

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02376

研究課題名（和文）宿主因子の制御による重症インフルエンザの新規治療法の研究開発

研究課題名（英文）Research of novel treatments for severe influenza by controlling host factors

研究代表者

大野 円実（Ohno, Marumi）

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・助教

研究者番号：50794202

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,230,000円

研究成果の概要（和文）：マウスを用いてインフルエンザウイルス感染に対する宿主の生体応答を詳細に解析したところ、酸化LDLの受容体であるlectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)は重症インフルエンザの際に起こる血液凝固異常及び免疫細胞の応答や損傷組織の修復の適切な制御に必要であることが明らかになった。また、感染に伴って増加すると考えられている酸化リン脂質はプログラム細胞死や貪食の促進を介して感染細胞の排除に貢献していると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスを用いた実験から、宿主の脂質代謝や脂質クオリティの制御システムがインフルエンザの病原性を左右すると明らかになった。本研究で観察されたものと共通する血中脂質プロファイルの変化がすでに新型コロナウイルス感染症やデング熱ウイルス感染症患者で報告されている。ウイルス自体ではなく宿主に重篤な症状を引き起こす生体応答をコントロールすることで重症化を防ぐという考え方が近年広がりつつある。ここで示された脂質制御に関わる生体応答は広くウイルス感染症における治療標的となりうると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, detailed analysis of the host biological response to influenza virus infection has been conducted in mice. Interestingly, lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) was shown to be required for blood coagulation abnormalities that occur during severe influenza and also for proper regulation of immune cell responses and repair of damaged lung tissue. Oxidized phospholipids, which have been demonstrated to increase with infection with various pathogens, were also suggested to contribute to the elimination of viruses and dying cells via the promotion of programmed cell death and phagocytosis of infected cells. These findings indicate that regulatory systems of host lipid metabolism and lipid quality are potential new therapeutic targets in viral infections.

研究分野：感染症

キーワード：インフルエンザ 宿主応答

1. 研究開始当初の背景

毎年冬季に流行する季節性インフルエンザは、小児と高齢者を中心に世界中で年間およそ 50 万人を死に至らしめている。重症化したインフルエンザの有効な治療法が確立していないことがその大きな要因である。インフルエンザウイルス性状、感染様式及び宿主の免疫応答については長年の研究により多くのことが明らかになってきたが、重症化メカニズムはいまだ明らかではない。ヒト患者での報告から、インフルエンザの重症化に血液凝固異常及びそれに伴う多臓器不全が関連すると示唆されてきたが、そのメカニズムは不明である。

申請者はマウスモデルを用いて重症インフルエンザにおいて全身性のエネルギー代謝障害が引き起こされることをこれまでに明らかにし (M Ohno, 2020, *Sci Rep*) インフルエンザ重症化とエネルギー代謝障害が強く関連することを示した。メタボリックシンドロームによる動脈硬化症発症リスクの上昇に示されるように、全身性のエネルギー代謝障害は血管障害を引き起こす。よって、重症インフルエンザにおけるエネルギー代謝障害と血液凝固異常は相互に関連しあつて多臓器不全につながるものと考えられ、これらは新規の治療標的となることが期待される。

2. 研究の目的

エネルギー代謝障害と血液凝固異常に関与する宿主因子を特定し、それをコントロールすることで重症インフルエンザにおける多臓器不全を防ぐ治療法を確立することが本研究の目的である。また、エネルギー代謝障害及び血液凝固異常はインフルエンザに限らず多くのウイルス感染症で観察されている。特に、2019 年末に報告されて以降世界中で流行が続く新型コロナウイルス感染症においても血液凝固異常と重症度の間に強い相関が報告されており (H Al-Samkari, 2020, *Am J Hematol*; C Magro, 2020, *Transl Res*) 本研究で得られる知見はインフルエンザ以外のウイルス感染症治療の礎ともなることが期待される

3. 研究の方法

3-1. 重症インフルエンザにおける血液凝固異常の解析

雄性 C57L/6 マウス(8-12 週齢)にインフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/1934(H1N1; PPR8) 株を 50 または 500 plaque forming unit; PFU で経鼻感染させ、以下の実験を行った。対照動物には PBS を投与した。

