

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08405

研究課題名(和文)RSウイルス感染初期での肺炎形成のメカニズム解析～感染防御素材の探索を目指して～

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of progression of pneumonia in the initial infection of RSV

研究代表者

渡辺 渡 (Watanabe, Wataru)

九州保健福祉大学・保健科学部・教授

研究者番号：50399218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：不活化肺炎球菌をツールにRSV肺炎形成の初期のメカニズムを明らかにして、制御素材としての可能性の探索を目的とした。不活化肺炎球菌の作用発現には菌体の成分だけでなく構造保持が必要であり、単球/マクロファージを活性化することが判明した。そしてRSV感染初期のこれらの細胞を介したRANTES産生応答への増強作用は、特異的なものであり、肺炎形成進行の増減にこの因子が重要であることが強く示唆された。これらの作用はin vitroで確認された一方で、不活化肺炎球菌の抗RSV活性を増強することが出来ず、感染防御素材の有望な候補としてはさらなる検討が必要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RSウイルスは、小児において上・下気道炎など呼吸器疾患を引き起こす。近年、冬季を中心に高齢者を含めて大流行が報告されており、ワクチンがなく肺炎など重症化症例数の増加と共に医療行政上の重要な問題になっている。

本研究では、ワクチン開発の障害になったRSウイルスの特徴的な細胞性免疫、特に感染初期応答のメカニズムについて不活化肺炎球菌をツールに解析することに取り組んだ。結果として、防御可能な素材の有望な候補は見いだせなかったが、RANTESが肺炎進行の鍵とあり防御の標的になる可能性を示し、今後のワクチンや抗ウイルス薬の開発などに貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)： To reveal the initial mechanism of RSV-induced pneumonia, we evaluated the effects of formalin-inactivated streptococcus pneumoniae (ISP) on pneumonia in RSV-infected mice. It was revealed that ISP enhanced the production of a chemokine RANTES from alveolar macrophages due to ingestion of the intact fungus body. Because type-I interferon was not induced due to ISP administration in RSV-infected mice, it was suggested that progression of pneumonia was alleviated due to activation of an initial immune response in RSV infection. Although enhancement of the induction of RANTES due to ISP was confirmed in RSV-infected RAW264.7 cells in vitro, improvement of efficacy of ISP was not found using various strains of streptococcus pneumoniae. Further study needs to be done to find new anti-RS viral materials using streptococcus pneumoniae.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RSウイルス 肺炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) RS ウイルスは、小児において上・下気道炎など呼吸器疾患を引き起こす。近年、冬季を中心に高齢者を含めて大流行が報告されており、ワクチンがなく肺炎など重症化症例数の増加と共に医療行政上の重要な問題になっている。

(2) これまで私たちは、肺炎球菌などの重複感染がRS ウイルス肺炎を重症化に關与する臨床報告に注目して、その作用の解明に取り組んだ。そして、不活化肺炎球菌がRS ウイルス感染初期において、むしろ肺炎を軽減することを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究ではRS ウイルス感染マウスモデルを用いて、不活化肺炎球菌が感染初期の炎症誘導を抑制して肺炎を軽減する知見を基に、感染初期免疫での肺炎形成のメカニズムを明らかにし、さらに感染防御素材の探索系の構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肺炎球菌

5種類の肺炎球菌を用いた(ATCC49619[標準株], ATCC 6303, 6314, 10813 and 700670)。これらの菌は5%羊血液寒天培地で増やしたのち、10%ホルマリン/ phosphate buffered saline (PBS)中で室温、60時間インキュベートして不活化した。なお、鏡検と追加培養確認試験後に生物実験に利用した。ホルマリン混入の有無は、シッフ試薬で検討した。不活化肺炎球菌の破碎には落射型のソニケーターを用い、氷冷しながら約1時間処理した。破碎処理の結果は、グラム染色後に鏡検で確認した。

#### (2) RSV マウス感染実験

不活化肺炎球菌サンプルをPBSに均一懸濁・希釈した。ウイルス感染前1、3および5日前にこれらの試料を100 uLずつ $2-4 \times 10^6$  cfuになるようにBALB/cマウス(雌性、6週齢)に麻酔下(ketamine 40 ug/g, xylazine 6 ug/g、筋注)で経鼻投与した。なお、対照にはPBSを投与した。投与後、RSV A2株 $5 \times 10^5$  PFUを麻酔下で経鼻感染させた。RSV感染1および5日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷PBS 0.8 mLを注入し、肺胞洗浄液(BALF)を取得した。BALF中の浸出細胞の解析は、PI-Rhodes probeを用いたFACS解析およびライトギムザ染色後の鏡検により実施した。BALF中のケモカイン・サイトカインレベルは、ELISAで解析した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。肺組織は、HE染色法で解析した。

#### (3) *In vitro* 感染実験

RAW264.7細胞を懸濁した不活化肺炎球菌標準株( $2 \times 10^7$  cfu)と共に24時間培養した。その後、RS ウイルス(MOI=1)を感染させて、さらに24時間培養を継続した。培養上清はELISAに使用し、細胞はライトギムザ染色後に鏡検に利用した。

