

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19439

研究課題名(和文) インフルエンザ肺炎におけるSLPIの重症化機序と治療応用の検討

研究課題名(英文) SLPI is important for influenza pneumonia via macrophage activation

研究代表者

平野 泰三 (Hirano, Taizou)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：90733832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1)気道上皮前駆細胞がインフルエンザの重症化に関与する2)secretory leukocyte protease inhibitor (SLP)欠損マウスでは気道上皮前駆細胞が増加する。これらより、SLPI欠損マウスはインフルエンザ感受性が低下し、インフルエンザ感染症の増悪に関与すると仮定した。SLPI欠損マウスは野生型マウスと比較して肺炎症は増加傾向にあるが、有意な差を認めなかった。次にマクロファージ分化に関して検討した所、SLPI KOマウスでは肺マクロファージが活性化していた。この原因としてマクロファージの分化に関与するサイトカインを測定するとSLPI KOマウスでは増加していた。

研究成果の概要(英文)：We previously reported two important point for the relationship about influenza pneumonia and lung stem cell. First, bronchiolar progenitor cell is more sensitive for influenza virus than other lung cells, Second, secretory leukocyte protease inhibitor (SLP), which is antiprotease inhibitor, is important for club cell differentiation from bronchiolar progenitor cell. From these things, we hypothesis that SLPI is important for influenza pneumonia. First we evaluated that survival rate and lung inflammation of influenza pneumonia model in SLPI KO and WT mice. Lung inflammation but not survival rate is meekly increased increased in SLPI KO mice than WT. We next evaluated that lung macrophage differentiation by using M/M2 method. In SLPI KO mice, M1/M2 differentiation is more activated than WT mice. Last, We evaluated the pathology of activating M1 macrophage. In SLPI KO mice, the level of inflammation cytokines such as TNF and IFN is more unregulated than WT mice.

研究分野：肺幹細胞

キーワード：SLPI

## 1.研究開始当初の背景

肺幹細胞/前駆細胞は、通常肺の修復・再生に関与する事が知られており、インフルエンザ肺炎モデルでも幹細胞細胞が修復に関与する事が報告された (Cell. 2011 October 28; 147(3): 525-538)。一方で肺の幹細胞と考えられる OCT4 陽性細胞は、インフルエンザウイルスに感受性を有し、また、その他の幹細胞である SSEA1/SPC/CCSP 陽性細胞も SARS cor ウイルスの標的細胞である事が報告された (PNAS. 2006 ;20;103(25): 9530-9535)。上記のように、普遍的に肺の幹細胞/気道上皮前駆細胞の役割は気道修復に関与すると考えられていたが、肺の前駆細胞である気道上皮前駆細胞はインフルエンザウイルス感受性が高く、インフルエンザ肺炎の重症化に関与する事が報告された。我々は肺の前駆細胞である気道上皮前駆細胞が **secretory leukocyte protease inhibitor** (以下 SLPI) により Club 細胞への分化が調節されており、SLPI 欠損マウスでは気道上皮前駆細胞数が増加する事を報告した。これらの結果より SLPI 欠損マウスではインフルエンザウイルスへの感受性が高く肺炎症に関与すると仮説した。

## 2.研究の目的

インフルエンザ感染症は毎冬流行し、多数の感染者を認める重要な感染症である。多くのインフルエンザ感染症は自然に軽快するが、時に肺炎を引き起こし、重篤化する事が知られている。しかし、現在までに抗インフルエンザ薬の効果は限定的である。我々の仮説より SLPI を用いたがインフルエンザ感染症の新規治療薬の開発を目標とした。

## 3.研究の方法

SLPI 欠損マウス及び野生型マウスを用いてインフルエンザ感染症モデル、肺炎モデルにてインフルエンザ感染への抵抗性及び肺内のインフルエンザウイルス量を検討する。また、上記に差を有してれば、SLPI がどの様にインフルエンザ感染症への炎症に関与する

