

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790774

研究課題名(和文) 重症インフルエンザ肺炎の解析-細菌重複感染モデルでの宿主と微生物因子の制御へ-

研究課題名(英文) Analysis of Severe Influenza Pneumonia -Control of Host and Pathogen Factors in Influenza and Bacteria Co-infected Mice Models

研究代表者

関 雅文(MASAFUMI SEKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80432970

研究成果の概要(和文)：

インフルエンザにおける肺炎の重症化機序について、微生物側および宿主側因子の両面から検討した。前者に関して、まず緑膿菌感染マウスモデルにおいて、緑膿菌の **Quorum sensing** 遺伝子欠損株を使用した場合に病原因子の低下が観察された一方、単独感染では *in vivo* での明らかな差は見られなかった。後者に関しては、肺炎球菌との重複感染モデルでの肺内でのアポトーシスの亢進と TLR 関連遺伝子欠損マウスにおけるインフルエンザウイルス感染単独によるサイトカインストームの誘導と重篤な肺炎・肺水腫の惹起が観察された。過剰な炎症がインフルエンザ肺炎の重症化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

We examined the mechanisms of severe influenza virus-related pneumonia. In pathogens factor, quorum sensing related genes were deleted in *Pseudomonas*, and we infected them to mice. Toxin were decreased, but no significant differences were found *in vivo*. However, apoptosis were detected in virus and *Streptococcus* co-infected mice, and excessive inflammation and pulmonary edema according to cytokine storm were observed in TLR-related genes-deleted mice by influenza virus infection alone. Excessive inflammation might be related to progression of severe pneumonia

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,200,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：インフルエンザ、細菌感染、肺炎

1. 研究開始当初の背景

当時より新型インフルエンザの発生が危惧されていたが、インフルエンザ感染症においては、特に高齢者や慢性肺疾患を有する患者で、重症肺炎や急性肺障害 (ALI/ARDS: Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome) を発症する頻度が高く、また、いったん発症した重症肺炎は抗菌薬や抗ウイルス薬への反応が不良で、しばしば致命的となることが知られていた。したがって、

インフルエンザならびにインフルエンザウイルス感染に伴う重症肺炎の治療の確立は急務であった。

インフルエンザウイルス感染に伴う肺炎としては細菌感染を合併した混合感染型や二次感染型が有名であるが、いずれも細菌感染のみによる肺炎、もしくはインフルエンザウイルス感染のみの通常の気管支炎と比較するときわめて重篤であり、ウイルスと細菌の重複感染による相乗的 (シナジー: Synergy)

な悪化要因の存在が示唆されていた。

我々は以前からこれらの病態に関する研究を行っており、インフルエンザウイルスと肺炎球菌の重複感染による致死性肺炎マウスモデル(Seki, M. *et. al. Eur Respir J.* 2004. 下図参照)及び緑膿菌慢性気道感染マウスのインフルエンザウイルス感染による急性増悪モデル (Seki, M. *et. al Clin Exp Immunol.* 2004.) を確立し、ケモカインや Toll-like Receptor、好中球機能などの解析により、その重症化に個体側の免疫学的要因が大きく関与している可能性を示唆する結果を得ていた。

*参照：下図にインフルエンザウイルス感染によって肺炎球菌性肺炎が著しく重症化することを示す(左より順にマウスにおける肺の肉眼像、病理像。生存率の低下も示す。)

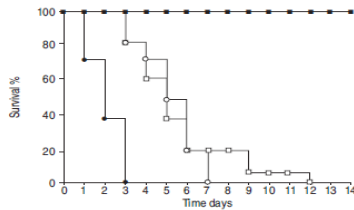
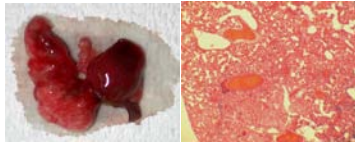


Fig. 1. Survival rates of mice infected with influenza virus and/or *Streptococcus pneumoniae*. Mice were infected with influenza virus 2 days before *S. pneumoniae* instillation, which occurred on day 0. Each group comprised 10 mice (●: doubly infected mice; ○: influenza virus-infected mice; □: *S. pneumoniae*-infected mice; ■: mock-infected mice). The survival rate was significantly lower in mice infected with both influenza virus and *S. pneumoniae* than in singly or mock-infected mice ($p<0.01$).

