

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09580

研究課題名(和文)重症感染症の新たな治療戦略確立に向けたエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of epigenetic gene regulation mechanism for establishment of new therapeutic strategies for severe infectious diseases

研究代表者

石井 誠 (ISHII, Makoto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30317333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は重症インフルエンザ感染後肺炎球菌性肺炎にヒストンアセチル化を介したエピジェネティクス制御が関与している仮説のもとに、C57BL/6マウスにインフルエンザA(PR8株)5PFUを点鼻投与し、7日後に10の4乗CFUの肺炎球菌を点鼻感染させた。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬のTSAを1日1回腹腔内投与を行った(1 mg/kg)ところ、HDAC活性は有意に低下し、生存率も有意に向上し、細菌の菌量や肺胞洗浄液中の総細胞数は有意に低下した。さらにTSA投与により全肺NK細胞数も有意に低下し、TSAによるインフルエンザ感染後肺炎球菌性肺炎の保護的効果に寄与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The hypothesis of the study was epigenetic mechanism, especially for histone acetylation, might contribute to the poor outcome of post-influenza pneumonia. Mice were infected intranasally with 1.0×10^4 CFU of *Streptococcus pneumoniae* 7 days after intranasal inoculation with 5 PFU of influenza virus A/PR8. The mice were intraperitoneally injected with the histone deacetylase (HDAC) inhibitor TSA. TSA significantly suppressed HDAC activity and significantly improved the survival rate of mice after post-influenza pneumococcal infection, which was associated with a significant decrease in bacterial load and the total cell count of the BALF. The number of natural killer cells in the lungs were significantly lower in the TSA-treated group, which may contribute to the protective effects of TSA. TSA protects mice against post-influenza pneumococcal pneumonia possibly through multiple factors, including a decrease in lung and systemic bacterial load, and suppression of systemic inflammation.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：重症感染症 エピジェネティクス インフルエンザ 肺炎球菌 ヒストンアセチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現・情報を調節する機構であり、種々のヒストン修飾や DNA メチル化などがその具体例として挙げられる。例えばヒストンアセチル化は遺伝子の転写活性を上昇させ、ヒストン H3 の 27 番リジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) は遺伝子の転写活性を抑制する。

これまでエピジェネティクスによる遺伝子制御機構は、発生学や腫瘍学などの分野での重要性は確立されているが (Verma M et al. *Lancet Oncol.*, 2002) (Feinberg AP et al. *Nature*, 2007)、近年では免疫学や感染症学の分野でもエピジェネティクスの重要性が報告されてきている (Ansel KM et al. *Annu Rev Immunol.*, 2006.)

(2) 研究代表者は、これまで主に敗血症などの重症感染症におけるエピジェネティック制御機構に関し研究を継続して行ってきた。例えば、敗血症においても病態に関与するとされる M2 マクロファージのエピジェネティクス制御 (Ishii M et al. *Blood*, 2009)、敗血症における好中球のエピジェネティクス制御 (Ishii M et al. *J Immunol.*, 2012)、敗血症における制御性 T 細胞 (Cavassani KA, Ishii M et al. *Blood*, 2010) や Th1/Th2 細胞のエピジェネティクス関与 (Carson WF 4th, Ishii M et al. *Eur J Immunol.*, 2010) などを報告してきた。

(3) インフルエンザウイルス感染症は、本邦での 2009 年の新型インフルエンザウイルス (A/H1N1) 流行など、社会的な脅威であり、重症化した場合の致死率は高く、その病態の詳細な解明と適切な治療法の確立が急務である。

(4) 研究代表者は上述の様にこれまで主に敗血症においてエピジェネティクスの関与を検討してきたが、インフルエンザウイルス感染の病態でもエピジェネティクスの関与の可能性が十分あると考え、予備研究を行った。その結果、マウス馴化インフルエンザウイルス (A/PR8; H1N1) 400pfu の点鼻投与によるインフルエンザ肺炎マウスにおいて、ヒストン脱アセチル化酵素 (Histone Deacetylase:HDAC) 阻害薬である Trichostatin A (TSA) をインフルエンザ感染前日から連日腹腔内投与 (1mg/kg) を行うと生存率は上昇する結果を得た。

