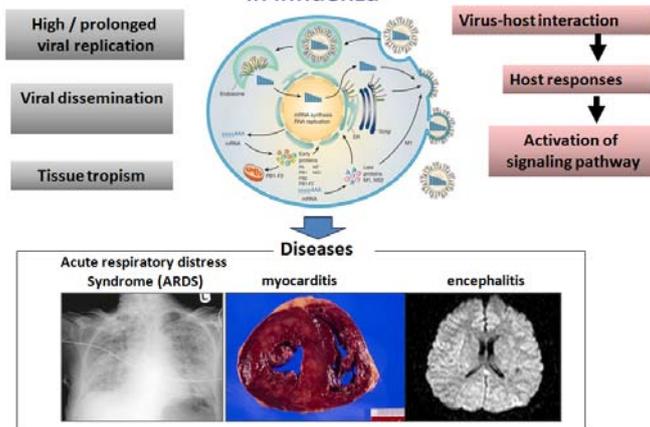
## 研究テーマ

## 高病原性インフルエンザウイルスによる重症呼吸不全発症機構の解明

## 1. はじめに

2009年4月メキシコでブタ由来の新型インフルエンザ(2009年型H1N1)が発生し、世界的なパンデミックを引き起こしている。この新型インフルエンザ(H1N1)は弱毒型であるが、季節性インフルエンザより毒性が強く、小児、あるいは肥満、糖尿病、喘息などの基礎疾患のある人を中心に、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、心筋炎、あるいは脳炎などを引き起こした重症例が報告された。一方、アジア、ヨーロッパ、アフリカにおけるH5N1鳥インフルエンザの流行は依然として続いており、ヒトに感染した場合、致死率は60%にも及ぶ。その主要な死因は、ARDSならびに多臓器不全である。現在、H5N1鳥インフルエンザは、ヒトからヒトに感染する能力は有していないが、今後ウイルスが変異するとヒトにおいてパンデミックを引き起こすことが危惧されている。今までのところ、これらの高病原性インフルエンザウイルスがヒトにおいて重篤な疾患を引き起こすメカニズムに関しては不明な点が多く、一旦重症化すると、集中治療室(ICU)において集中治療が必要となり、救命は困難を極める。季節性インフルエンザが上気道病変を中心とした疾患であるのに対して、高病原性インフルエンザが下部気道あるいは肺以外の臓器で重症化する要因として、ウイルス増殖能の亢進あるいは遷延、ウイルスの受容体の分布の違い、肺から多臓器へ移行する能力などが考えられ、これらウイルス側の要因に関して精力的な研究が行われてきた。一方私共は、インフルエンザの重症化、疾患の誘導には、ウイルス側の要因のみならず、ウイルス・宿主相互作用による宿主応答ならびに重要な役割を果たしているの

図1 Factors that contribute to the pathogenesis of diseases in influenza



ではないかと考えている(図1)。すなわち、インフルエンザの重症化を阻止するには、ウイルス増殖を抑える抗ウイルス薬に加え、疾患の誘導につながる宿主応答ネットワークを標的とした治療法が必要ではないかと考える。本研究では、マウスモデルを用いて、インフルエンザの重症化に関して、宿主応答の観点から、自然免疫の過剰応答ならびに炎症性ケモカインに焦点を当てて研究を行った。

## 2. 方法

マウスICUモデル: 同モデルは、インフルエンザウイルスに感染し呼吸不全を起こした患者がICUで人工呼吸等の治療を受ける状態をマウスで再現したモデルである。マウスに麻酔下に気管切開を行い、気管チューブを挿入し呼吸機能解析システムと連動しているマウス用人工呼吸器に接続し呼吸機能の経時的変化を解析した。合わせて心電図・血圧をモニターした。この状態で気管チューブから、インフルエンザウ

ウイルスを投与して急性呼吸不全が誘導されると $\Delta$ 圧/ $\Delta$ 体積(単位体積当たりの圧変化)で表される「エラスタンス」は経時的に増加し呼吸機能が悪化した。人工呼吸終了後にマウス肺を摘出し、分子生物学的解析ならびに組織学的解析を行った。

