

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390306

研究課題名（和文） ウイルス感染に対するスタチン系薬作用の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Determining molecular mechanisms of statin regulatory effects on host and viral responses in the infections

研究代表者

高橋 孝（TAKAHASHI TAKASHI）

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：00292855

研究成果の概要（和文）：ウイルス（ヒトサイトメガロウイルスやインフルエンザウイルス）感染の細胞実験を通じて、スタチン系薬（mevastatin/lovastatin/simvastatin/pravastatin）が呈する作用（ウイルス複製の抑制・宿主応答の調節）に関わる宿主由来あるいはウイルス由来の分子（転写物⇒マイクロ RNA⇒翻訳物）を推定した。さらに、臨床研究・動物実験によりインフルエンザにおける宿主アポリポ蛋白質 E の役割とスタチン効果との関連性を検証した。

研究成果の概要（英文）：We determined host or viral molecules (transcripts, microRNAs, and translates) contributing to statin (mevastatin, lovastatin, simvastatin, or pravastatin)-induced regulatory effects on host responses and viral replications using *in vitro* infections with human cytomegalovirus or influenza virus. Association of apolipoprotein E genotypes with influenza susceptibility was also examined with benefit of statin-intervention before infection using clinical and animal investigations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：感染症学

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：ウイルス・感染症・脂質・免疫学・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) HMG-CoA 還元酵素阻害薬として高コレステロール血症の治療薬として診療現場で汎用されているスタチン系薬（mevastatin）は、遠藤章博士（東京農工大特別名誉教授）が *Penicillium citrinum* より発見した薬物である。同薬に関しては抗炎症作用や免疫調節機構といった副次的効果も報告されており、様々な分野への応用が期待されている。くわえて、同薬についてはポリオウイルス・ヒト

免疫不全ウイルス・C型肝炎ウイルスの複製を抑制するといった抗ウイルス作用も発見されている。

(2) 本研究代表者は、「ウイルス感染症におけるスタチン系薬の宿主応答作用と抗ウイルス作用の解明」（基盤研究C・平成19年度～20年度）の研究課題を実施する中で、以下のような知見が得られた。

① 肥満マウスのウイルス性心筋炎に対するスタチン系薬の生存率改善および腹腔内

マクロファージ機能の調節作用

② ヒトサイトメガロウイルス (hCMV) に対するスタチン系薬の抗ウイルス効果

③ ヒトメタニューモウイルスの感受性と宿主アポリポ蛋白質 E(ApoE)の遺伝子型との関連性であり、スタチンは宿主応答の調節作用と抗ウイルス効果の両面を有することが判明した。スタチンが保有するこのような宿主応答の調節やウイルス複製の抑制が発現するメカニズムを分子レベル、即ち、遺伝子/転写物⇒マイクロ RNA(miRNA)⇒翻訳物(発現蛋白質)レベルで解明したいとの着想から本研究を計画するに到った。

2. 研究の目的

本研究では当該研究期間において以下の項目を実施することを目的とする。

- (1) hCMV 感染細胞を用いたスタチン作用に関わる遺伝子/転写産物レベルの網羅的な解析と候補分子の関与度
- (2) インフルエンザウイルス (Flu) 感染細胞を用いたスタチンの抗ウイルス効果
- (3) hCMV 感染細胞を用いたスタチン作用に関わる miRNA レベルでの解析
- (4) Flu 感染細胞を用いたスタチンの抗ウイルス作用機序の解析
- (5) 単球を用いたスタチンによる形質変化に関わる発現蛋白質の解析
- (6) hCMV 感染細胞を用いたスタチン作用に関わる発現蛋白質の解析と候補分子の関与度
- (7) ApoE 欠損マウスを用いたインフルエンザの生存率および病態改善に関わるスタチンの至適な介入
- (8) 症例対照研究によるインフルエンザ感受性と ApoE アレル遺伝子保有との関連性