2. 研究の目的

以上の予備検討の結果を踏まえて、インフルエンザ感染症においてもエピジェネティックな遺伝子発現の制御機構がその病態に寄与している可能性が高いと考え、特にヒストンアセチル化とヒストン H3K27 メチル化に着目し、ヒストン脱アセチル化酵素

(HDAC) 阻害薬である TSA 及び Ezh2 コンディショナルノックアウトマウス (Ezh2^{fllox/fllox} ERT2-Cre マウス: 以下 Ezh2 cKO マウス) を用いて、インフルエンザ肺炎マウスや、インフルエンザ・肺炎球菌重複感染マウスモデルにおけるエピジェネティクスの関与・重要性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

特にインフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染マウスモデルに焦点をあて、重症感染症におけるエピジェネティクスの関与を明らかにする。具体的には以下のことを行う。

(1) マウス馴化インフルエンザ (A/PR8; H1N1) 10 pfu の経鼻感染を行い、その 7 日後に肺炎球菌 1x10⁴ cfu の経鼻投与による 2 次感染を行い、インフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染マウスモデルを作製する。

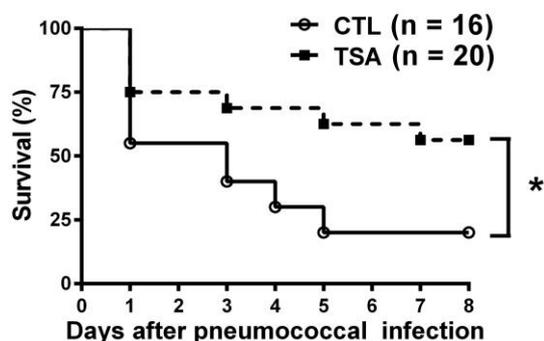
(2) ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の TSA を用いて、各々の投与効果を免疫学的に検討し、インフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染におけるヒストンアセチル化の役割を詳細に検討する。

(3) Ezh2 cKO マウスを用いて、インフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染におけるヒストン H3K27 メチル基転移酵素 Ezh2 の役割を In vivo および In vitro で詳細に検討し解明していく。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染マウスにおいて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である TSA を投与すると、HDAC 活性は有意に低下した。

(2) インフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染マウスにおいて、TSA を投与すると、有意にその生存率は改善した (下図)。



一方、肺炎球菌感染 36 時間後の菌量は、TSA 投与により減少傾向であったが、有意差は認めなかった。

(3) 肺炎球菌感染 24 時間後の肺胞洗浄液中の総細胞数は、TSA 投与により有意に減少し

たが、細胞分画の好中球は減少傾向であるものの、有意差は認めなかった。

(4) 肺胞洗浄液中のサイトカイン IL-1 β は TSA 投与により有意に低下したが、TNF- α や IL-6 は低下傾向ではあったが、変化を認めなかった。

(5) 肺炎球菌感染 48 時間後の肺病理所見は、TSA 投与によっても明らかな差は認めなかった。

(6) 一方、肺内の Natural killer (NK) 細胞数は、TSA 投与により有意に低下しており、NK 細胞の低下が、インフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染マウスの TSA 投与による保護的作用に寄与している可能性が示唆された。

