

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ～ 2010
課題番号：	20591211
研究課題名(和文)	エンテロウイルス感染マーカーとしてのMDA-5発現に関する研究
研究課題名(英文)	The role of melanoma differentiation associated gene-5 in enteroviruses infection.
研究代表者	
浮村 聡	(Ukimura Akira)
大阪医科大学・医学部・教授	
研究者番号：	50257862

研究成果の概要(和文)：エンテロウイルスは心筋炎や拡張型心筋症の重要な病因ウイルスであるが、細胞内複製時の二本鎖 RNA が MDA-5 で特異的に認識される。エンテロウイルス感染に特異的な MDA-5 mRNA 量はマウスのコクサッキーウイルス性心筋炎組織及び膵炎組織で増加、MDA-5/RIG-I 比が上昇していた。ヒトの拡張型心筋症患者でエンテロウイルスゲノムが陽性の切除心筋組織においても MDA-5/RIG-I 比が上昇していた。MDA-5/RIG-I 比がエンテロウイルス感染のマーカーとして応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Enteroviruses (EV) have been implicated in the pathogenesis of DCM and myocarditis. MDA-5 expression increased in cultured cells infected with coxsackievirus B3 (CVB3). Expression of mRNA of MDA5, IL-6 and IFN- γ increased in murine heart tissues infected with CVB3, and the ratio of MDA-5/RIG-I also increased. MDA-5 mRNA expression in the myocardium of EV-Positive-DCM patients is significantly higher than EV-Negative-DCM patients. The ratio of MDA-5/RIG-I in the myocardium of EV-Positive-DCM patients is significantly higher than EV-Negative-DCM patients. MDA-5 mRNA over expression or increased MDA-5/RIG-I ratio should be a marker of active replication of EV infection in DCM patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：コクサッキーウイルス

1. 研究開始当初の背景

エンテロウイルスは+鎖の一本鎖 RNA ウィルスであるが、細胞内で増殖する際に二本鎖 RNA を形成し、この細胞内の二本鎖 RNA を認識するのは RIG-1(Retinoic acid-inducible

gene-1)やMDA-5(melanoma differentiation associated gene 5)と考えられる。RIG-1とMDA-5はヘリカーゼ領域を持つ細胞質内タンパク質で、構造が似ており、ヘリカーゼ領域

を介して二本鎖 RNA を認識し、細胞内に情報を伝達し、インターフェロンなどの産生を促し、感染防御反応を引き起こす。エンテロウイルスを含むピコルナウイルスは MDA-5 のみを誘導し、インフルエンザなどの RNA ウイルスでは RIG-I を誘導することが報告された。また MDA5 欠損マウスはピコルナウイルス感染に対し易感染性である。

2. 研究の目的

エンテロウイルスはヒト心筋炎のみならず、拡張型心筋症の重要な病因ウイルスでもある。近年エンテロウイルス感染は心筋組織からのウイルスゲノムの RT-PCR により証明されるようになったが、ウイルス複製の証明には+鎖と-鎖それぞれのプライマーを用いた逆転写による PCR が必要であり、手技が煩雑である。本研究の目的はエンテロウイルスの細胞内での複製時にみられる二本鎖ウイルス RNA を認識する MDA-5 の解析により、ランダムプライマーを用いた cDNA を用いたより単純化した過程での PCR によりウイルス複製の傍証を得られるか否かを検討することにある。また他のウイルスを認識する RIG-I も同時に検討し、MDA-5/RIG-I 比率上昇がエンテロウイルス感染のマーカーとなりうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

培養細胞を用いた検討：HeLa 細胞、マウス胎児心筋細胞を用い、コクサッキーウイルス B 群を感染させ、MDA-5, RIG-I の mRNA の定量、MDA-5/RIG-I の比について検討する。また炎症性サイトカインに関する検討を行う。

