

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24年 5月 25日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22791744

研究課題名（和文） インフルエンザにおけるホスホリパーゼ A2 を中心とした脂質代謝制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of lipid mediator metabolism by phospholipase A₂ in influenza virus infection

研究代表者

大戸 貴代 (OHTO TAKAYO)

秋田大学 大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80511378

研究成果の概要（和文）：本研究は、インフルエンザウイルス感染における多種多様な生理活性脂質の産生を経時的に測定し、その病態への関与を明らかにしようとするものである。本研究を遂行した結果、インフルエンザ感染マウスにおいて特徴的な挙動を示す特定の生理活性脂質がその病態を抑制的に制御している可能性を見出した。この生理活性脂質は、脂質代謝酵素の一種であるホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) によって産生制御される可能性をもつ分子であり、本研究で得られた結果は、インフルエンザ感染の分子病態を解明する上で重要な知見であると言える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the contribution of bioactive lipid mediators to the pathogenesis of influenza virus, such as acute respiratory distress syndrome. From the results of lipid metabolome analysis, I found that some bioactive lipid molecules exhibit characteristic patterns in progression of the pathology, suggesting a possibility that these lipids alleviate the symptoms of the infection. In addition, I propose that an influenza virus-inducible phospholipase A₂ may regulate the production of these bioactive molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：脂質生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：脂質生物学、ホスホリパーゼ A₂、インフルエンザ、脂質メタボローム

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザウイルスに感染すると発熱・せき等の症状が認められるが、重症化すると急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) が引き起こされる。2009年現在世界的に大流行している新型インフルエンザ (2009年 H1N1 型) においても、重症化により ARDS が引き起こされる。また、2003年以来ヒトへの感染が多数報告されている H5N1 鳥インフルエンザの

死亡率は 60% を超える。この高い死亡率の主な原因も ARDS によるものである。ARDS は制御範囲を逸脱した過剰炎症で特徴づけられる急性肺損傷であるが、今までのところインフルエンザウイルスがこのような重篤な肺損傷を引き起こすメカニズムに関しては不明な点が多い。

(2) 申請者はこれまで、リン脂質代謝酵素

の一種であるホスホリパーゼ A₂(PLA₂, phospholipase A₂)遺伝子群(細胞質型 PLA₂δ, ε, ζ)の同定ならびに機能解析に関する研究に従事し(*J. Biol. Chem.*, 2005)、細胞質型 PLA₂においては精子成熟に必須な脂質代謝物の産生に寄与していることを明らかにした。ほ乳類においては、これら3分子種を含め6分子種の細胞質型 PLA₂が知られている。細胞質型 PLA₂αに関しては、これまで遺伝子欠損マウスを用いた研究が精力的に進められ、急性呼吸不全、喘息、肺線維症等の炎症性呼吸器疾患の発症に関与していることが知られている(*Nat. Immunol.*, 2000, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2002)。また、プロスタグランジン (PGs)産生を PLA₂の下流で直接制御しているシクロオキシナーゼ2 (COX-2) 遺伝子欠損マウスやその特異的阻害剤の投与によりインフルエンザ感染症状が軽減するとの報告がなされている(*J. Immunol.*, 2005, *PNAS.*, 2008)。

(3) 申請者は、インフルエンザ感染に伴い著しく発現上昇する誘導性PLA₂(inducible PLA₂)を見出した。このとき、炎症性呼吸器疾患との関連が報告されている細胞質型PLA₂αの発現変動は認められておらず、新たな生理活性脂質産生パスウェイの可能性が強く示唆される結果である。すなわち、induciblePLA₂をはじめとしたPLA₂による脂質代謝パスウェイがインフルエンザ感染において重要な役割を果たしていることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、induciblePLA₂ 遺伝子欠損マウスの解析、*in vivo* マウス ICU インフルエンザモデル、ならびに質量分析計による脂質メタボローム解析を組み合わせた研究アプローチにより、インフルエンザウイルス感染における induciblePLA₂ をはじめとした脂質代謝パスウェイの役割、意義を明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

本研究の目的は、インフルエンザウイルス感染の分子病態を induciblePLA₂ による生理活性脂質産生制御の視点から時空間的に解明することである。具体的には、以下の項目に関して解析を進める。

(1) induciblePLA₂ をはじめとする脂質代謝酵素・受容体遺伝子発現の経時的変動解析

各種関連遺伝子のインフルエンザ感染肺における転写発現変動をマイクロアレイ法もしくは定量的 PCR 法によって解析、病態との関連が推察される遺伝子を絞り込む。さらに

後述する脂質メタボローム解析の結果とあわせ、インフルエンザ重症化に関与している生理活性脂質代謝パスウェイを推察する。加えて、経時的なサイトカイン産生のプロファイルを定量的 PCR 法・ELISA 法などによって測定し、免疫応答の解析をすすめる。

(2) 質量分析計を用いた脂質メタボローム解析

インフルエンザウイルス感染肺における生理活性脂質産生プロファイルを、質量分析計を用いた脂質メタボローム解析により得る。現在までに、1000 種以上の脂質及び 300 種以上の脂質酸化代謝物の一斉解析が可能である。質量分析計による代謝物測定は、複数の分子種の一斉定量が可能であるだけでなく、従来から行われている ELISA 法による生理活性脂質測定法と比較して、その特異性においても優れている。

(3) *in vivo* 機能解析

in vivo マウスインフルエンザウイルス経気道感染モデルにおける、ウイルス感染に伴った生存率の低下、体重減少、ウイルス RNA の増加、サイトカインの産生亢進、肺病理所見の増悪化の解析を行う。加えて、induciblePLA₂ をはじめとする感染制御への寄与が考えられる遺伝子欠損マウスの解析も進める。