(7) インフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染マウスにおける Ezh2 の効果に関しては、現在研究を継続中で有り、Ezh2 cKO マウスでは、野生型マウスに比べて、生存率が低下しており、さらに解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Yuge S, Akiyama M, Ishii M, Namkoong H, Yagi K, Nakai Y, Adachi R, Komatsu T. Glycoprotein Nanotube Traps Influenza Virus. *Chem Lett* 2017. 41(1):95-97. 査読有。
2. Asakura T, Yamada Y, Namkoong H, Suzuki S, Nijima Y, Kamata H, Yagi K, Okamori S, Sugiura H, Ishii M, Jinzaki M, Betsuyaku T, Hasegawa N. Impact of cavity and infiltration on pulmonary function and health-related quality of life in Mycobacterium avium complex pulmonary disease: A 3-dimensional computed tomographic analysis. *Respir Med* 2017. 126:9-16. doi: 10.1016/j.rmed.2017.03.010. 査読有。
3. Asakura T, Hayakawa N, Hasegawa N, Namkoong H, Takeuchi K, Suzuki S, Ishii M, Betsuyaku T, Abe Y, Ouchi M. Long-term outcome of pulmonary resection for nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 2017. 65(2):244-251. doi: 10.1093/cid/cix274. 査読有。
4. Kuroda A, Hegab AE, Jingtao G, Yamashita S, Hizawa N, Sakamoto T, Yamada H, Suzuki S, Ishii M, Namkoong H, Asakura T, Ozaki M, Yasuda H, Hamamoto J, Kagawa S, Soejima K, Betsuyaku T. Effects of the common polymorphism in the human aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene on the lung. *Respir Res* 2017. 18(1):69. doi: 10.1186/s12931-017-0554-5. 査読有。
5. Yagi K, Ishii M, Namkoong H, Asami T, Iketani O, Asakura T, Suzuki S, Sugiura H, Yamada Y, Nishimura T, Fujiwara H, Funatsu Y, Uwamino Y, Kamo T, Tasaka S, Betsuyaku T, Hasegawa N. The efficacy, safety, and feasibility of inhaled amikacin for the treatment of difficult-to-treat non-tuberculous mycobacterial lung diseases. *BMC Infect Dis* 2017 17(1):558. doi: 10.1186/s12879-017-2665-5. 査読有。
6. Namkoong H, Ishii M, Mori T, Sugiura H, Tasaka S, Sakurai M, Koda Y, Kato J, Hasegawa N, Okamoto S, Betsuyaku T. Clinical and Radiological Characteristics of Patients with Late-Onset Severe Restrictive Lung Defect After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *BMC Pul Med* 2017. 17(1):123. doi: 10.1186/s12890-017-0466-7. 査読有。
7. Kamata H, Asakura T, Suzuki S, Namkoong H, Yagi K, Funatsu Y, Okamori S, Uno S, Uwamino Y, Fujiwara H, Nishimura T, Ishii M, Betsuyaku T, Hasegawa N. Impact of Chronic Pseudomonas aeruginosa Infection on Health-related Quality of Life in Mycobacterium avium Complex Lung Disease. *BMC Pul Med* 2017. 13:17(1):198. doi: 10.1186/s12890-017-0544-x. 査読有。
8. Yagi K, Morimoto M, Ishii M, Namkoong H, Okamori S, Asakura T, Suzuki S, Asami T, Uwamino Y, Funatsu Y, Fujiwara H, Kamata H, Nishimura T, Betsuyaku T, Kurashima A, Hasegawa N. Clinical characteristics of pulmonary Mycobacterium lentiflavum disease in adult patients. *Int J Infect Dis*. 2017. 67:65-69. doi: 10.1016/j.ijid.2017.12.001. 査読有。
9. Yagi K, Ishii M, Namkoong H, Fujii H, Asami T, Suzuki S, Asakura T, Mizoguchi K, Kamo T, Tasaka S, Iwata S, Kunkel SL, Hasegawa N, Betsuyaku T. Histone Deacetylase Inhibition Protects Mice against Lethal Post-Influenza