マウス実験的心筋炎モデルを用いた検討：心筋炎が遷延するとされる A/J マウスにコクサッキーウイルス B3 (Nancy 株) を腹腔内接種し、心筋炎を惹起させる。急性期、亜急性期、慢性期に心臓、脾臓の組織を採取し、各組織における MDA-5, RIG-I、炎症性サイトカイン、

接着因子、酸化ストレスマーカーの mRNA の定量、MDA-5/RIG-I 比について検討する。またウイルス抗体価の測定、ならびにウイルス RNA の定量的 PCR を行い、炎症性サイトカインや接着因との関連や病態の時間的経過に関する検討を行う。インフルエンザ感染心筋炎モデルとの対比の検討も行う。

またこのウイルス性心筋炎モデルにおける炎症性反応による心筋障害に対するレニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAS) 系の関与を検討するためアルドステロン拮抗薬の効果について検討する。酸化ストレスの心機能に対する影響については間欠的低酸素モデルを用いた検討も行う。

ヒト拡張型心筋症患者における検討：重症の拡張型心筋症患者の心筋部分切除術後の凍結切除心筋を用いて検討する。これらから得た cDNA を用いて検討する。汎エンテロウイルス検出用のプライマーを用いたエンテロウイルスゲノムの検出、MDA-5、RIG-I、炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーの mRNA の検討を定量的に行う。心障害に対するサイトカインの関与と TH1/TH2 バランスについて心サルコイドーシスと拡張型心筋症の比較検討も行う。

また拡張型心筋症患者をエンテロウイルス感染陽性と陰性で 2 群に分け、2 群間で MDA-5 発現量および MDA-5/RIG-I の比に差がないかどうか検討する。虚血性心疾患の患者心筋を対照とする。さらに 1 型糖尿病と関連するとされる MDA-5 の exon 3 の SNP (nsSNP1990760 A→G) が、拡張型心筋症におけるエンテロウイルス持続感染と mda-5 の SNP とに関連がないかを検討する。

また人の新型インフルエンザ心筋炎の観察研究によりエンテロウイルス感染とインフルエンザ感染による心筋炎の病像について対比、検討する。

4. 研究成果

コクサッキーウイルス感染培養細胞では MDA-5, RIG-I の mRNA は増加し、MDA-5/RIG-I の比は上昇していた。コクサッキーB3 感染モデルマウスの心筋組織ならびに膵臓組織では非感染組織と比較して MDA-5, RIG-I の mRNA は増加し、MDA-5/RIG-I の比は上昇していた。接種 18 日以降はウイルス分離法ではウイルスは分離されないが、A/J マウスではそれ以降でもウイルス RNA は RT-PCR により+鎖、-鎖ともに検出され微量なウイルスが心筋に存在していた。MDA-5, RIG-I の mRNA はこうした通常ウイルスが分離されない時期にも増加また MDA-5/RIG-I の比も上昇していた。また心筋組織では炎症性サイトカインや接着因子の mRNA 量が増加し、これらは免疫組織学的検討によっても確認された。

このマウス心筋炎モデルに対してアルドステロン拮抗薬は致死率の改善、心臓超音波検査での心収縮力の改善、各種炎症性サイトカインや接着因子の mRNA 量の増加を抑制するなど有効であった。アルドステロン拮抗薬によって心筋組織内のウイルス量には有意差はなく抗炎症作用がその機序と考えられた。また RAS 系抑制薬は間欠性低酸素モデルにおける心リモデリングの抑制にも有効であった。

拡張型心筋症患者の心筋組織においては炎症性サイトカイン mRNA 量が増加し、IL10 の発現量がその予後と関連する可能性が示された。また心サルコイドーシスでは特に TH1 サイトカイン発現量が非常に多いことが示された。

今回用いた拡張型心筋症患者の心筋組織から RT-PCR によりエンテロウイルスは 70 例中 21 例で陽性で 49 例で陰性であった。これらの一部ではエンテロウイルスの+鎖、-鎖両方が陽性であり、ウイルスが複製されている