- 1) 血液凝固パラメータの測定及び肺における血管内血液凝固を評価した。
- 2) 血液凝固異常を引き起こす宿主因子の候補を探索するために、定量 PCR を用いて血液凝固及び血管壁透過性関連分子の肺や血管における遺伝子発現量を経時的に解析した。
- 3) 候補宿主因子のノックアウトマウスの病態解析を行い、その宿主因子の重症インフルエンザにおける役割を検証した
- 4) 血漿の網羅的脂質解析を行った。
- 5) リン脂質の過酸化抑制剤の投与がインフルエンザの病態を緩和するかを検討した。

4. 研究成果

1) 500PFU の PR8 株感染マウスにおいて、感染 6 日後に顕著なプロトロンビン時間の延長及び血中プロトロンビンフラグメント 1+2 濃度の上昇が見られ (図 1; M Ohno, 2021, *Sci Rep* より引用) 同条件の重症インフルエンザマウスモデルにおいて血液凝固異常が引き起こされることが明らかになった。

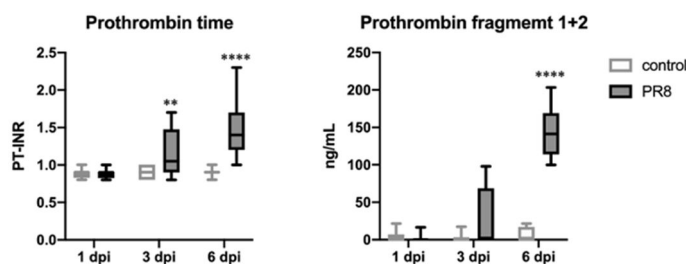


図1. PR株感染マウスにおける血液凝固パラメータの変化

2) 感染 3 日目の動脈において酸化コ

レステロール受容体 lectin-like low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) をコードする遺伝子 *oxidized Low Density Lipoprotein Receptor 1 (Olr1)* の発現量が 5 倍以上に増加することがわかった。LOX-1 は動脈硬化の促進因子であり、炎症細胞の遊走にも強く関わることが過去に報告されている (A Akhmedov, 2014, *Eur Heart J*; M Honjo, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA*)。そのため、LOX-1 が重症インフルエンザにおける血管内血液凝固の亢進に関わる宿主因子候補であると考えた。

3) 信州大学沢村教授から分与していただいた LOX-1 ノックアウトマウスを用いてインフルエンザウイルス感染実験を行い、その病態を野生型マウスと比較した。感染 3 及び 6 日目の肺ウイルス価、感染 6 日後の血中サイトカイン濃度の上昇及び感染後体重減少において、両マウスの間に明らかな違いは見られなかった (図 2; M Ohno, 2021, *Sci Rep* より引用)。一方、感染 6 日後における血中プロトロンビンフラグメント 1+2 濃度の上昇は LOX-1 ノックアウトマウスでは観察

されず、プロトロンビン時間の延長の度合いも野生型に比べて有意に小さかった(図3; M Ohno, 2021, *Sci Rep*より引用)。さらに、感染肺における血管内血液凝固の形成がノックアウトマウスにおいて強く抑制されていることがわかった。これらの結果から、宿主因子 LOX-1 は重症インフルエンザにおける血液凝固異常の重要な促進因子であることが明らかになった。

さらに、感染肺における免疫細胞の振る舞いを比較したところ、野生型マウスと LOX-1 ノックアウトマウスの間に大きな差があることがわかり、LOX-1 がインフルエンザに対する宿主免疫応答の制御にも関与することが示唆された。現在詳細を解析中である。