3. 研究の方法

平成 21 年度(1 年目)および平成 22 年度以降(2-4 年目)において以下のように展開する。

- <1 年目> ウイルス感染に対するスタチン作用に関わる遺伝子/転写物の推定
- <2 年目> ウイルス感染に対するスタチン作用に関わる miRNA の推定
- <3 年目> ウイルス感染に対するスタチン作用に関わる発現蛋白質の推定
- <4 年目> ウイルス感染症における宿主アポリポ蛋白質 E の役割とスタチン効果との関連性

(1) 共培養 : ヒト胎児肺線維芽 (HEL) 細胞と hCMV (Towne 株)・スタチン (mevastatin-1.0 μM) との共培養を行い、経時 (感染後 9⇒24⇒48 時間) 的に細胞 RNA を抽出し、cDNA 合成を行う。候補遺伝子の選定 : ヒトおよび hCMV 遺伝子を搭載した DNA チップを用いて、感染早期⇒後期における宿主細胞由来およびウイ

ルス由来の遺伝子の発現変動を網羅的に解析し、宿主由来とウイルス由来別に抽出してクラスター分析を細胞毎に行う。プラセボと比較して発現上昇や低下した遺伝子を選定し、RT-PCR 法にて選定遺伝子を定量する。候補遺伝子機能の検証 : 発現上昇した宿主由来遺伝子の抑制を目的として siRNA にて事前処理した細胞を用いてスタチン作用が低下するか確認する。

(2) 共培養 : イヌ腎 (MDCK) 細胞と Flu (PR8 株/AG 株)・スタチン (mevastatin-1.0 μM) との共培養を実施する。抗ウイルス効果の確認 : 経時 (感染後 2⇒4⇒6⇒8⇒10 時間) 的に培養上清中のウイルス産生量を観察する。

(3) 共培養 : HEL 細胞と hCMV (同株)・スタチン (mevastatin-1.0 μM) またはプラセボとの共培養を行い、経時 (感染後 9⇒24⇒48 時間) 的に細胞 miRNA を抽出して蛍光標識する。候補 miRNA の選定 : miRNA データベース (miRBase Release 16) に基づいてヒトおよび hCMV miRNA を搭載したチップを用いて、経時的に宿主由来およびウイルス由来の miRNA の発現変動を網羅的に解析する。発現上昇した miRNA を選び、RT-PCR 法にて選定 miRNA を定量する。また、選定 miRNA 毎に、解析ツールを用いて標的 mRNA を想定する。

(4) 共培養 : (2) と同様な共培養を実施する。経時 (感染後 2⇒4⇒6⇒8⇒10 時間) 的に細胞 RNA を抽出する。候補遺伝子の選定 : 宿主およびウイルス遺伝子を搭載した DNA チップを用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行う。

(5) 細胞刺激と薬物介入 : ヒト単球系細胞 (THP-1) に対してインターフェロン (IFN)- γ (5 unit/ml) を刺激あるいは非刺激した後、スタチン (simvastatin, pravastatin, mevastatin, lovastatin—濃度 0.1-1.0-10 μM) またはプラセボを細胞へ曝露 (24⇒48⇒72 時間) させる。スタチン作用となる表面抗原 (樹状細胞抗原等) の発現性を確認する。

(6) 共培養と蛋白質試料の準備 : HEL 細胞と hCMV (同株)・スタチン (simvastatin, 濃度 0.1-1.0-10 μM) またはプラセボとの共培養を行い、経時的 (感染後 9⇒24⇒48⇒72 時間) に蛋白質抽出溶液を準備して、発現蛋白質を解析する。候補蛋白質機能の検証 : 推定された蛋白質の発現抑制 (siRNA) の処理が施行された細胞を利用してスタチン効果が低下するか検証する。

(7) 疾患誘導 : ApoE 欠損と対照のマウスにインフルエンザウイルス (PR8 株, 5000 PFU/マウス) を経鼻感染させる。介入 : スタチン系薬とプラセボを上記ウイルス接種の 3 日前・接種当日・接種 3 日後の 3 段階より開始し、同薬の連日経口投与を行う。評価 : 2 週間の生存観察と共に、ウイルス接種の 3 日前—接種当日—接種 3 日後—6 日後—9 日後の段階における気道病理所見を通じて病態の