と考えられるが、これらの凍結心筋組織からもウイルス分離は行い得なかった。

拡張型心筋症患者でエンテロウイルス陽性の心筋組織では、非感染組織と比較して MDA-5/RIG-I 比が高く、MDA-5/RIG-I 比がエンテロウイルス持続感染のマーカーである可能性を示した。(図 1、2) これらにより、心筋組織におけるエンテロウイルス複製の証明の方法としてランダムプライマーにより逆転写した cDNA からの PCR によっても検討が行うる可能性が示された。

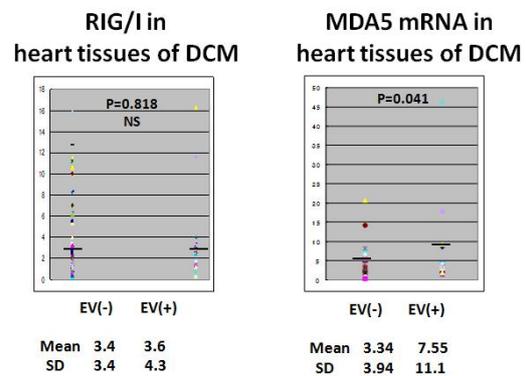


図 1. エンテロウイルス陽性と陰性の拡張型心筋症患者の心筋組織における MDA-5mRNA と RIG-ImRNA 定量

MDA5/RIG-I in heart tissues of DCM

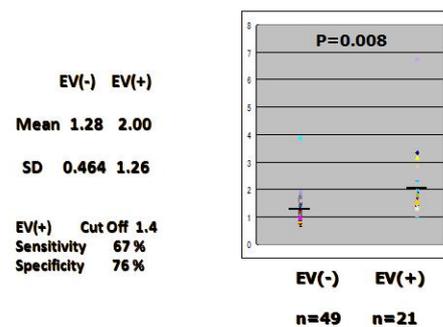


図 2. 拡張型心筋症患者の心筋組織におけるエンテロウイルス陽性患者と陰性患者の MDA-5mRNA/RIG-ImRNA 比 MDA-5 の exon 3 の SNP (nsSNP1990760 A→G) と、拡張型心筋症におけるエンテロウイルス持続感染の有無と SNP について関連性は認められなかった。これは検討症例数が少ないことも関連している可能性がある。

2009年のインフルエンザAH1N1(2009) pdmによるパンデミックに際し、インフルエンザ心筋炎の全国臨床観察研究を行った。人の心筋炎の報告は季節性インフルエンザでは稀であるのに対して今回のパンデミックにおいて15例の重症の心筋炎の報告が得られその臨床像の多様性、抗ノイラミニダーゼ薬の有効性、重症例における体外補助循環の必要性を検討した。体外循環を要する患者の救命率が80%と良好でこれには抗インフルエンザ薬の投与が関与した可能性が示された。また心筋生検組織では臨床的な重症度に比して組織学的変化が比較的軽度であった。

またマウスのコクサッキーウイルス性心筋炎とマウスのインフルエンザウイルス性心筋炎の対比では、明らかにインフルエンザ感染での病変は限局的であった。これにはウイルスの心筋細胞との親和性が関与していると考えられる。

以上より、1. エンテロウイルスは心筋炎における重要なウイルスと考えられる。2. エンテロウイルス感染時の心筋障害においては炎症反応、酸化ストレスが重要と考えられる。3. MDA-5mRNA量はマウスのコクサッキーウイルス性心筋炎組織及びヒトの拡張型心筋症患者でエンテロウイルスゲノムが陽性の切除心筋組織において増加し、MDA-5/RIG-I比も上昇する。これらが本研究で示され、MDA-5/RIG-I比がエンテロウイルス感染のマーカーとして応用できる可能性が示された。

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10件)