### 4. 研究成果

#### (1) 不活化肺炎球菌サンプルの特性について

これまで不活化肺炎球菌(ISP、標準株)について、RSV感染モデルでのウイルス増殖の抑制による肺炎軽減効果や感染1日後での肺胞洗浄液(BALF)中のTNF- $\alpha$ レベルが強く抑制される結果を得てきた。この効果が肺炎球菌の菌体成分に由来するのか、あるいは菌体の構造によるものかを検証するために、不活化肺炎球菌を超音波破碎してRSV感染1日後のTNF- $\alpha$ レベルを指標に検討した(図-1)。その結果、超音波破碎により抑制効果は大きく減弱し、不活化肺炎球菌の抗RSV効果発現には、菌体の構造保持が重要であることが判明した。即ち、肺炎球菌ワクチンではそのような効果が得られないことも強く示唆された。

不活化肺炎球菌の生物学的な作用に関して、これまで肺炎球菌を不活化する際に用いた中性ホルマリンのキャリアーが影響した可能性が否定できなかった。そこで、ホルマリン測定用のシッフ試薬を用いて、RSV実験に用いた不活化肺炎球菌サンプルのチェックを行った。これにより、ホルマリンの混入を否定することができ、今後の肺炎球菌の不活化処理を今まで通りの調製法で行うこととした。

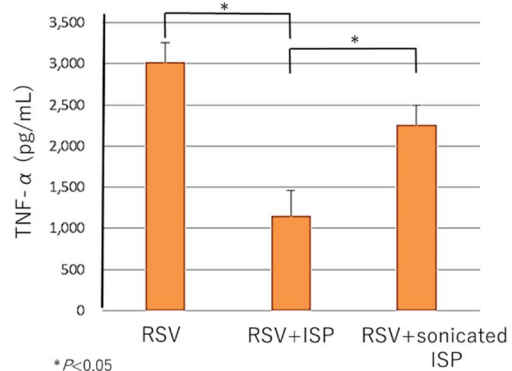


図-1 不活化肺炎球菌のTNF- $\alpha$ 産生抑制効果に対する超音波破碎の影響

#### (2) 肺炎球菌菌株の検討

一連の実験において、肺炎球菌は標準株であるATCC49619株を利用してきた。そこで、より活

性の高い不活化肺炎球菌サンプルを得る目的で、抗原性や薬剤耐性情報が異なる 4 種類の肺炎球菌株 (ATCC 6303, 6314, 10813 and 700670) を ATCC より購入して増やし、これまでと同様の方法で不活化肺炎球菌サンプルを調製した。感染 1 日後の TNF- $\alpha$  レベルを指標に検討した結果、活性の強弱は株間であるものの、標準株と大きく異なるものはなかった。以後の実験も引き続き標準株を使用することとした。

### (3) 肺胞洗浄液中の浸出細胞の解析

RSV 肺炎の軽減には感染初期の免疫応答が強く関わっていることが推察されたので、RSV 感染 1 日後の BALF 中の浸出細胞について塗抹標本を作製して検討した。感染初期の BALF 中には単核球が多く見られ、非感染時には見られない好中球も多く含まれていた (図-2)。さらにこれらの細胞群では所々に幼若化したような細胞が確認された。そこでこれらの観察結果を検証するために、これらの生細胞に Propidium Iodide (PI) 標識した DNA probe を取り込ませ、FACS 解析により DNA 量を測定した (図-3)。その結果、不活化肺炎球菌曝露により感染初期の免疫担当細胞が活性化されていることが示唆された。

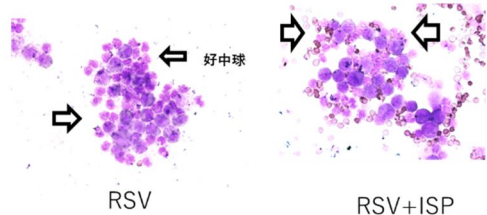


図-2 肺胞洗浄液中の浸出細胞群の相違 (ライトギムザ染色像)

Sample	Percentage of the cells highly stained with PI .
RSV Control	81.87%
RSV S.P.	90.67%

図-3 肺胞洗浄液中の浸出細胞DNA合成に対する不活化肺炎球菌の影響

### (4) 感染初期での免疫応答

不活化肺炎球菌の投与で誘導される抗 RS ウイルス活性について、単なる免疫原性の高い“異物”の感作による非特異的な防御作用である可能性も考えられた。そこで BALF 中のタイプ I インターフェロンレベルを調べた。感染 1 日後の BALF 中のインターフェロン および  $\beta$  はともに不活化肺炎球菌投与であまり変化が無いが、むしろ抑制傾向であった。これらの結果から、抗ウイルス作用は特異的な免疫応答への関与によるものであることが再確認された。