- Pneumococcal Infection. *Crit Care Med.* 2016. 44(10):e980-987. doi: 10.1097/CCM.0000000000001821. 査読有。
10. Suzuki S, Morino E, **Ishii M**, Namkoong H, Yagi K, Asakura T, Asami T, Fujiwara H, Uwamino Y, Nishimura T, Tasaka S, Betsuyaku T, Takasaki J, Iwata S, Hasegawa N. Clinical characteristics of pulmonary Mycobacterium scrofulaceum disease in 2001-2011: a case series and literature review. *J Infect Chemother.* 2016. 22(9):611-6. 査読有。
 11. Ueyama M, Asakura T, Morimoto K, Namkoong H, Matsuda S, Osawa T, **Ishii M**, Hasegawa N, Kurashima K, Goto H. Pneumothorax Associated with Nontuberculous Mycobacteria: A Retrospective Study of 69 Patients. *Medicine (Baltimore).* 2016. Jul;95(29):e4246. doi: 10.1097/MD.0000000000004246. 査読有。
 12. Morimoto K, Namkoong H, Hasegawa N, Nakagawa T, Morino E, Shiraishi Y, Ogawa K, Izumi K, Takasaki J, Yoshiyama T, Hoshino Y, Matsuda S, Hayashi Y, Sasaki Y, **Ishii M**, Kurashima A, Nishimura T, Betsuyaku T, Goto H; Nontuberculous Mycobacteriosis Japan Research Consortium (NTM-JRC). Macrolide-resistant Mycobacterium avium complex -An analysis of 102 consecutive cases. *Ann Am Thorac Soc.* 2016 Nov;13(11):1904-1911. 査読有。
 13. Namkoong H, Morimoto K, Nishimura T, Tanaka H, Sugiura H, Yamada Y, Kurosaki A, Asakura T, Suzuki S, Fujiwara H, Yagi K, **Ishii M**, Tasaka S, Betsuyaku T, Hoshino Y, Kurashima A, Hasegawa N. Clinical efficacy and safety of multidrug therapy including thrice weekly intravenous amikacin administration for Mycobacterium abscessus pulmonary disease in outpatient settings: a case series. *BMC Infect Dis.* 2016 Aug 9;16:396. 査読有。
 14. Funatsu Y, Tasaka S, Asami T, Namkoong H, Fujiwara H, Iketani O, Yagi K, Kimizuka Y, **Ishii M**, Nishimura T, Ogata H, Iwata S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Pharmacokinetics of intravenous peramivir in the airway epithelial lining fluid of healthy volunteers. *Antivir Ther.* 2016;21(7):621-625. doi: 10.3851/IMP3096. 査読有。
 15. Hegab AE, Arai D, Gao J, Kuroda A, Yasuda H, **Ishii M**, Naoki K, Soejima K, Betsuyaku T. Mimicking the niche of lung epithelial stem cells and characterization of several effectors of their in vitro behavior. *Stem Cell Res.* 2015 May 20;15(1):109-121. 査読有。
 16. Miyazaki M, Nakamura H, Takahashi S, Chubachi S, Sasaki M, Haraguchi M, Terai H, **Ishii M**, Fukunaga K, Tasaka S, Soejima K, Asano K, Betsuyaku T. The reasons for triple therapy in stable COPD patients in Japanese clinical practice. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015 10:1053-1059. 2. 426. 査読有。
 17. Namkoong H, **Ishii M**, Funatsu Y, Kimizuka Y, Yagi K, Asami T, Asakura T, Suzuki S, Kamo T, Fujiwara H, Tasaka S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Theory and strategy for Pneumococcal vaccines in the elderly. *Hum Vaccin Immunother.* 2016 Feb;12(2):336-43. 査読有。
 18. Takahashi S, **Ishii M**, Namkoong H, Hegab AE, Asami T, Yagi K, Sasaki M, Haraguchi M, Sato M, Kameyama N, Asakura T, Suzuki S, Tasaka S, Iwata S, Hasegawa N, Betsuyaku T. Pneumococcal Infection Aggravates Elastase-Induced Emphysema via MMP-12 Overexpression. *J Infect Dis.* 2016 Mar 15; 213(6):1018-30. 査読有。
 19. Asakura T, Funatsu Y, **Ishii M**, Namkoong H, Yagi K, Suzuki S, Asami T, Kamo T, Fujiwara H, Uwamino Y, Nishimura T, Tasaka S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Health-related quality of life is inversely correlated with C-reactive protein and age in Mycobacterium avium complex lung disease: a cross-sectional analysis of 235 patients. *Respir Res.* 2015 Dec 3;16(1):145. doi: 10.1186/s12931-015-0304-5. 査読有。
 20. Kamo T, Tasaka S, Tokuda Y, Suzuki S, Asakura T, Yagi K, Namkoong H, **Ishii M**, Hasegawa N, Betsuyaku T: Levels of soluble receptor for advanced glycation end products in bronchoalveolar lavage fluid in patients with various inflammatory lung diseases. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med.* 9(S1): 147-154, 2015.