さらに、プロテオミクスやDNAマイクロアレイなどの手法を用いて、実際に、宿主側の重症化因子として alpha-antitrypsin : AIAT (Kosai K, Seki M *et al Clin Exp Immunol* 2008 次ページ図参照)や PAF 関連分子 (Seki M *et al JJID Revise* 中) など一定の分子を同定し、プロテアーゼ阻害薬を用いた治療の対象となりうることを確認していた (Kosai K, Seki M *et al J Int Med Res* 2008)。

2. 研究の目的

我々はインフルエンザウイルス感染と細菌の重複感染に伴う致死性肺炎の発症や慢性気道感染症の急性増悪の病態を解析し、治療および感染予防・重症化対策へフィードバックすることを大きな目標としていた。

これらの重症化の機序には免疫学的機序が関与していると考えられ、関連する分子を同定し、これを阻害することができれば、重症化を大いに防ぐことがで

きるであろう。

関連する分子としては、我々が今まで対象としてきた宿主因子とともに、今後、微生物側の因子にも焦点を当てて、研究に取り組んでいきたいと考えていた。

3. 研究の方法

具体的には、

(1) 「緑膿菌側の因子」、特に「Quorum Sensing(QS)」と呼ばれる菌と菌との情報伝達機構の病原性との関連、ウイルス感染による急性増悪に及ぼす影響に関して検討した。QSは細菌が自らの存在環境＝濃度の変化を察知し、autoinducerと呼ばれるホルモン様物質の産生を調節することによって、菌の増殖や維持を制御するシステムである。病原因子の発現やバイオフィルムの形成への影響も報告されるようになり、宿主側の病態形成因子への影響も強く示唆されている。Las、Rhl、PQSの3つのQS関連遺伝子も近年同定された。本研究ではそのうち、最も新しく同定された PQS に焦点を当て、緑膿菌 PQS ノックアウト株：YH-3株(当科にて作成)を用いて慢性気道感染症モデルを作成し、インフルエンザウイルスの重複感染による急性増悪に、緑膿菌標準株 PAO1 を用いた場合と差異が生ずるか検討した。

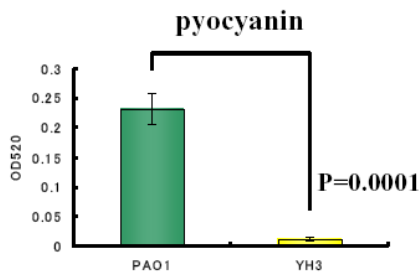
宿主側の因子の同定もさらに進めたいと考え、重症肺損傷における気道上皮のアポトーシスとの関連が報告されているため、

(2)我々のモデルにおける気道上皮のアポトーシスの解析と関連する酵素：Caspaseを活性化させる宿主因子の遺伝子クローニングに取り組んだ。

(3)さらに、以前から我々が強い関連を指摘している自然免疫因子：Toll-like Receptor 関連分子のノックアウトマウスを用いた感染実験を行った。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌における Quorum Sensing(QS)と病原性との関連、ウイルス感染による急性増悪に及ぼす影響に関しては、まず、PAO1株(wild-type)およびYH3株($\Delta pqsA-E$)そのものの増殖速度や病原因子：elastaseおよびpyocyanin産生について検討した。その結果、増殖や elastase産生には差が見られなかったものの、pyocyanin産生においてPAO1株とYH3株の間に有意差が認められた(下図)。



次に、*in vivo*において、検討を進めた。すなわち、これらの株を用いた慢性気道感染症マウスモデルを作成し、その生存率などを検討した。PAO1株のみ、YH-3株のみを慢性的に気道感染したマウスでは生存率および肺内の細菌数、炎症細胞数、サイトカイン濃度などの差は見られなかった。また、これらのマウスにインフルエンザウイルスを重複感染したところ、2群間に生存率の差は認められなかった。

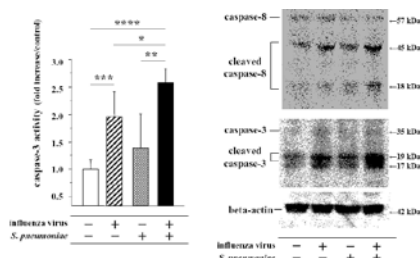
但し、肺の病理像や好中球機能やサイトカイン産生量、肺内での細菌数やウイルス価に関しては、インフルエンザウイルスが重複感染した場合、標準株 PAO1 と変異株 YH-3 をそれぞれ用いた慢性気道感染マウスにおいて、その反応に差異が生じている可能性も強く、今後さらに検討を進める予定である。

- (2) 気道上皮のアポトーシスの確認と関連する酵素：Caspase を活性化させる宿主因子の遺伝子クローニングに関しては、我々は酵母を用いた Caspase-8 の活性化因子の同定システムを確立しているため、その系を応用した。