形成や改善を評価する。

(8) **症例登録**：症例データベースを構築して、ワクチン未接種のインフルエンザ症例と年齢・性を一致させたワクチン未接種の対照例を後ろ向きに無作為に抽出する。データベース上判明している ApoE の 3 種のアレル遺伝子 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) に関するデータも集積する。**評価**：対照群と比較して、インフルエンザ発症群における ApoE アレル遺伝子の保有率の差を検証する。

4. 研究成果

当該研究期間において以下の研究成果が得られた。

(1) 発現が亢進したヒト遺伝子群として、ケモカインリガンド (CXCL11, CCL2 など) や IFN 応答性蛋白質 (IFI44, IFIT2 など) が確認され、発現が抑制した宿主遺伝子群は認められなかった。一方、発現が低下したウイルス遺伝子群として、複製の前初期段階に関わる調節蛋白質である UL37 や感染前初期の遺伝子発現を活性化する UL28 が見られ、発現が増加したウイルス遺伝子群は確認されなかった。RT-PCR 法にて上記の選定遺伝子の再現性・定量性を確認した後、宿主のケモカインリガンドである CXCL11 が siRNA により事前に発現抑制された HEL 細胞を用いて再度感染・共培養を実施したところ、スタチンが有する抗ウイルス作用が减弱された。以上より、スタチンの hCMV 複製抑制は宿主におけるケモカインリガンドの遺伝子発現増加を介して発揮される可能性が示唆された。

(2) MDCK 細胞と FlU (PR8 株/AG 株)・スタチン (mevastatin-1.0 μM) との共培養において、感染後 12 時間における培養上清中のウイルス産生量の低下が確認された。

(3) 発現亢進したヒト miRNA として hsa-miR-146a/hsa-miR-34a*/hsa-miR-34b* が確認され、発現低下した miRNA として hsa-miR-142-3p/hsa-miR-141/hsa-miR-602/hsa-miR-513a-3p を認めた。TargetsCan を通じて発現亢進した miRNA が標的とする mRNA をリスト化した所、hsa-miR-146a の標的 mRNA としてケモカインリガンドである CCL5 が存在することが判明した。この CCL5 mRNA は、前年度での遺伝子発現アレイ解析にても発現亢進が確認されている遺伝子である。リアルタイム RT-PCR 法による hsa-miR-146a の発現亢進や WB での CCL5 タンパクの発現低下が見られたことから、スタチンによる hCMV 複製抑制は hsa-miR-146a の発現亢進を介した CCL5 の発現低下により発揮される可能性が示唆された。一方、ウイルス由来 miRNA の発現変動として hcmv-miR-UL112 の発現亢進を認めたことから、スタチンの抗ウイルス作用機序として hcmv-miR-UL112 の発現亢進を介した hCMV タンパク IE 72 の発現抑制の経路

も想定された。

(4) 宿主細胞内のウイルス核酸の感知機構である retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) の発現増強を認めたことから、パターン認識受容体を介した I 型 IFN 誘導がスタチンの作用機序として示唆された。

(5) IFN- γ の刺激を受けた THP-1 に対して simvastatin や mevastatin (共に 5 μM) は HLA-DR (MHC クラス II 分子) の発現を選択的に増強することが確認された。さらに、同一条件にて lovastatin や pravastatin (共に 5 μM) は HLA-DR のみならず CD80 (樹状細胞マーカー) の発現も高めることが判明した。このような結果の相違を踏まえて解析した所、simvastatin と比較して lovastatin はより高度にインターロイキン (IL)-1 受容体関連タンパク 2 (IL-1Rrp2) の発現を誘導する知見が得られた。以上より、lovastatin は IFN 刺激下の THP-1 に対して IL-1Rrp2 発現を誘導することで樹状細胞への分化を促進する可能性が示唆された。

(6) hCMV 感染の HEL 細胞に対して simvastatin は宿主に由来する CXCL11 の発現を濃度依存的に調節する所見が得られた。CXCL11 が siRNA により事前に発現抑制された HEL 細胞を用いて再度感染・共培養を実施した所、simvastatin の有する抗ウイルス作用が减弱することが確認された。以上の結果から、simvastatin の hCMV 複製抑制は宿主における CXCL11 の発現調節を介して誘導される可能性が示唆された。