(4) *in vitro* 機能解析

個々の細胞種ごとのインフルエンザ感染における応答性の特徴を知るため、*in vitro* でのインフルエンザウイルス感染実験系を確立する。具体的には、マウス胎児繊維芽細胞、腹腔内/肺胞マクロファージ、肺胞上皮細胞等で検討する。

(5) PLA₂ 代謝系の人為的制御によるインフルエンザ治療薬としての可能性の検討

感染に伴い変動が認められた脂質代謝物に関し、代謝制御を行っている酵素の阻害剤・活性化剤、受容体拮抗薬、またはその合成アナログなどの治療薬としての可能性を検討する。

4. 研究成果

本研究を遂行するにあたり、*in vivo* マウスインフルエンザウイルス経気道感染モデルを確立した。確立したマウスモデルでは、ウイルス感染に伴った生存率の低下、体重減少、ウイルス RNA の増加、サイトカインの産生亢進、肺病理所見の悪化、ならびに呼吸機能の悪化が認められる。

(1) 転写発現変動解析

インフルエンザ感染マウス肺における経時的な転写発現プロファイルをマイクロアレイ法・定量的PCR法により明らかとした。すでに見出していたinduciblePLA₂の発現誘導は、感染後2日目に最大となることがわかった。インフルエンザウイルスの増殖をウイルスRNA量の測定によって定量した結果、指数関数的な増加が感染後2日目をピークに誘導されていることがわかった。また、インターロイキン-6やインターフェロン-γなどの炎症性サイトカインやケモカインの発現誘導も感染後36時間から48時間をピークに認められた。induciblePLA₂の発現誘導はウイルス感染を伴わない肺障害モデルでは認められないことから、インフルエンザウイルス感染特異的な応答であると考えられる。

(2) 質量分析計による脂質メタボローム解析

インフルエンザ感染マウス肺における経時的な生理活性脂質産生プロファイルを明らかとした。本研究で測定した生理活性脂質は、InduciblePLA₂が産生制御する高度不飽和脂肪酸(PUFA)の酸化物約300種である。急性呼吸不全、喘息、肺線維症等の炎症性呼吸器疾患の発症において重要な役割を果たしているプロスタグランジン類の産生は、その前駆体であるアラキドン酸産生が主にcPLA₂αによって制御されていることで初期の律速段階となっていること知られている。本研究では、プロスタグランジン類などの生理活性が知られている分子群に加え、その中間代謝物や機能未知のPUFA酸化物を含む生理活性脂質類を質量分析計により一斉定量した。ウイルスの指数関数的な増殖のピークが認められる感染後2日目までに、炎症反応を誘導する複数の生理活性脂質の産生が増加していた。一方、複数のPUFA代謝物で、インフルエンザウイルス感染群で産生が抑制されていた。

(3) *in vitro*感染実験系の確立

細胞種ごとのインフルエンザ感染における応答性の特徴を知るために*in vitro*感染実験系の確立に着手し、マウス胎児繊維芽細胞、チオグリコレート誘導性腹腔内マクロファージ、ヒト肺上皮細胞株(A549)の3種の細胞種を用いた実験系の確立に成功した。これらの実験系を用い、インフルエンザウイルス感染後のinduciblePLA₂の発現誘導を検討した。その結果、いずれの細胞種においても定常状態では検出限界以下であったinduciblePLA₂の発現がウイルス感染依存的に誘導されること

がわかった。マウス胎児繊維芽細胞とチオグリコレート誘導性腹腔内マクロファージでは、感染後6~12時間に発現誘導のピークが存在し感染後24時間後には定常状態レベルまで戻るのに対し、ヒト肺上皮細胞株(A549)では感染後24~48時間後まで断続的に発現が維持されていた。

(4) 生理活性脂質のインフルエンザ治療薬としての可能性の検討

感染に伴い変動が認められた脂質代謝物と代謝制御を行っている酵素の阻害剤、脂質代謝物の受容体作動薬・拮抗薬などの治療薬としての可能性を検討した。インフルエンザウイルスの経気道投与時に各種薬剤を腹腔内に投与し体重減少と生存率の変化を追った。しかしながら、コントロール群(インフルエンザ感染+溶媒投与)と比較して生存率やその他の病理所見に顕著な違いは認められなかった。薬剤投与のタイミングや投与方法、また再現性を含めさらなる検証が必要である。

今後の展望

(1) induciblePLA₂遺伝子欠損マウスの樹立と解析

induciblePLA₂の生体内での機能を解析するために、その遺伝子欠損マウスの樹立を目指す必要がある。

(2) 生理活性脂質産生・標的細胞の特定

細胞レベルでの宿主免疫応答の解明のために、生理活性脂質産生細胞の特定が重要である。今後、インフルエンザウイルス感染肺より自動磁気細胞分離装置による細胞種の分離精製を行うことで、生理活性脂質産生・標的細胞の特定を目指す必要がある。

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3件)

① Kuba K, Imai Y, Ohto-N T, Penninger JM
Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. 査読あり
Pharmacol. Ther. (2010) 128, 119-128

② Imai Y, Kuba K, Ohto-N T, Penninger JM
Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. 査読あり
Circ. J. (2010) 74, 405-410

③ 今井由美子, 大戸貴代, 久場敬司
新型インフルエンザと acute respiratory distress syndrome (ARDS) 査読なし

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大戸 貴代 (OHTO TAKAYO)

秋田大学 大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 80511378

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :