

令和 3 年 5 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15953

研究課題名(和文)患者由来気道上皮細胞を用いた閉塞性肺疾患におけるウイルス感染遷延化機序の解明

研究課題名(英文) Evaluation of mechanisms of increases in virus replication in bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

神尾 敬子(花村敬子)(Kan-o, Keiko)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：50813771

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、喫煙により発生する活性酸素が、気道上皮細胞内に熱ショックタンパク質70を増やすことで、ヒトメタニューモウイルスによる感染を長引かせる可能性があること示した。またPI3K阻害剤は、合成2本鎖RNAアナログであるpoly I:C刺激によるマウス肺細胞の免疫チェックポイント分子PD-L1の発現増強を抑制し、過剰な免疫応答を抑制した。さらにPI3K阻害剤は抗ウイルス免疫であるインターフェロン産生を増強することで、気道上皮細胞に感染したヒトメタニューモウイルスの増殖を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前の研究において、慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の気道上皮細胞では健常者と比較してヒトメタニューモウイルス(hMPV)が増殖しやすいことを報告していた。本研究はその機序として活性酸素による熱ショックタンパク質70(Hsp70)の関与を示し、Hsp70阻害剤がCOPD増悪抑制薬・抗hMPV薬となる可能性を示した。またPI3K阻害剤は宿主の抗ウイルス免疫応答(インターフェロン産生)を増強し過剰な免疫応答を抑制することから、気道ウイルス感染症の治療薬となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文): Cigarette smoke exposure induces reactive oxygen species such as H2O2 in bronchial epithelium. We showed that treatment with H2O2 increased replication of human metapneumovirus by inducing heat shock protein 70.

We also showed that PI3Kdelta specific inhibitor suppressed synthetic double-stranded RNA poly I:C-induced the expression of co-inhibitory molecule PD-L1, and production of inflammatory cytokine and chemokines in murine lungs. In addition, PI3Kdelta specific inhibitor enhanced antiviral immune responses, production of type I and type III interferons, and inhibited replication of human metapneumovirus in bronchial epithelium.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：PI3K インターフェロン 抗ウイルス薬 PD-L1 HSP70

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD)や気管支喘息などの閉塞性肺疾患の病態進行には、気道感染による増悪が関与する。主要な増悪原因ウイルスの一つであるRSウイルスは、安定期COPD患者の気道に持続感染し、宿主の肺機能悪化を招くことが他の研究者より報告されている。そのRSウイルスの類縁であり、2001年に同定されたヒト・メタニューモウイルス (hMPV)もまた、閉塞性肺疾患の主要な増悪原因ウイルスであることを申請者は報告した (Rudd, Kan-o et al. *Clin Sci* 2017)。さらに申請者は、COPD患者由来の初代培養気道上皮細胞 (primary bronchial epithelial cells: PBEC) ではhMPVの増殖が亢進し、感染が遷延化することを明らかにした (Kan-o et al. *J Infect Dis* 2017)。しかしながら、閉塞性肺疾患患者において、病態進行を促進するウイルス感染遷延化の分子メカニズムは全く不明である。

## 2. 研究の目的

未だ不明な点が多いウイルス感染遷延化の分子メカニズムを学術的な「問い」とし、**患者由来PBEC**を用いて、ウイルス感染遷延の原因となる**疾患特異的な宿主因子**を同定することを目的とする。熱ショックタンパク質 (HSP)90/HSP70は、hMPVが属するパラミキソウイルスの感染初期の増殖に必須であることが報告されている。重喫煙者が多いCOPD患者では血清中HSP70濃度が上昇していることが知られており、**HSP70**に着目した。またウイルス感染時に気道上皮に発現するPD-L1は、感染中期以後の抗ウイルス免疫を強く抑制する分子として知られているため、もう一つの疾患特異的宿主因子の候補として**PD-L1**に関して検討する。

