

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16860

研究課題名（和文）新生児慢性肺疾患患児のRSV感染重症化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of aggravation of RSV infection in patients with neonatal chronic lung disease

研究代表者

宮崎 恭平（Miyazaki, Kyohei）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70769497

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）：新生児慢性肺疾患（CLD）は未熟児の重篤な合併症の一つで、酸素暴露、人工呼吸器、炎症などに伴い発症する。RSウイルス（RSV）は乳幼児に感染すると肺炎や気管支炎を起こすウイルスである。CLD児はRSV感染による重症化のハイリスクとされているが、その病態メカニズムについては明らかになっていない。本研究では高濃度酸素暴露CLDマウスモデルを用い、RSV感染をさせることにより、CLDマウスでは感染後の体重減少が著しく、また、感染後の肺組織中の炎症性サイトカインやmiRNAの上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肺疾患（CLD）は、日齢28を超えても呼吸サポートが必要な、未熟児にとって重篤な合併症の一つで、酸素暴露、人工呼吸器、および炎症などにより引き起こされる。超低出生体重児のうち約30%が重症CLDに至り、CLD児は精神運動発達遅滞の合併率が高い。RSVは乳幼児に感染すると肺炎や細気管支炎などを引き起こす、最も頻度の高い原因ウイルスの一つで、早産児や、CLD児、先天性心疾患をもつ児はRSV感染症が重症化しやすく、これらの児が感染するとそのうちの10%以上が入院加療を要する。重症化のメカニズムは解明されておらず、それが解明されれば、予防法や治療法につながる知見となり、早産児の予後向上に寄与する。

研究成果の概要（英文）：Neonatal chronic lung disease (CLD) is one of the serious complications in premature infants and develops as a result of exposures to high concentration of oxygen, mechanical ventilation, and inflammation. Respiratory syncytial virus (RSV) is a virus that causes pneumonia and bronchitis in infants. CLD infants are considered to be at high risk of aggravation due to RSV infection, but the pathophysiological mechanism has not been elucidated. In this study, we used a CLD mouse model exposed to high concentrations of oxygen, and by infecting with RSV, CLD mice showed significant weight loss after infection and an increase in inflammatory cytokines and miRNA in lung tissue after infection

研究分野：周産期

キーワード：慢性肺疾患 RSVウイルス 高濃度酸素暴露 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性肺疾患 (Chronic Lung Disease; CLD) は、日齢 28 を超えても呼吸窮迫症状が持続する、未熟児にとって重篤な合併症の 1 つである。酸素暴露、人工呼吸器、および炎症などにより引き起こされる肺組織損傷と線維化および肺胞の発達遅延が本症の本体である。約 30% の超低出生体重児が重症 CLD に至り、精神運動発達遅滞の合併率が高い。一方、RS ウイルス (Respiratory Syncytial Virus; RSV) は乳幼児に感染すると肺炎や細気管支炎などを引き起こす、最も頻度の高い原因ウイルスの一つで、ほとんど全ての児が 2 歳までに罹患するとされているが繰り返し感染する。特に、早産児や、CLD 児、先天性心疾患をもつ児は RSV 感染症が重症化しやすく、これらの児が感染するとそのうちの 10% 以上が入院加療を要する。これまで、ヒト検体を用いた臨床研究や RSV 感染モデルを用いた基礎研究が行われてきたが、CLD 児などのハイリスク児が RSV 感染後に重症化するメカニズムや反復性の喘鳴を来すメカニズムについては明らかになっていない。マイクロ RNA (miRNA) は 18-25 塩基長の一本鎖 RNA で、標的メッセンジャー RNA (mRNA) の翻訳や安定性を抑制することで、発生、細胞増殖、炎症など様々な生命現象を制御している。これまで miRNA はウイルスゲノムを抑制したり、宿主の抗ウイルス作用をもつ遺伝子の調節などを介したりすることで、ウイルス感染症に対する治療標的になり得ることが示されてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CLD+RSV 感染モデルマウス肺の発症に関わる標的マイクロ RNA (miRNA) を同定すること。In vitro で、標的 miRNA の抑制剤や促進剤を投与し、RSV 感染に対する効果を検証すること。RSV 感染児の気道吸引物中の miRNA 発現解析を行い、RSV 発症や重症化予測のバイオマーカーになるかを検証することである。

3. 研究の方法

CLD+RSV 感染モデルの作製

Balb/c マウスの雌雄を交配し、生後 12 時間以内の仔マウスを、母マウスと共に高濃度酸素チャンパー (FiO₂ 0.95) に 7 日間暴露し、非暴露群をコントロールとする。酸素暴露後はルームエアで管理し、生後 35 日の時点でマウスを鎮静後、 1×10^8 pfu (plaque forming unit) / mL の RSV 抗原液 10 μ L を経鼻的に感染させる。コントロール + RSV 感染群、コントロール + RSV 非感染群、CLD+RSV 感染群、CLD+RSV 非感染群の 4 群に分けて、生理学的評価、分子生物学的評価、組織学的評価を行う。

生理学的評価

マウスの体重変化や、非侵襲性無拘束呼吸機能解析装置 (BUXCO) で一回換気量、呼吸数、および気道抵抗などの呼吸機能を連日評価し、感染が成立していることを確認する。

マウス肺からの total RNA 抽出

マウスの右肺は採取後直ちに RNA 保存試薬に浸漬し、左肺は RSV のウイルス量測定と組織標本に用いる。RNA 抽出には mirVana miRNA Isolation kit (Thermo fisher scientific) を用いる。

CLD + RSV 感染マウスにおける標的 miRNA の同定 抽出した total RNA を用いて miRNA 発現解析を行う。miRNA Array 解析には TaqMan Low Density Array Card(Thermo fisher scientific)を用いて、CLD + RSV 感染群で特異的に変化する miRNA を同定する。

4 . 研究成果

慢性肺疾患マウスモデルに RSV を感染させ、慢性肺疾患マウスの RSV 感染モデルを作成し、感染後の体重変化と炎症反応を検討した。生後 12 時間以内の BALB/c 新生児マウスを大気下と 95%酸素下に 7 日間暴露し、コントロールマウス、慢性肺疾患マウスを作成した。それらを 5 -6 週令まで飼育した。RSV A2 株を Hep-2 細胞で培養し、-80 °C 保存しておいたものを使用し、 1×10^8 pfu/mL の RSV を 10uL 経鼻的に感染させた。連日体重を測定し、コントロール群と CLD 群で比較した。感染後 2、4、6 日のマウスから肺を採取し、mirVANA-microRNA isolation kit を用いて RNA を抽出した。定量的 PCR 法を用いて、IL-1、IL-5、IL-6、IL-17a、IL-33、IFN- γ 、MCP-1 mRNA を測定した。コントロールに比べ、CLD 群で感染後 1、2 日目の体重が有意に低下した。また、コントロールに比べ、CLD 群で IL-1、IL-6、IL-17a、IFN- γ が感染後 2、4 で増加していた。本研究では RSV 感染により、CLD モデルでは炎症反応が増強していることが明らかになった。引き続き、CLD マウスモデルでの RSV 感染重症化メカニズムの解明へむけて、研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 郷勇人
2. 発表標題 Neonatal hyperoxia enhances inflammatory response in mice lung infected with respiratory syncytial virus.
3. 学会等名 PAS meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------