4) 北海道大学 Gowda 准教授の協力により、インフルエンザウイルス PR8 株感染後の血漿脂質プロファイル

を網羅的に解析したところ、297 種類の脂質(リン脂質 148 種類、リゾリン脂質 45 種類、遊離脂肪酸 23 種類、スフィンゴ脂質 45 種類、コレステロールエステル 6 種類、トリグリセリド 20 種類、ジアシルグリセロール 10 種類)の検出に成功した。主成分解析の結果、感染 3 日目において重症条件(500 PFU)に特異的なパターンが見出され、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸を含むホスファチジルエタノールアミン(PE)の増加がその特徴に特に寄与していることがわかった(図4; M Ohno, 2023, *Sci Rep*より引用)。感染 3 日目の肺において、これらの脂質は有意に増加しており、その生合成に関わる *phospholipase A2 group IVA (Pla2g4a)* や *acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (Acs14)* の遺伝子発現量も上昇していた。よって、ウイルス感染によって肺におけるリン脂質代謝が変化した結果、血中脂質プロファイルの変化がもたらされたと考えられた。多価不飽和脂肪酸を含む PE の血中濃度の上昇は、新型コロナウイルス(Barberis, 2020, *Int J Mol Sci*)、エボラウイルス(Kyle, 2019, *Proc Natl Acad Sci USA*)、ジカウイルス(Queiroz, 2019, *Front Microbiol*)の感染患者で報告されており、広くウイルス感染症のバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

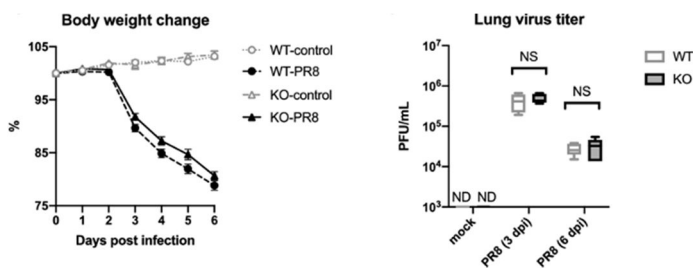


図2. 野生型(WT)及びLOX-1ノックアウト(KO)マウスにおける感染後体重減少と肺ウイルス価

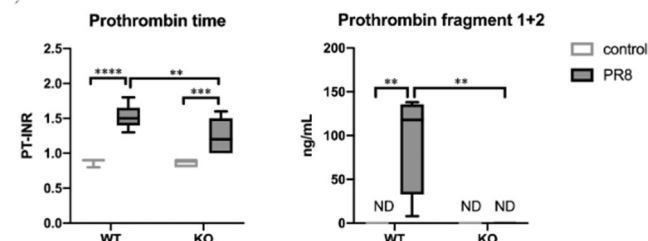
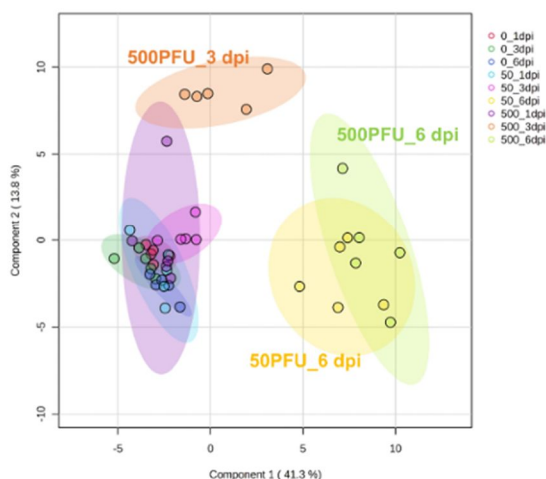


図3. 野生型(WT)及びLOX-1ノックアウト(KO)マウスにおける血液凝固パラメータの変化

a. Score plot



b. concentrations

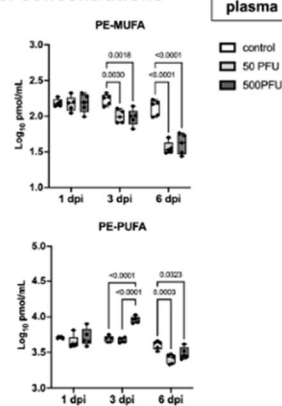


図4. PR8株感染マウスにおける血中脂質プロファイルの変化

5) 多価不飽和脂肪酸を含む PE は非常に酸化されやすく脂質二重膜の不安定化をもたらすため、その増減はウイルス感染症の重症化に関与することが予想される。リン脂質の酸化阻害剤がインフルエンザの重症化阻止に寄与するか検討したが、予想に反して酸化リン脂質が感染細胞のプリグラム細胞死や貪食の促進により損傷組織の修復に関与していることが示唆された。