マウス肺から取り出した RNA より cDNA ライブラリーを作成し、重症インフルエンザ肺炎における caspase-8 活性化因子の同定を試みた。

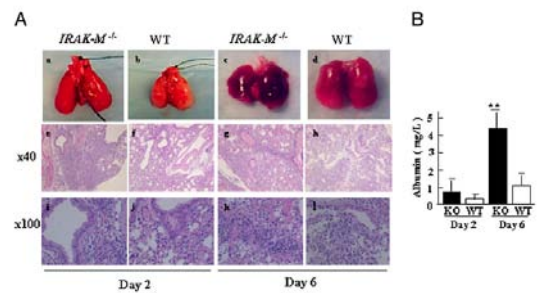
この結果、新規の酵素はクローニングできなかったものの、Fas や Fas lignd、Caspase-2 などのアポトーシス関連酵素の遺伝子が検出された。

但し、病理標本の TUNEL 法の解析より、明らかに重複感染肺ではウイルスもしくは細菌の単独感染肺よりもアポトーシスが進行しており、Caspase-8 や-3 の発現が上昇していることが確認された (上図)。



- (3) Toll-like Receptor 関連分子のノックアウトマウスを用いた感染実験に関しては、TLR の細胞内シグナル伝達に大きな役割を担っているとされる IRAK-M のノックアウトマウスを用いたところ、いわゆる「サイトカインストーム」が観察され、かつ、その肺内における強い肺炎の惹起と肺水腫の発生が観察された (下図)。

* 下図：インフルエンザウイルス感染によって、IRAK-Mノックアウトマウス(KO)では野生型(WT)より強い肺炎が誘導され(A)、肺胞内アルブミン濃度の有意な上昇が観察された(B)。



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 23 件)

- Seki M, Kohno S, Newstead M, Zeng X, Bhan U, Lukacs N, Kunkel S, Standiford T. Critical role of IRAK-M in regulating chemokine-dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia. *J Immunol* 2010, 184; 1410-8.
- Kaku N, Seki M, Doi S, Hayashi T, Imanishi D, Imamura Y, Kurihara S, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, and Kohno S. A case of intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL) with no abnormal findings on chest computed tomography diagnosed by random transbronchial lung biopsy. *Intern*

- Med.* 2010, 49, 2697-2701.
- 3) Kohno S, Kida H, Mizuguchi M, Shimada J; for the S-021812 Clinical Study Group. 8) Efficacy and safety of intravenous peramivir for the treatment of seasonal influenza. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:4568-74.
 - 4) Morinaga Y, Yanagihara K, Nakamura S, Hasegawa H, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. 9) Legionella pneumophila Induces Cathepsin B-dependent Necrotic Cell Death with Releasing High Mobility Group Box1 in Macrophages. *Respir Res.* 2010 22;11:158.
 - 5) Yamamoto Y, Izumikawa K, Hara A, Fujita H, Amenomori M, Sakamoto N, Seki M, Kakeya H, Yanagihara K, Takasaki K, Miyazaki T, Tsuchiya T, Yamasaki N, Tagawa T, Nagayasu T, Kohno S. Importance of Controlling Drug-resistant Pseudomonas aeruginosa Infection: Experience from Lung Transplantation in a Cystic Fibrosis Case. *Intern Med.* 2010; 49: 2353-8.
 - 6) Morinaga Y, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. In vivo 11) efficacy of sivelestat in combination with pazufloxacin against Legionella pneumonia. *Exp Lung Res.* 2010; 36:484-90.
 - 7) Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, Tsukasaki K, Kohno S, Seki M, Sugimoto H, Shimazu T, Tasaki O, Matsushima A, Ikeda 12) Y, Okamoto S, Aikawa N, Hori S, Obara H, Ishizaka A, Hasegawa N, Takeda J, Kamihira S, Sugahara K, Asari S, Murata M, Kobayashi Y, Ginba H, Sumiyama Y, Kitajima M. Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Crit Care.* 2010, 14:R159
 - Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of Candida glabrata. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54:1639-43.
 - Izumikawa K, Nakano K, Kurihara S, Imamura Y, Yamamoto K, Miyazaki T, Sakamoto N, Seki M, Ishimatsu Y, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tsuchiya T, Yamasaki N, Tagawa T, Mukae H, Nagayasu T, Kohno S. Diffuse Alveolar Hemorrhage following Itraconazole Injection. *Intern Med.* 2010; 49: 497-500.
 - Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Role of the Slt2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in Candida glabrata. *FEMS Yeast Res.* 2010, 10:343-52
 - Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, Mihara T, Takazono T, Kosai K, Imamura Y, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of Candida glabrata. *Mycopathologia.* 2010, 169:81-90.
 - Nakamura S, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. Efficacy of clarithromycin against experimentally induced pneumonia caused by clarithromycin-resistant Haemophilus influenzae in mice. *Antimicrob Agents*