(7) ApoE 欠損マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させ、simvastatin (0.5mg/kg/日) またはプラセボをウイルス接種の 3 日前・接種当日・接種 3 日後の 3 段階より開始し、同薬の連日経口投与を行った。プラセボ投与群と比較して、ウイルス接種の 3 日前より開始したスタチン投与群において、感染後 2 週間における生存率が有意に良好であった。ウイルス接種 6 日後—9 日後の気道病理所見としてマクロファージを主体とする局所への炎症細胞浸潤の軽減が確認された。一方、健常マウスへの同ウイルス感染実験では、スタチン投与による生存率の改善は認められなかった。この結果から、生体へのスタチン効果は脂質代謝障害の病態においてウイルス感染より以前に介入することで発現する可能性が示された。

(8) 構築の症例データベース (高齢者病院における入院 934 症例, 2000 年) を用いて、インフルエンザ発症例 (ワクチン未接種例) と対照例 (年齢・性が一致したワクチン未接種例) を無作為に抽出した。本計画は病院倫理委員会の承認を事前に得ており、連結不可能匿名化の実施により患者情報の漏えいがないように倫理面への配慮を行っている。ApoE におけるアレル遺伝子 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) に関

するデータを集積して、インフルエンザ発症群における ApoE アレル遺伝子の保有率と対照群での同アレル遺伝子の保有率との相違を解析した。対照群におけるデータと比較して、インフルエンザ発症群では同アレル遺伝子であるε4 の保有(ホモ・ヘテロ)率が有意に高いことが判明した。以上より、ApoE のアレル遺伝子ε4 はインフルエンザ感受性に関連する宿主因子となる可能性が示唆された。

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 10 件)

- ① Murayama T, Li Y, Takahashi T, Yamada R, Matsubara K, Tsuchida Y, Zheng X, Sadanari H. Anti-cytomegalovirus effects of triclin are dependent on CXCL11. *Microbes Infect* 査読有 14, 2012, 1086-1092.
DOI: 10.1016/j.micinf.2012.05.017
- ② Takei T, Morozumi M, Kadota K, Miyamae T, Yokota S, Ubukata K, Iwata S, Takahashi T. Respiratory distress in human metapneumovirus infection with high inflammatory cytokinemia. *J Exp Clin Med* 査読有 4, 2012, 189-193.
DOI: 10.1016/j.jecm.2012.04.012
- ③ Takano F, Bi C, Ishigaki Y, Yoshida H, Sakurada C, Takahashi T. Anticholesteremic agents, statins, modulate monocyte activation in cultured human THP-1 cells. *Oyo Yakuri* 査読有 (印刷中).
- ④ Takahashi T, Goto M, Yoshida H, Sumino H, Matsui H. Infectious diseases after the 2011 Great East Japan Earthquake. *J Exp Clin Med* 査読有 4, 2012, 20-23.
DOI: 10.1016/j.jecm.2011.11.013
- ⑤ Okada T, Morozumi M, Matsubara K, Komiyama O, Ubukata K, Takahashi T, Iwata S. Characteristic findings of pediatric inpatients with pandemic (H1N1) 2009 virus infection among severe and nonsevere illnesses. *J Infect Chemother* 査読有 17, 2011, 238-245.
DOI: 10.1007/s10156-010-0115-z
- ⑥ Murayama T, Bi C, Li Y, Ishigaki Y, Takano F, Takegami T, Ohta T, Sumino H, Ubukata K, Takahashi T. Inhibitory effects of statins on cytomegalovirus production in human cells: comprehensive analysis of gene expression profiles. *J Exp Clin Med* 査読有 3, 2011, 40-45.
DOI: 10.1016/j.jecm.2010.10.007

- ⑦ Hasegawa M, Okada T, Sakata H, Nakayama E, Fuchigami T, Inamo Y, Mugishima H, Tajima T, Iwata S, Morozumi M, Ubukata K, Watanabe H, Takahashi T. Pandemic (H1N1) 2009-associated pneumonia in children, Japan. *Emerg Infect Dis* 査読有 17, 2011, 277-280.
DOI: 10.3201/eid1702.091904.