のかをマクロファージの分化に注目して検討する。

## 4.研究成果

(1) SLPI 欠損マウスと野生型マウスのインフルエンザウイルスの感受性に関して

野生型及び SLPI 欠損マウスにペアンとハサミを用いて気道を暴露し、サーフローを挿入し経気道的にインフルエンザウイルスを 5000pfu 投与し、死亡率を検討した。死亡率は各マウスとも 20%であり、有意な差を認めなかった。次に同様の方法でインフルエンザウイルスを 2000pfu 投与した。しかし、各マウスの死亡率に差を認めなかった。次に上記マウスの 7 日目の体重減少率を比較した。野生型マウスが  $18 \pm 4\%$  に対して SLPI 欠損マウスでは  $22\% \pm 2\%$  であり、SLPI 欠損マウスにて野生型マウスより体重減少率が高い傾向を有していたが、有意な差を認めなかった ( $P > 0.05$ )。最後に肺炎症を比較するためにインフルエンザウイルス投与後第 7 日目にサーフローを介してリン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS) 750  $\mu$ l を投与・回収を 2 回施行し、回収後、2300 g, 5 分にて遠心分離し、細胞塊と上清に分ける。細胞塊は再度 1 ml の PBS にて攪拌しトリパンプル (0.4%) を用いて総細胞数を測定し、総細胞数を形態学的に評価し、評価した。肺胞洗浄液中の総細胞数が野生型マウスが  $4.5 \times 10^5 \pm 0.8$  個であったのに対して  $5.8 \times 10^5 \pm 0.8$  個であり、有意に SLPI 欠損マウスでは増加していた。

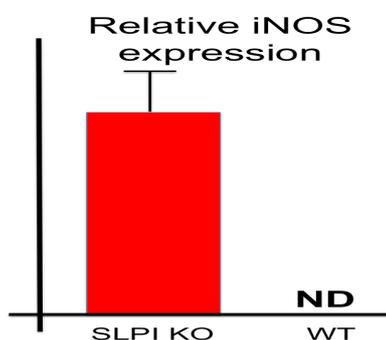
(2) SLPI 欠損マウスと野生型マウスとの肺内インフルエンザウイルス量の検討

次にインフルエンザウイルス感染症における野生型マウスと SLPI 欠損マウスの肺内のウイルス量を検討した。インフルエンザウイルス投与 7 日後に、マウスを麻酔し、ハサミにて肋骨を切除し、肺を露出し、取り出し、マウス肺をミンチした後、肺の RNA を採取し cDNA を作成した。上記を用いて定量 PCR にてイ

インフルエンザウイルスのRNAである Influenza nuclear protein (*Flu NP*)を用いて検討した。SLPI欠損マウスでは野生型マウスに比較して肺内のインフルエンザウイルス量に有意な差を認めなかった (Relative *Flu NP* expression, WT  $1.0 \pm 0.1$  VS SLPI KO  $1.2 \pm 0.3$ , N=5)。同様に肺内のインフルエンザウイルスの蛋白である M2蛋白の発現量にも差を認めなかった。

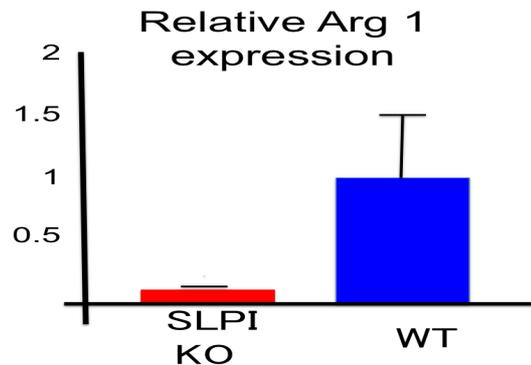
### (3) SLPI 欠損マウスと野生型マウス由来のマクロファージの分化の検討

最後にインフルエンザ感染症における SLPI 欠損マウスの WT に比較しての肺炎症の抵抗性の差に関して、ウイルス量に関連しないことから、肺炎症細胞、特にマクロファージに注目して検討した。マクロファージは炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) と肺修復マクロファージ (M2 マクロファージ) に分類され、この分化が肺炎症に関与することが知られている。そのため、各マウスから肺胞洗浄液にて肺胞内の細胞を回収し、形態学的にマクロファージが 99%以上であることを確認し、マクロファージの分化を検討した。M1 マクロファージのマーカである iNOS の発現量を検討したところ SLPI 欠損マウスで有意にその発現量が増加していた (Relative iNOS expression, SLPI KO  $1 \pm 0.3$  VS WT 測定できず)。

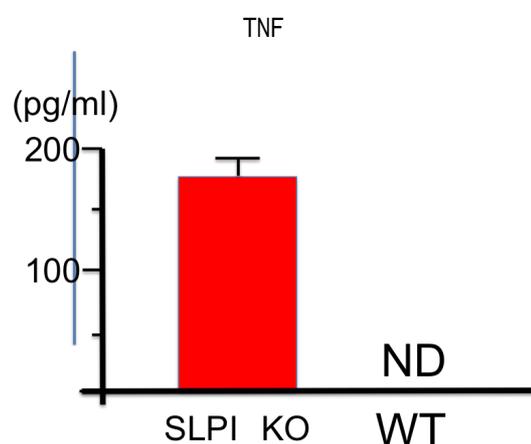
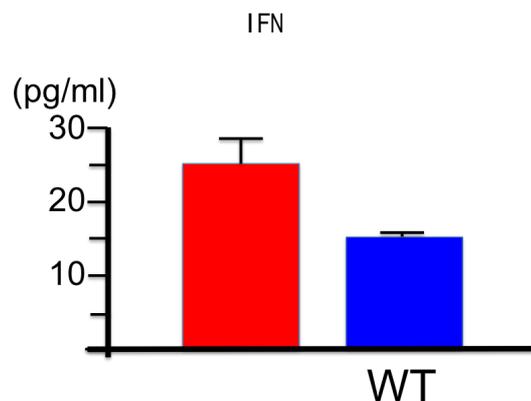