- Chemother.* 2010, 2010;54:757-62
- 13) 関 雅文、田中章貴、小佐井康介、河野 茂 2) 平成 21 年度北里柴三郎記念学術奨励賞 受賞記念論文 インフルエンザ関連肺炎の重症化機序の解析と治療法の検討
日本感染症学会雑誌, 84, 689-693, 2010.
- 14) 関 雅文、小佐井康介、田中章貴、河野 茂 3) 私達の研究 インフルエンザウイルス肺炎と細菌感染の合併による重症化機序 化学療法の領域, 26, 2460-2466, 2010.
- 15) 関 雅文、河野 茂 話題のくすり ペラミビル水和物 日本病院薬剤師会雑誌 46, 1553-5, 2010.
- 16) 関 雅文、河野 茂 一日一回投与時代の抗菌化学療-新規抗インフルエンザ薬の新たな展開 化学療法の領域 26, 1425-30, 2010
- 17) 関 雅文、河野 茂 新型インフルエンザの病態の特徴~季節性インフルエンザと比較して 呼吸器科 2010, 17, 24-28.
- 18) 河野 茂、関 雅文 新型インフルエンザの出現と対策 呼吸器科 2010, 17, 1-5
- 19) 関 雅文、河野 茂 新しい抗インフルエンザ薬 日誌 2010, 11, 2735-2739.
- 20) 河野 茂、関 雅文 ペラミビル インフルエンザ 2010, 11, 360-4.
- 21) 河野 茂、関 雅文 ペラミビル 臨床と微生物 2010, 10, 549-552.
- 22) 関 雅文、河野 茂 新規治療薬の展望 1) 抗インフルエンザ薬 感染と抗菌薬 13, 372-376, 2010.
- 23) 田中章貴、関 雅文、小佐井康介、河野 茂 新しい抗インフルエンザ薬 ペラミビル 臨床と研究 87, 1702-1706, 2010.
- [学会発表] (計 7 件)
- 1) 関 雅文 第 25 回環境感染学会 ランチョンセミナー最新の抗インフルエンザ薬とガイドラインに沿った呼吸器感染症診療
- 2010 年 2 月 東京
- 関 雅文、小佐井康介、田中章貴、河野 茂 第 84 回日本感染症学会 総会 ミニシンポジウム ノックアウトマウスを用いた重症インフルエンザ肺炎の発症機序の解析 2010 年 4 月 京都
- 3) Seki M et al. 第 50 回日本呼吸器学会 総会 English Mini Symposium Critical Role of IRAK-M in Regulating Chemokine-dependent Deleterious Inflammation in Murine Influenza Pneumonia 2010 年 4 月 東京
- 4) Seki M, Kohno S et al. ATS (米国胸部疾患学会) Mini Symposium (Oral presentation) Critical Role of IRAK-M in Regulating Chemokine-dependent Deleterious Inflammation in Murine Influenza Pneumonia 2010 年 5 月 ニューオーリンズ
- 5) 関 雅文 第 58 回日本化学療法学会 総会 シンポジウム インフルエンザに合併する重症インフルエンザの発症機序の解析 2010 年 6 月 長崎
- 6) 関 雅文 西日本化学療法学会 大分 イブニングシンポジウム 語ろう 日本の新型インフルエンザ 新しい抗インフルエンザ薬と今後のインフルエンザ診療 2010 年 11 月
- [図書] (計 1 件) 関 雅文、河野 茂 VI 基礎疾患 (糖尿病・喘息・COPD) を持つ患者への対応 これでわかるインフルエンザ診療のポイント (藤田次郎 編) 67-73, 2010, 南江堂(東京)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
なし
- 取得状況 (計 0 件)
なし
- [その他]
(受賞) 関 雅文 日本感染症学会 北里柴

三郎記念学術賞 (H22.4月、京都)

*長崎新聞 2010年7月2日号でも報道

(取材) 関 雅文、柴 孝也マクロライド系薬による呼吸器感染症の重症化抑制~菌と宿主、慢性と急性~Medicament News 2011年2月15日号

(座談会)関 雅文、館田一博、二木 芳人マクロライド系薬の見直しと今後の展望マクロライド系薬の役割と新たな可能性 監修 河野 茂 69-76, 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

関 雅文 (MASAFUMI SEKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：80432970

(2)研究分担者

河野 茂 (KOHNO SHIGERU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：80136647

(3)連携研究者

なし