RSV 感染 1 日後の肺病理組織標本では、炎症は形成されていないものの組織中への細胞浸潤は認められた。そして、不活化肺炎球菌投与時には、肺組織中のリンパ球の比率が低下し肺胞マクロファージ様の比率が高まっていた。即ち、感染初期での活性化されていた細胞種は単球/マクロファージである可能性が高まった。そこで単球系からも産生が知られており、これらの細胞のアポトーシスを抑制する作用や抗ウイルス活性を担う NK 細胞の活性化が報告されている RANTES の

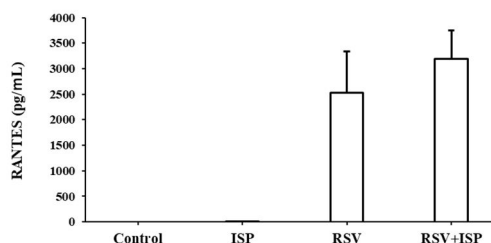


図-4 RSV感染初期のRANTESに対する不活化肺炎球菌の影響

感染初期でのレベルを調べた (図-4)。その結果、不活化肺炎球菌投与で上昇していることが判明した。不活化肺炎球菌の感染初期での標的細胞は単球/マクロファージであり、肺炎形成過程での RANTES レベルが病態進展に強く関わっていることが示唆された。

### (5) 培養マクロファージ様 264.7 細胞での作用

標的細胞を明確にするため、培養マクロファージ RAW264.7 細胞を用いて不活化肺炎球菌の RSV 感染応答での作用を検証した。予備実験として当初、陰性対照と設定した酸化チタンは、RAW264.7 細胞に対して形態学的変化をもたらせ、対照物質としては不適当であった。不活化肺炎球菌では RAW264.7 細胞の培養時に目立った影響がなかったため、RANTES 産生応答を検討した (図-5)。

RSV 非感染条件では、不活化肺炎球菌の有無に関わらず RANTES はほぼ誘導されなかった。一方、RSV 感染時には不活化肺炎球菌により、RANTES 産生増強が認められ、*in vivo* での作用をほぼ再現できた。現在、マクロファージの機能として重要な貪食能に関する影響について、蛍光標識黄

		RANTES (pg/mL)	
		Mock	RSV
ISP	-	37	28,962
	+	52	41,458

図-5 RAW264.7細胞におけるRANTES産生への不活化肺炎球菌の影響

色ブドウ球菌を指標に検討を継続している。

(6) まとめ

不活化肺炎球菌の RSV 感染における作用発現には、菌体の構造保持が必要であり、単球/マクロファージを活性化することが判明した。そして RSV 感染初期のこれらの細胞を介した免疫応答、特に RANTES 産生応答への作用が肺炎形成過程の進展に重要であることが強く示唆された。さらに、これらの作用は *in vitro* で確認された一方で、不活化肺炎球菌の抗 RSV 活性を増強する材料を見出すことが出来ず、感染防御素材の候補としてはさらなる検討が必要であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe, W., Hirose, A., Takeshita, T., Hashiguchi, S., Sakata, K., Konno, K., Miyauchi, A., Akashi, T., Yoshida, H., Sugita, C., Kurokawa, M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Perinatal exposure to tetrabromobisphenol A (TBBPA), a brominated flame retardant, exacerbated the pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected offspring mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 789-795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.42.789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 渡辺 渡、宮内亜直	4. 巻 33
2. 論文標題 RSウイルス感染マウスモデルでの感染初期応答の重要性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 245-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 ・Miyauchi, A., Watanabe, W., Akashi, T., Hashiguchi, S., Yoshida, H., Sugita, C., Kurokawa, M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Effect of inactivated Streptococcus pneumoniae as non-pathogenic particles on the severity of pneumonia caused by respiratory syncytial virus infection in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology Report	6. 最初と最後の頁 514-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxrep.2019.05.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wataru Watanabe, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Aki Miyauchi, Hiroki Yoshida, Masahiko Kurokawa
2. 発表標題 Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice.
3. 学会等名 54th Congress of the European Societies of Toxicology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮内亜宜、明石 敏、橋口誠子、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡
2. 発表標題 不活化肺炎球菌暴露によるRSV感染応答への影響
3. 学会等名 日本ウイルス学会第 65回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺 渡、宮内亜宜、明石 敏、橋口誠子、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦
2. 発表標題 不活化肺炎球菌のRSウイルス感染への作用
3. 学会等名 日本薬学会第138回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	明石 敏  (Akashi Toshi)  (10648596)	九州保健福祉大学・薬学部・教授   (37604)	
研究分担者	宮内 亜宜  (Miyachi Aki)  (70736488)	九州保健福祉大学・薬学部・講師   (37604)	
研究分担者	黒川 昌彦  (Kurokawa Masahiko)  (80186527)	九州保健福祉大学・薬学部・教授   (37604)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉田 裕樹  (Yoshida Hiroki)  (90469411)	九州保健福祉大学・薬学部・准教授     (37604)	