## 3. 研究の方法

### **活性酸素により発生するHSP70に関連する研究項目**

#### **COPDまたは健常人由来PBECにおけるHSP90/HSP70発現の解析**

hMPV感染前後の各PBECの細胞内蛋白質抽出し比較を行う。HSP90/HSP70の蛋白質量をELISA法により用いて測定し、比較する。

#### **健常人由来PBECに活性酸素処置後のHSP90/HSP70遺伝子発現変化の解析**

喫煙は気道・肺に活性酸素を強力に誘導することが知られている。そこで健常人由来PBECに活性酸素H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>または非細胞毒性のHSP誘導剤geranylgeranylacetone (GGA)を処置し、HSP70とHSP90の遺伝子発現をreal-time PCR法を用いて測定する。

#### **健常人由来PBECにHSP90/HSP70を強発現させた際のhMPV増殖能の解析**

健常人由来PBECにGGAまたはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を処置後にhMPVを感染させ、ウイルス増殖能を解析、比較する。ウイルス増殖能に関しては、hMPV nucleocapsid protein (hMPV N) 遺伝子発現量をreal-time PCR法により測定する。

#### **hMPVの増殖とHSP90/HSP70との関連性の解析**

健常人由来PBECにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を処置あり・なしののちhMPVを感染させ、直後にVER155008 (HSP70阻害剤)を培養液中に添加する。感染後のhMPV N 遺伝子発現量をreal-time PCR法により測定、比較する

### **PD-L1に関連する研究項目**

#### **PI3-kinase-δ阻害薬によるPBEC上のPD-L1発現量および免疫応答の変化の解析**

申請者は、ウイルス 2 本鎖 RNA アナログ poly I:C による培養気道上皮上の PD-L1 発現増強が、PI3-kinase- $\delta$  阻害薬により抑制されることを以前に報告した。そこで健常人由来 PBEC に IC87114 (PI3-kinase- $\delta$  阻害薬)を前処置後に poly I:C 刺激または hMPV を感染させ、24 時間後の PD-L1 発現量の変化を flow cytometry を用いて解析する。また、上清中の抗ウイルス免疫応答 (インターフェロン: IFN)、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生の変化を ELISA 法にて測定する。

#### PBEC に hMPV 感染させた際の、PI3-kinase- $\delta$ 阻害薬による hMPV 増殖能の変化の解析

健常人由来 PBEC に PI3-kinase- $\delta$  阻害薬前処置あり・なしののち、GFP 発現 hMPV を感染させ蛍光顕微鏡で観察する。また hMPV N 遺伝子発現量を real-time PCR 法により測定する。

#### マウスの poly I:C を経気道投与した際の、PI3-kinase- $\delta$ 阻害薬がマウス細胞気道上皮を含む肺細胞上の PD-L1 発現および免疫応答に与える影響の解析

マウスに PI3-kinase- $\delta$  阻害薬を経気道投与ののち poly I:C を経気道投与し、24 時間後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) と肺を回収する。肺はシングルセルとし、気道上皮細胞・好中球・マクロファージ・リンパ球上の PD-L1 の発現を flow cytometry を用いて解析する。BALF 中の総細胞数・細胞分画を測定する。BALF 中の抗ウイルス免疫応答 (インターフェロン: IFN)、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生の変化を ELISA 法にて測定する。

### 4. 研究成果

#### 活性酸素により発生する HSP70 に関連する研究項目

##### COPD または健常人由来 PBEC における HSP70 発現の解析

COPD 由来 PBEC の細胞中の HSP70 濃度は、hMPV 感染前後ともに健常者と比較し有意に上昇を認めた。上清中の HSP70 濃度は、感染前については COPD 由来のもので健常人由来よりも上昇を認めた。感染により、COPD 上清中の HSP70 濃度は有意に低下した。

##### 健常人由来 PBEC に活性酸素処置した際の HSP90/HSP70 遺伝子発現変化の解析

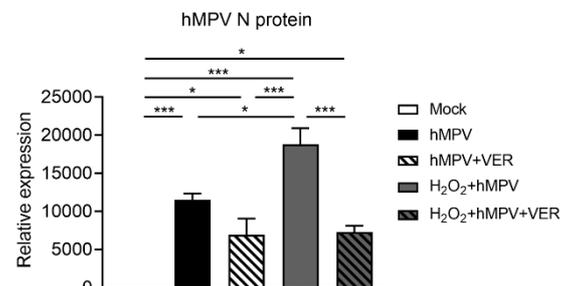
GGA 処置 2 時間後に HSP90 遺伝子発現の上昇を認め、HSP70 遺伝子発現は変化しなかった。一方、 $H_2O_2$  処置 2 時間後には HSP90 遺伝子発現は変化なく、HSP70 遺伝子発現の有意な上昇を認めた。

##### 健常人由来 PBEC に HSP90/HSP70 を強発現させた際の hMPV 増殖能の解析

感染 48 時間後に、 $H_2O_2$  処置群では未処置群・GGA 処置と比較し hMPV N 遺伝子発現の増加を認めた。

##### hMPV の増殖と HSP70 との関連性の解析

VER155008 は、 $H_2O_2$  処置による hMPV N 遺伝子発現の増加を抑制した (右図)。

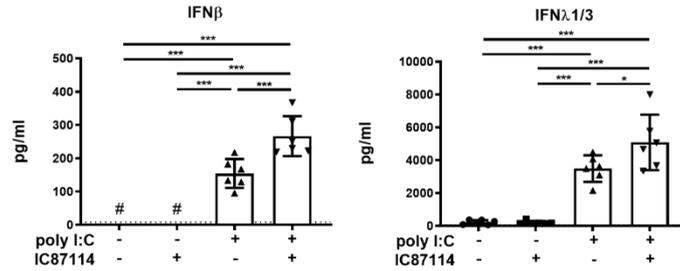


#### PD-L1 に関連する研究項目

##### PI3-kinase- $\delta$ 阻害薬による PBEC 上の PD-L1 発現量および免疫応答の変化の解析

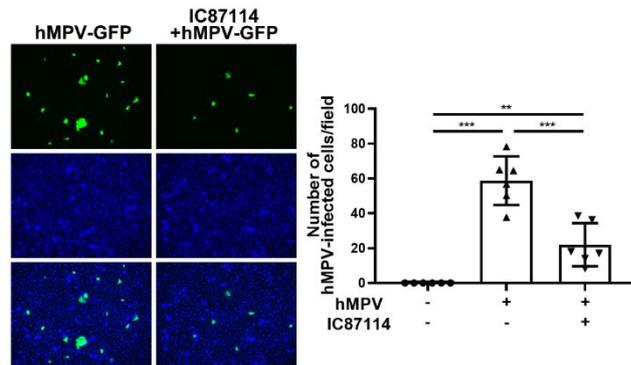
PI3-kinase- $\delta$  阻害薬は poly I:C 刺激または hMPV 感染による PD-L1 発現上昇をそれぞれ 24

時間後と 48 時間後に抑制した。PI3-kinase- $\delta$  阻害薬は poly I:C 刺激による 24 時間後の上清中の IL-6・IL-8 産生を抑制し、一方 IFN 産生を増強した (下図)。



