

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20599003

研究課題名（和文）重症呼吸不全における細胞膜イノシトールリン脂質の役割

研究課題名（英文）Role of phosphatidylinositols in the pathogenesis of severe respiratory failure

研究代表者

今井 由美子（IMAI YUMIKO）

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50231163

研究成果の概要（和文）：

H5N1 鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの死亡率は 60%に及び、この高い致死率の原因となっているのは、制御範囲を逸脱した過剰炎症で特徴づけられる急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)である。重症化した患者では、集中治療室(ICU)における人工呼吸をはじめとした集中治療が救命の鍵を握る。これまで、ARDS に対して数多くの治療薬の臨床試験が行われてきたが、大規模な臨床試験で ARDS の予後の改善をみた薬物は未だ無い。一方、イノシトールリン脂質 (PIs)は、細胞膜シグナル伝達分子として機能し、細胞の分化、増殖、運動、小胞輸送などにおいて重要な役割を担っていることが知られている。本研究では、胃液の誤嚥あるいはインフルエンザによって引き起こされるマウス ARDS モデルを用いて、ARDS の発症における PIs 代謝系の役割を検討した。マウス ICU モデルを用いた PIs 代謝関連遺伝子欠損マウスによる解析から、ARDS の発症には PI3P を中心とした PIs パスウェイが重要な役割を果たしていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

The acute respiratory distress syndrome (ARDS), the most severe form of acute lung injury (ALI), is triggered by various pathogenic conditions including sepsis, gastric acid aspiration, trauma, or infection with various viruses (SARS-coronavirus, H5N1 avian influenza, or novel swine-origin 2009 H1N1 influenza). No effective drugs have been proven to improve clinical outcomes in ARDS. Considering its high lethality and the threats of influenza pandemics, it is crucial to identify novel therapeutic targets for ARDS. In the present study, using mouse ICU model system, we examined the role of phosphatidylinositol pathway in the pathogenesis of ARDS. We found that endosomal PIs, in particular class III PI3-kinase was involved in the pathogenesis of ARDS with non-viral and viral origins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	0	1,300,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：救急医学・集中治療

キーワード：集中治療、呼吸不全、ウイルス感染症、細胞膜イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

H5N1鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの死亡率は60%に及び、この高い致死率の原因となっているのは、制御範囲を逸脱した過剰炎症で特徴づけられる急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)である。重症化した患者では、集中治療室(ICU)における人工呼吸をはじめとした集中治療が救命の鍵を握る。これまで、ARDSに対して数多くの治療薬の臨床試験が行われてきたが、大規模な臨床試験でARDSの予後の改善をみた薬物は未だ無い。申請者はこれまでに、マウスICU重症呼吸不全解析系を独自に確立しH5N1インフルエンザウイルスによるARDSの発症に酸化リン脂質が病因として関与していることを見出した。一方、イノシトールリン脂質(PIs)は、細胞膜シグナル伝達分子として機能し、細胞の分化、増殖、運動、小胞輸送などの多彩な生命現象を支えていることが知られている。しかしながら、ARDS、とりわけ、H5N1鳥インフルエンザや新型肺炎(SARS)などの新興ウイルス感染症によって引き起こされるARDSの発症におけるイノシトールリン脂質代謝系の役割に関しては不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、胃液の誤嚥あるいはインフルエンザによって引き起こされる ARDS のマウスモデルを用いて、ARDS 発症における PIs 代謝系の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、PIs リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の全身性あるいは組織特異的遺伝子欠損マウスを用いて、マウス ICU モデル、マウス ARDS モデルを適用して解析を行った。