次に M2 マクロファージのマーカである Arg1 の発現量を検討したところ、SLPI 欠損マウスでは野生型マウスと比較してその発

現量が低下していた (Relative Arg1 expression, SLPI KO  $0.5 \pm 0.03$  VS WT  $0.1 \pm 0.2$ )。



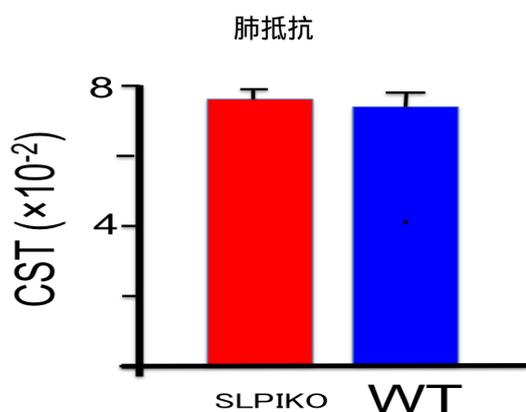
次にマクロファージの M1 マクロファージへの分化には TNf 及び IFN などの炎症性サイトカインが関与することが知られており、上記に関して肺胞内の洗浄液の各サイトカインを ELISA 法にて検討を行った所、SLPI 欠損マウスで野生型マウスに比較してその発現量が低下していた (IFN、SLPI KO  $22 \pm 3$  VS WT  $15 \pm 2$  pg/ml, TNF、SLPI KO  $150 \pm 15$  VS WT 測定以下)。



次にマクロファージの細胞系である THP1 を

用いて In Vitro にて SH SLPI プラスミドを用いて SLPI が直接マクロファージの分化に関与するのかを検討した。しかし、SLPI の発現の変化のみではマクロファージの分化に関与しない事から、サイトカインを介してマクロファージの分化に関与する事が示された。これらの結果から SLPI は炎症性サイトカインを介してマクロファージの分化に関与しインフルエンザ感染症の肺炎症に関与する事が示唆された

(4) SLPI 欠損マウスは経年変化では肺炎症及び肺機能に変化を認めなかった。最後にこれまでの結果から、SLPI 欠損マウスでは経年変化にて肺機能や肺炎症に差を有するのではないかと考え検討した。24週齢のマウスを用いて肺炎症をばい肺胞洗浄液で検討し、肺機能を肺抵抗を用いて検討した。24週マウスの肺炎症には差がなく、肺抵抗も差を有しなかった。



## 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 4 件)

Tadahisa Numakura, Hisatoshi Sugiura, Takaaki Akaike, Tomoaki Ida, Shigemoto Fujii, Akira Koarai, Mitsuhiro Yamada, Katsuhiko Onodera, Yuichiro Hashimoto, Rie Tanaka, Kei Sato, Yutaka Shishikura, Taizou Hirano, Satoru Yanagisawa, Naoya Fujino, Tatsuma Okazaki,

Tsutomu Tamada, Yasushi Hoshikawa, Yoshinori Okada, Masakazu Ichinose. Production of reactive persulfide species in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 査読あり, 19:2017

Hirano T, Yamada M, Sato K, Murakami K, Tamai T, Mitsuhashi Y, Tamada T, Sugiura H, Sato N, Saito R, Tominaga J, Watanabe A, Ichinose M. Invasive pulmonary mucormycosis: rare presentation with pulmonary eosinophilia. *BMC Pulm Med* 査読あり 17: 2017

Hirano T, Yamada M, Ichinose M. Chronic cholestasis with dilation of intrahepatic bile duct related to administration with Ceritinib. *J Thorac Oncol* 査読あり 12(8):2017:e123-e125.

Tode N, Kikuchi T, Sakakibara T, Hirano T, Inoue A, Ohkouchi S, Tamada T, Okazaki T, Koarai A, Sugiura H, Niihori T, Aoki Y, Nakayama K, Matsumoto K, Matsubara Y, Yamamoto M, Watanabe A, Nukiwa T, Ichinose M. Exome sequencing deciphers a germline MET mutation in familial epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer. *Cancer science* 査読あり 2017:108

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 泰三 (Hirano, Taizou)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：90733832