- ⑧ 高橋 孝. インフルエンザの予防と治療. *CARLISLE* 査読無 16, 2011, 1-3.

<http://www.yoshida-pharm.com/carlisle/1601/outline.html>

- ⑨ Hasegawa M, Inamo Y, Fuchigami T, Hashimoto K, Morozumi M, Ubukata K, Watanabe H, Takahashi T. Bronchial casts and pandemic (H1N1) 2009 virus infection. *Emerg Infect Dis* 査読有 16, 2010, 344-346.
DOI: 10.3201/eid1602.091607.

- ⑩ Hasegawa M, Hashimoto K, Morozumi M, Ubukata K, Takahashi T, Inamo Y. Spontaneous pneumomediastinum complicating pneumonia in children infected with the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Clin Microbiol Infect* 査読有 16, 2010, 195-199.
DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03086.x.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Takahashi T. Inhibitory effects of simvastatin on human cytomegalovirus replication through altered expression of a chemokine, C-X-C motif ligand 11 in human embryonic lung cells. *11th East Asian Conference on Infection Control and Prevention* Nov 15, 2012. Tokyo, Japan.
- ② Takahashi T. Infectious diseases after the 2011 earthquake off the Pacific Coast of Tohoku. *12th Joint Symposium of Robert Koch Institute and the Kitasato Institute* Oct 9, 2012. Berlin, Germany.
- ③ 高橋 孝. インフルエンザウイルスに対するスタチン系薬の抗ウイルス効果. 第 24 回日本臨床微生物学会総会 2013 年 2 月 2 日. 横浜, 神奈川.
- ④ Sadanari H, (Murayama T). Inhibitory effect of statins on expression of the major immediate-early gene of human cytomegalovirus (HCMV) in HCMV-infected cells. *International Union of Microbiological Societies 2011 congress* Sep 15, 2011. Sapporo, Japan.
- ⑤ 高橋 孝. スタチン系薬によるヒトサイトメガロウイルスの複製抑制と感染細胞遺伝子発現の網羅的解析. 第 85 回日本感染症学会総会 2011 年 4 月 22 日. 港区, 東

京.

- ⑥李 瑩, (村山次哉). Tricin, 4', 5, 7-trihydroxy-3', 5' -dimethoxyflavone による抗ヒトサイトメガロウイルス効果の機序について. 日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 28 日. 静岡市, 静岡.
- ⑦ Takahashi T. Inhibitory effects of various statins on cytomegalovirus replication in human cells. *50th Annual Meeting of Interscience Conference of AAC* Sep 13, 2010. Boston, USA.
- ⑧李 瑩, (村山次哉). スタチン系薬剤による抗ヒトサイトメガロウイルス作用の検討. 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日. 岡山, 岡山.
- ⑨李 瑩, (村山次哉). スタチン系薬剤による抗ウイルス効果の検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月 25 日. 千代田区, 東京.
- ⑩畢 長暁, (村山次哉). スタチン系薬剤のヒトサイトメガロウイルスに対する増殖抑制効果. 日本薬学会北陸支部第 120 回例会 2009 年 7 月 11 日. 金沢, 石川.

[図書] (計 2 件)

- ①高橋 孝(監修: 貫和敏博, 杉山幸比古, 門田淳一). 南江堂 ヒトメタニューモウイルス新興呼吸器感染症「呼吸器疾患最新の治療 2010-2012」, 2010, 21-26.
- ②高橋 孝(監修: 大内尉義, 秋山弘子). 東京大学出版会 インフルエンザ・ノロウイルス感染症「新老年学第 3 版」, 2010, 974-981.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab15.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 孝 (TAKAHASHI TAKASHI)
北里大学・その他の研究科・教授
研究者番号: 00292855

(2) 研究分担者

石垣 靖人 (ISHIGAKI YASUHITO)
金沢医科大学・付置研究所・准教授
研究者番号: 20232275
村山 次哉 (MURAYAMA TSUGIYA)
北陸大学・薬学部・教授
研究者番号: 60159184
高野 文英 (TAKANO FUMIHIDE)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 20236251