マウス ICU モデル: 同モデルは、ARDS を起こした患者が ICU で人工呼吸等の治療を受ける状態をマウスで再現したモデルである。マウスに麻酔下に気管切開を行い、気管チューブを挿入し呼吸機能解析システムと連動しているマウス用人工呼吸器に接続し呼吸機能の経時的変化を解析した。合わせて心電図・血圧をモニターした。この状態で気管チューブから、インフルエンザウイルスを投与して急性呼吸不全が誘導されると Δ 圧/ Δ 体積(単位体積当たりの圧変化)で表される「エラスタンス」は経時的に増加し呼吸機能が悪化した。

胃液の誤嚥によるマウス ARDS モデル: 麻酔下のマウスに経気道的に塩酸を投与し、マウス用人工呼吸器に接続して人工呼吸を行な

った。経時的に呼吸機能を測定し、人工呼吸終了後にマウス肺を摘出し、分子生物学的解析ならびに組織学的解析を行った。

インフルエンザウイルスによる ARDS モデル: 麻酔下のマウスに経気道的にインフルエンザウイルスを感染させ、覚醒後通常の飼育を行い、体重の変化、生存率を測定した。合わせて、経時的に呼吸機能解析、ウイルス価の測定、分子生物学的解析ならびに組織学的解析を行った。

in vitro 細胞生物学的解析: マウスから単離したマクロファージおよび好中球を用いて細胞生物学的解析を行った。マクロファージおよび好中球は、マウス骨髄、チオグリコレート処理したマウスの腹腔洗浄、肺洗浄、ならびに肺組織のコラジェナーゼ処理で採取した。単離した細胞に、インフルエンザウイルスを感染あるいはウイルス関連物質で刺激し、ウイルス増殖能、サイトカイン産生、ROS 産生、細胞遊走活性等を測定した。

4. 研究成果

①マクロファージおよび好中球特異的 Class III PI3-kinase VPS34 欠損(VPS34 LyM-cre) マウスを作製した。②VPS34 LyM-cre マウスはコントロール状態では特別な異常を認めなかった。③マウス ICU モデルにおいて、経気道的に塩酸(胃酸誤嚥による ARDS モデル)あるいは、インフルエンザウイルス(ウイルス感染による ARDS モデル)を投与し、呼吸機能解析システムで呼吸機能の経時的変化を解析した。同遺伝子欠損マウスでは呼吸機能、エラスタンスの悪化が認められた。④ARDS モデルを用いて肺病理所見、サイトカイン等の発現変化等を経時的に解析した。さらに肺組織を用いて遺伝子発現解析を行った。⑤VPS34 LyM-cre マウスから単離したマクロファージあるいは好中球をインフルエンザウイルスで刺激すると炎症性サイトカインの産生の増加を認めた。

これらの結果から ARDS の発症には PI3P を中心とした PIs パスウェイ、とくに Class III PI3-kinase が重要な役割を果たしていることが示唆された。

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 16 件)

①Kuba K, Imai Y, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a

partner for amino acid transporters. *Pharmacol Ther.* 128(1):119-28. (2010) (査読有)

②Neely GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmén L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NN, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Kogelgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks AA, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM. A global in vivo *Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell.* 141(1):142-53. (2010) (査読有)

③Haubner BJ, Neely GG, Voelkl JG, Damilano F, Kuba K, Imai Y, Komnenovic V, Mayr A, Pachinger O, Hirsch E, Penninger JM, Metzler B. PI3Kgamma protects from myocardial ischemia and reperfusion injury through a kinase-independent pathway. *PLoS One.* 22;5(2):e9350. (2010) (査読有)

④Imai Y, Kuba K, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ J.* 74(3):405-10. (2010) (査読有)

⑤Imai Y. Further advances in immunity against highly pathogenic influenza viruses. *European Infectious Disease.* 3(1):61-4.(2009) (査読有)

⑥Oudit GY, Imai Y, Kuba K, Scholey JW, Penninger JM. The role of ACE2 in pulmonary diseases--relevance for the nephrologist. *24(5):1362-5.*(2009) (査読有)

⑦Imai Y, Kuba K, Penninger JM. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. *Exp Physiol.* 93(5):543-8. (2008) (査読有)