1. 浮村 聡、神崎裕美子、出口寛文；インフルエンザ感染と心筋炎；呼吸と循環、査読無、第59巻第4号401-408. 2011
2. Ukimura A, Izumi T, Matsumori A; A

national survey on myocarditis associated with the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Japan. ; Clinical Research Committee on Myocarditis Associated with 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic in Japan organized by Japanese Circulation Society. Circ J. 査読有 Oct;74(10):2193-9. 2010

3. 浮村 聡、神崎裕美子、出口寛文；インフルエンザA(H1N1)心筋炎；査読無、総合臨床、第59巻第8号1776-1781. 2010
4. 浮村 聡、神崎裕美子；心疾患とインフルエンザ；ハートナーシング、査読無、第23巻第10号92-94. 2010
5. Miyamura M, Schnell O, Yamashita C, Yoshioka T, Matsumoto C, Mori T, Ukimura A, Kitaura Y, Matsumura Y, Ishizaka N, Hayashi T. Effects of acarbose on the acceleration of postprandial hyperglycemia-induced pathological changes induced by intermittent hypoxia in lean mice. 査読有、J Pharmacol Sci. ;114(1):32-40. 2010
6. Inamoto S, Yoshioka T, Yamashita C, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Matsumoto C, Matsumura Y, Kitaura Y, Hayashi T. : Pitavastatin reduces oxidative stress and attenuates intermittent hypoxia-induced left ventricular remodeling in lean mice. 査読有、Hypertens Res. ; 33(6): 579-86. 2010
7. Yamashita C, Hayashi T, Mori T, Matsumoto C, Kitada K, Miyamura M, Sohmiya K, Ukimura A, Okada Y, Yoshioka T, Kitaura Y, Matsumura Y. Efficacy of olmesartan and

- nifedipine on recurrent hypoxia-induced left ventricular remodeling in diabetic mice. 査読有、Life Sci.;86(9-10): 322-30.2010
8. Matsumoto C, Hayashi T, Kitada K, Yamashita C, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Ohkita M, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Okada Y, Kitaura Y, Matsumura Y. : Chymase plays an important role in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxia in mice. 査読有、Hypertension.;54(1): 164-71.2009
 9. Terasaki F, Ukimura A, (寺崎とともに二名筆頭著者) Tsukada B, Fujita S, Katashima T, Otsuka K, Otsuka K, Kanzaki Y, Shimomura H, Fujita M, Tanaka T, Kitaura Y. Circ J. ; Enhanced expression of type 1 helper T-cell cytokines in the myocardium of active cardiac sarcoidosis. : 査読有 72(8): 1303-7.2008
 10. 浮村 聡、飯盛章雄、北浦 泰. 感染性心筋炎：日本臨床 別冊、循環器症候群：査読無、81-86,2008

[学会発表] (計 4件)

1. 浮村 聡、飯盛 章雄、: Pleiotropic Effects of Eplerenone on Murine Coxsackievirus B3 Myocarditis
第14回日本心不全学会 東京10月10日、2010
2. A.Ukimura, A.Iimori, Y. Kitaura: Beneficial effects of Eplerenone on Murine Coxsackievirus B3 Myocarditis. European Society of Cardiology: Sep. 2, 2009, Valcerona Spain.
3. A.Ukimura, A.Iimori, Y Kitaura.:The role of MDA-5 in enterovirus persistence in heart tissues of DCM patients. APCC May 20, 2009, Kyoto Japan
4. A.Ukimura, A.Iimori, Y.Kitaura: Over expression of melanoma differentiation associated gene-5 (MDA-5) in heart tissues infected enteroviruses. International Congress of Cardiopathies and Heart Failure., Jun 13, 2008, Toronto Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浮村 聡 (Akira Ukimura)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：50257862

(2) 研究分担者

北浦 泰 (Yasushi Kitaura)
大阪医科大学・名誉教授
研究者番号：50084950