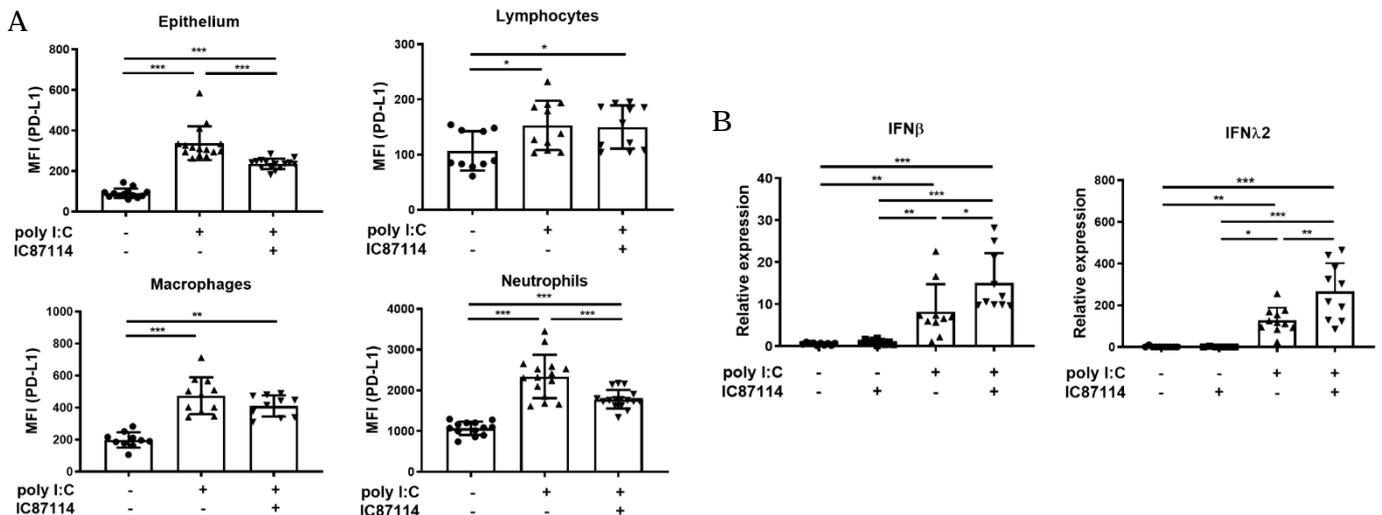
### PBEC に hMPV 感染させた際の、PI3-kinase- $\delta$ 阻害薬による hMPV 増殖能の変化の解析

PI3-kinase- $\delta$  阻害薬は感染 36 時間・48 時間後の hMPV N 遺伝子発現量を阻害剤前処置無し群と比較し減少させた。また PI3-kinase- $\delta$  阻害薬は感染細胞数を減少させた (下図)。



### マウスの poly I:C を経気道投与した際の、PI3-kinase- $\delta$ 阻害薬がマウス細胞気道上皮を含む肺細胞上の PD-L1 発現および免疫応答に与える影響の解析

PI3-kinase- $\delta$  阻害薬は poly I:C 投与 24 時間後の気道上皮細胞・マクロファージ・好中球上の PD-L1 の発現上昇を抑制した (図 A)。BALF 中の総細胞数・マクロファージ・好中球リンパ球数は PI3-kinase- $\delta$  阻害薬により減少した。BALF 中の KC・IL-6・MIP-1 $\beta$  産生は PI3-kinase- $\delta$  阻害薬により減少した。一方で、BALF 中の IFN 産生を増強した (図 B)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujita Akitaka, Kan-o Keiko, Tonai Ken, Yamamoto Norio, Ogawa Tomohiro, Fukuyama Satoru, Nakanishi Yoichi, Matsumoto Koichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of PI3K Enhances Poly I:C-Induced Antiviral Responses and Inhibits Replication of Human Metapneumovirus in Murine Lungs and Human Bronchial Epithelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.00432	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 0件）

1. 発表者名 神尾 敬子
2. 発表標題 ヒトメタニューモウイルス感染症における疾患特異的宿主因子の解明：慢性閉塞性肺疾患とheat shock protein 70
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神尾 敬子
2. 発表標題 Enhanced replication of human metapneumovirus in primary cells from chronic obstructive pulmonary disease
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神尾 敬子
2. 発表標題 COPD・気管支喘息の増悪とヒトメタニューモウイルス
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------