LOX-1 と同様、リン脂質の代謝や酸化は脂質クオリティの制御に関わる宿主機構であり、これらがウイルス感染症の病態発現に関与することが本研究によって示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohno Marumi, Gowda Siddabasave Gowda B., Sekiya Toshiki, Nomura Naoki, Shingai Masashi, Hui Shu-Ping, Kida Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 The elucidation of plasma lipidome profiles during severe influenza in a mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-41055-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Gowda Divyavani, Li Yonghan, B Gowda Siddabasave Gowda, Ohno Marumi, Chiba Hitoshi, Hui Shu-Ping	4. 巻 414
2. 論文標題 Determination of short-chain fatty acids by N,N-dimethylethylenediamine derivatization combined with liquid chromatography/mass spectrometry and their implication in influenza virus infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6419 ~ 6430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00216-022-04217-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohno Marumi, Sagata Masataka, Sekiya Toshiki, Nomura Naoki, Shingai Masashi, Endo Masafumi, Kimachi Kazuhiko, Suzuki Saori, Thanh Nguyen Cong, Nakayama Misako, Ishigaki Hirohito, Ogasawara Kazumasa, Itoh Yasushi, Kino Yoichiro, Kida Hiroshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Assessing the pyrogenicity of whole influenza virus particle vaccine in cynomolgus macaques	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 787 ~ 794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2022.12.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 B. Gowda Siddabasave Gowda, Gowda Divyavani, Ohno Marumi, Liang Chongsheng, Chiba Hitoshi, Hui Shu-Ping	4. 巻 32
2. 論文標題 Detection and Structural Characterization of SFAHFA Homologous Series in Mouse Colon Contents by LTQ-Orbitrap-MS and Their Implication in Influenza Virus Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society for Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 2196 ~ 2205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jasms.1c00138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Marumi, Kakino Akemi, Sekiya Toshiki, Nomura Naoki, Shingai Masashi, Sawamura Tatsuya, Kida Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Critical role of oxidized LDL receptor-1 in intravascular thrombosis in a severe influenza mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95046-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gowda Divyavani, Ohno Marumi, B. Gowda Siddabasave Gowda, Chiba Hitoshi, Shingai Masashi, Kida Hiroshi, Hui Shu-Ping	4. 巻 11
2. 論文標題 Defining the kinetic effects of infection with influenza virus A/PR8/34 (H1N1) on sphingosine-1-phosphate signaling in mice by targeted LC/MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99765-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Marumi, Sasaki Michihito, Orba Yasuko, Sekiya Toshiki, Masum Md. Abdul, Ichii Osamu, Sawamura Tatsuya, Kakino Akemi, Suzuki Yasuhiko, Kida Hiroshi, Sawa Hirofumi, Shingai Masashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Abnormal Blood Coagulation and Kidney Damage in Aged Hamsters Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2137 ~ 2137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13112137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Marumi Ohno, Hiroshi Kida
2. 発表標題 Influenza Virus Infection Causes Disorder of Energy Metabolism and Blood Coagulation
3. 学会等名 BioST2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Marumi Ohno, Siddabasave Gowda B. Gowda, Masashi Shingai, Hiroshi Kida
2. 発表標題 Characteristic lipid profiles in severe influenza
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野円実、佐瀧雅隆、遠藤昌史、鈴木紗織、伊藤靖、新開大史、喜田宏
2. 発表標題 カニクイザルにおける不活化インフルエンザウイルス全粒子ワクチンの発熱源性の解析
3. 学会等名 第26回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Marumi Ohno
2. 発表標題 Influenza virus infection causes disorder of energy metabolism and blood coagulation.
3. 学会等名 BioST2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野円実、Siddabasave Gowda B. Gowda、新開大史、喜田宏
2. 発表標題 重症インフルエンザにおけるリン脂質の代謝異常とその生理学的意義
3. 学会等名 第34回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------	---------