⑧Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, Ermolaeva M, Veldhuizen R, Leung YH, Wang H, Liu H, Sun Y, Pasparakis M, Kopf M, Mech C, Bavari S, Peiris JS, Slutsky AS, Akira S, Hultqvist M, Holmdahl R, Nicholls J, Jiang C, Binder CJ, Penninger JM. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell.* 18;133(2):235-49.(2008) (査読有)

⑨今井由美子. ARDS 発症機序解明の新たな展開 最新医学 66:505-510.(2010) (査読無)

⑩今井由美子他. 宿主システムからのウイルス病原性発現機構解明へのアプローチ 実験医学 28:2924-26.(2010) (査読無)

⑪今井由美子他. 新興ウイルス感染症における ARDS 発症、重症化の分子機構 実験医学 28: 2934-39.(2010) (査読無)

⑫今井由美子. 新型インフルエンザによる LI/ARDS の特徴は？ 救急・集中治療 22: 1114-1119.(2010) (査読無)

⑬今井由美子. 重症型インフルエンザの病態生理 人工呼吸 27: 62-69.(2010) (査読無)

⑭今井由美子他. ACE2 と呼吸器疾患 呼吸 9: 1070-1074.(2010) (査読無)

⑮今井由美子他. 新型インフルエンザと acute respiratory distress syndrome (ARDS) 日本集中治療医学会誌 17:11-17.(2010) (査読有)

⑯今井由美子他. インフルエンザによる呼吸不全の発症機構 細胞 41(14):8-11.(2009) (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

①Yumiko Imai. The role of TLR4 in influenza pathogenesis and ACE2 interventional therapy. Gordon conference satellite symposium; Mechanisms of lung injury and immunomodulator interventions in influenza (招待講演) 2010年3月5日 Ventura, USA

②Yumiko Imai. The role of ACE2 in the pathogenesis of ALI: a therapeutic perspective. Korean Critical Care Medicine (招待講演) 2009年4月26日 Soul, Korea

③Yumiko Imai. Molecular pathogenesis of respiratory failure in influenza. BMB2010 Biochemistry and Molecular Biology (シンポジウム) 2010年12月7日 神戸

④Yumiko Imai. Hyper-response of innate immune system triggered by oxidative stress and oxidized phospholipids controls the severity of acute lung injury. Keystone symposia 2010年6月8日 京都

⑤ Yumiko Imai. Acute lung injury (ALI)/ARDS mediated by emerging respiratory virus infection. HKU-PASTEUR IMMUNOLOGY COURSE (招待講演) 2010年11月5日 Hong Kong

⑥ 今井 由美子. インフルエンザによる重症呼吸不全の病態 集中治療学会近畿地方会 (招待講演) 2010年6月22日 大阪

⑦ 今井 由美子. 新型インフルエンザ 呼吸療法医学会 (招待講演) 2010年7月24日 東京

⑧ 今井 由美子. 脂質メタボロミクスからみえてきたインフルエンザ重症化機構 適応医学会 (招待講演) 2010年7月2日 東京

⑨ 今井 由美子. インフルエンザによる呼吸不全の病態と治療戦略 日本麻酔科学会 (招待講演) 2009年6月3日 福岡

[図書] (計 1件)

① Valenza F, Frank JA, Imai Y, Slutsky AS. Pathogenesis of Ventilator-Induced Lung Injury, Physiological Basis of Ventilatory Support (Marcel Dekker Inc.) 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 由美子 (IMAI YUMIKO)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50231163

(2) 連携研究者

佐々木 雄彦 (SASAKI TAKEHIKO)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50333365

佐々木 純子 (SASAKI JUNKO)
秋田大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30333371

高須賀 俊輔 (TAKASUGA SHUNSUKE)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90375262

江口 賢史 (EGUCHI SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70457117

樗木 俊聡 (OHTEKI TOSHIAKI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：50233200