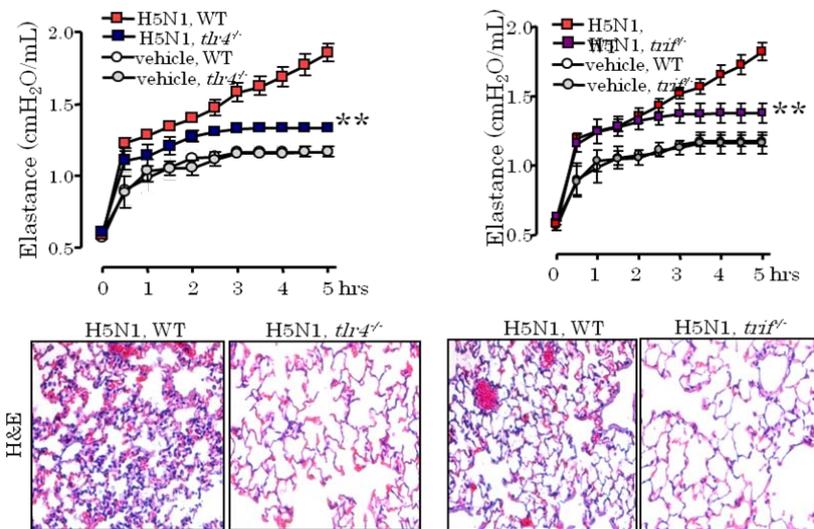
マウス感染実験:麻酔下のマウスに経気道的にインフルエンザウイルスを感染させ、覚醒後通常の飼育を行い、体重の変化、生存率を測定した。合わせて、経時的に呼吸機能解析、ウイルス増殖能測定(ウイルスタイター)、分子生物学的解析ならびに組織学的解析を行った。

*in vitro* 細胞生物学的解析:マウスから単離したマクロファージおよび好中球を用いて細胞生物学的解析を行った。マクロファージおよび好中球は、マウス骨髄、チオグリコレート処理したマウスの腹腔洗浄、肺洗浄、ならびに肺組織のコラジェナーゼ処理で採取した。単離した細胞に、インフルエンザウイルスを感染あるいはウイルス関連物質で刺激し、ウイルス増殖能、サイトカイン産生、ROS産生、細胞遊走活性を測定した。

### 3. 結果 研究成果

①TLR4ノックアウト(KO)マウス、TRIF KOマウスはH5N1インフルエンザの呼吸不全において呼吸機能ならびに肺病理所見を軽減させた(図2)。この結果から、H5N1インフルエンザの呼吸不全では、TLR4-TRIF経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

図2 TLR4 or TRIF deficiency improved the severity of H5N1 virus mediated lung injury



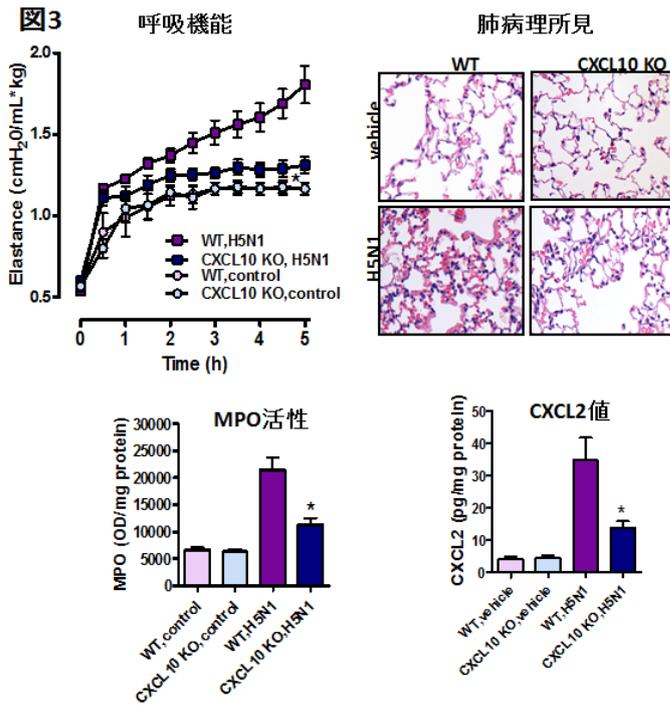
②TLR4 KO ならびに TRIF KO 骨髄キメラを用いた検討から骨髄由来細胞におけるTLR4, TRIFがインフルエンザの呼吸不全の誘導に関与していることがわかった。