DOI: 10.4137/CCRP.M.S23326. 査読有。

[学会発表] (計 10 件)

1. 鈴木翔二, **石井誠**, 朝倉崇徳, 南宮湖, 八木一馬, 加茂徹郎, 岡森慧, 鎌田浩史, 堀内 圭輔, 長谷川直樹, 別役智子. ADAM17 が肺気腫発症に与える影響の検討. 第 57 回日本呼吸器学会総会 2017 年。
2. 八木一馬, **石井誠**, 鎌田浩史, 平原潔, 南宮湖, 浅見貴弘, 朝倉崇徳, 鈴木翔二, 岡森 慧, 加茂徹郎, **中山俊憲**, 長谷川直樹, 別役智子. ヒストンメチル基転移酵素 Ezh2 はインフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染マウスに保護的に作用する. 第 57 回日本呼吸器学会総会 2017 年。
3. 岡森慧, **石井誠**, 朝倉崇徳, 鈴木翔二, 鎌田浩史, 南宮湖, 八木一馬, 加茂徹郎, 堀内 圭輔, 長谷川直樹, 別役智子. インフルエンザウイルス感染における ADAM10 の役割に関する検討. 第 57 回日本呼吸器学会総会 2017 年。
4. 四倉正也, **石井誠**, 齋藤史武, Hegab Ahmed E., 浜本純子, 南宮湖, 家田真樹, 浅村尚生, 別役智子. 直接リプログラミングによる肺上皮細胞の分化誘導法の検討. 第 57 回日本呼吸器学会総会 2017 年。
5. 八木一馬, 南宮湖, 朝倉崇徳, 鈴木翔二, 岡森慧, 上菘義典, 浅見貴弘, 舩津洋平, 藤原 宏, 鎌田浩史, 西村知泰, **石井誠**, 長谷川直樹. 過敏性肺炎様の陰影を伴い増悪した肺 Mycobacterium avium complex 症の一例. 第 92 回日本結核病学会総会 2017 年。
6. 岡森慧, 朝倉崇徳, 鎌田浩史, 鈴木翔二, 南宮湖, 八木一馬, **石井誠**, 西村知泰, 長谷川 直樹, 別役智子, 林雄一郎. 胃癌術後の患者に発症し、繰り返す誤嚥性肺炎と鑑別を要した肺 Mycobacterium fortuitum 症の 1 例. 第 92 回日本結核病学会総会 2017 年 3 月. 東京.
7. 朝倉崇徳, **石井誠**, 南宮湖, 鈴木翔二, 八木一馬, 岡森慧, 鎌田浩史, 岩田敏, 長谷川 直樹. 肺炎球菌による慢性閉塞性肺疾患の増悪マウスモデルにおいて S1P 受容体修飾薬 (ONO-4641) は気腫進行を抑制する. 第 91 回日本感染症学会学術集会 2017 年。
8. 森本耕三, 小川賢二, 森野英里子, 浅見貴弘, 長谷衣佐乃, 松田周一, 辻本佳恵, 藤原宏, 佐々木結花, 南宮湖, 林悠太, **石井誠**, 後藤元, 朝倉崇徳, 青野昭男, 長谷川直樹, 御手洗聡, 倉島篤行. 肺 M. abscessus complex 症の予後に関する検討. 第 91 回日本感染症学会学術集会 2017 年 4 月。
9. Yagi K, **Ishii M**, Namkoong H, Asami T, Asakura T, Suzuki S, Fujiwara H, Nishimura T, Kamo T, Tasaka S, Hasegawa N, Betsuyaku T. The Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Protects Mice Against Lethal Post-Influenza Pneumococcal Infection. The 112th annual International Conference of American thoracic society. San Francisco, CA, U.S.A. 2016.
10. Yagi K, **Ishii M**, Namkoong H, Asami T, Asakura T, Suzuki S, Fujiwara F, Nishimura T, Kamo T, Tasaka T, Hasegawa N, Betsuyaku T. Role of histone acetylation in mice coinfecting with influenza virus and Streptococcus pneumonia. The 111th annual International Conference of American thoracic society. Denver, CO, U.S.A. 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 誠 (ISHII, Makoto)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・専任講師

研究者番号 : 30317333

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

中山 俊憲 (NAKAYAMA, Toshinori)

千葉大学・医学部免疫発生学教室・教授

研究者番号 : 50237468

(4) 研究協力者

八木 一馬 (YAGI, Kazuma)