③TLR4-TRIF経路の下流で病態に関与しているサイトカインを調べるために、H5N1インフルエンザ投与肺のサイ

トカインアレイを行った。その結果、CXCL10/IP-10ならびにIL-6が野生型(WT)、TLR4 KO ならびにTRIF KOの肺障害の重症度と良い相関を示した。

④免疫組織学的検討からIP-10はインフルエンザ感染に伴い、感染初期では主として肺胞マクロファージに、肺障害増悪期には好中球で産生がみられた。さらにIP-10 KOマウスは、H5N1インフルエンザの呼吸不全において呼吸機能、肺病理所見を改善させ、MPO活性ならびに肺組織CXCL2値は低値を示した(図3)。このことから、CXCL10/IP-10はインフルエンザの呼吸不全の進展に関与していることが考えられた。

⑤次いで好中球に着目してIP-10の機能を検討した。CXCL10/IP-10の受容体CXCR3は好中球には発現していないとされていた。今回の検討では、naïveな好中球ではCXCR3は発現していないものの、感染後肺に集積した好中球では発現が誘導されていることがわかった。さらに、IP-10は感染下の好中球において



ROSの産生をautocrineに増強させていることがわかった。

⑥さらに、IP-10 KOマウスにWTの好中球を adoptive transferすると、IP-10 KOの好中球のtransferに比べ、肺障害が増悪することがわかった。

#### 4. 考察

今回の検討からインフルエンザによる呼吸全においては、TLR4-TRIF経路の下流でケモカインCXCL10/IP-10の産生が亢進していることがわかった。CXCL10/IP-10は、H5N1鳥インフルエンザあるいは新型肺炎 (SARS) 感染患者肺サンプルにおいても高値をとり、呼吸不全の重症度と関連していることがす

に報告されている。しかし、CXCL10/IP-10がウイルス感染による呼吸不全の発症に関与しているか否かは不明であった。今回の検討では、IP-10欠損マウスではインフルエンザによるARDS症状が改善された。このことからIP-10はインフルエンザによる呼吸不全の発症に病因として関与していることが明らかとなった。また、CXCL10/IP-10はCXCケモカインファミリーに属しCXCR3を受容体とし、T細胞や単球などの遊走に関与していることが知られている。一方、好中球ではIP-10の受容体CXCR3が発現しておらず、IP-10がARDSのように好中球が中心的な役割を担っている疾患においてどのようなメカニズムで肺障害を誘導するか不明であった。今回の検討では、感染に伴って肺に集積した好中球ではCXCR3が発現が誘導され、IP-10は感染下の好中球においてROSの産生をautocrineに増強させていることがわかった。以上の結果から、CXCR3-CXCL10/IP-10のautocrine pathwayは、ウイルス感染による呼吸不全の発症において重要な役割を果たしており、このpathwayは治療標的となりうると思われた。

#### 5. 発表論文、参考文献

- Imai Y et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 2008 18;133(2):235-49.
- Imai Y, Kuba K, Penninger JM. Further advances in immunity against highly pathogenic influenza viruses. *European Infectious Disease*. 2009 3(1):61-4.
- Neely GG, Kuba K, Imai Y et al. A global in vivo Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*, in press
- Haubner BJ, Neely GG, Imai Y et al. PI3Kgamma protects from myocardial ischemia and reperfusion injury through a kinase-independent pathway. *PLoS One*. 5(2):e9350, 2010.
- Imai Y, Kuba K, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM.: Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ J*. 74(3):405-10, 2010.
- Oudit GY, Imai Y, Kuba K et al. The role of ACE2 in pulmonary diseases--relevance for the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant*. 24(5):1362-5, 2009.