

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591477

研究課題名(和文) インフルエンザとエイズ感染の重症化を決定する致死的宿主応答因子の解析と治療法開発

研究課題名(英文) The analysis of host response determining the severe influenza and HIV infection.

研究代表者

矢野 仁康(yano, mihiro)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：40304555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ感染重症化で認められる末梢の血管内皮細胞の障害に基づく血管透過性亢進状態は、ウイルス感染による細胞間の結合破綻に基づく。本研究では、A型インフルエンザウイルスによる血管内皮細胞の透過性亢進についてのメカニズム解析を行った。インフルエンザ感染により、血管内皮細胞間の接着結合に重要なβ-カテニンの減少に伴う血管透過性の亢進が認められた。β-カテニンのN末のリン酸化はプロテアソームによる分解を誘導するため、リン酸酵素であるGSK-3βをRNAiでノックダウンして検討を行ったところ、インフルエンザウイルス感染によるGSK-3βに依存したβ-カテニンの分解と血管透過性の亢進が認められた。

研究成果の概要(英文)：The vascular endothelial cell hyperpermeability seen in severe influenza is based on the disruption of adherence junctions between cells by influenza virus infection. In this study, we have shown the mechanisms of hyperpermeability of human vein endothelial cells infected with influenza A virus (PR8). The levels of beta catenin, a key regulatory component of the endothelial-cadherin cell adhesion complex, were markedly decreased during infection with increment of vascular hyperpermeability. Since the N-terminus phosphorylation of beta-catenin by GSK-3beta is the initiation step of proteasome-dependent degradation, we examined the effects of GSK-3beta suppression by RNAi. IAV infection-induced beta-catenin degradation was significantly inhibited in GSK-3beta-knockdown cells. These findings suggest that IAV infection induces GSK-3beta-mediated beta-catenin degradation in the adherence junctions and induces vascular hyperpermeability.

研究分野：医歯薬学

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：インフルエンザ脳症 エイズ脳症 高病原性鳥インフルエンザ プロテアーゼ ストレス蛋白質

1. 研究開始当初の背景

感染症において、ウイルス等病原体の侵入に対する宿主応答は、その重症化や予後を決定づける極めて重要な生体防御反応である。例えば、インフルエンザの場合、毎年、わが国では数百万人以上の人々が罹患するが、同じウイルスに感染しても時として重症化し死に至るケースが問題となる。重症化した患者に、変異等で突然強毒化したウイルスが感染したとは考え難く、この原因は、ウイルスに対する宿主の応答性の違いによるものと考えられる。この場合、感染に対する宿主応答としての多量の炎症性サイトカインの放出が、脳を始めとする全身局所で強い炎症反応を引き起こす事(サイトカインストーム)が原因と考えられているが、未だその詳細は判っておらずその分子メカニズムの解明が待たれている。

2. 研究の目的

インフルエンザ感染症は、新型ウイルスの流行や高病原性鳥型ウイルスの人への感染の報告から、近い将来そのパンデミックの到来が危惧され、最近の新興再興感染症の中でも最も重要かつ早急な克服課題となっている。一方、エイズ脳症は、エイズ感染末期に高頻度に認められる中枢神経障害を伴う重篤な合併症で、エイズ治療、対策の中で未だに具体的な治療法が明らかにされていない重要な研究課題である。本研究の目的は、近年、社会的にも問題となっているこれら感染症の重症化(多臓器不全並びに脳症)機構を、ウイルス感染に重要と考えられている宿主側の応答反応から明らかにする事で、その治療法開発を目指す事にある。

3. 研究の方法

インフルエンザ脳症や感染に伴う肺水腫はインフルエンザを重症化させる。これらは、ウイルス感染により何らかの機序で、全身局所での血管透過性が亢進するためと考えられてきたが未だその詳細は分かっていない。そのため、インフルエンザウイルス感染による末梢での血管内皮細胞の障害に基づく血管透過性亢進機構を明らかにすることは、重症化インフルエンザの病態解明やその治療法を確立する上で極めて重要な意味を持つ。血管内皮細胞では、接着結合(アドヘレンスジャンクション)の破綻が、血管内皮細胞の透過性亢進に重要となるので、本研究ではまず、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)培養系を用いて、インフルエンザウイルス感染による血管内皮細胞間の接着結合構築障害機構について

の解析を行った。実験は、HUVECをA型インフルエンザウイルス(PR8株)をMOI1で感染させた後、 β -cateninやVE-cadherin等の接着結合構成タンパク質及び血管内皮細胞間の透過性に与える影響について検討を行った。これらin vitroでの実験に加えて、マウスを用いたin vivo解析を行いインフルエンザウイルス感染による血管内皮細胞障害機構について検証を行った。

ウイルス感染による接着結合構成タンパク質の相互作用に与える影響の検討：接着結合が維持されるためには、通常 β -cateninとVE-cadherinの結合が重要と考えられている。インフルエンザウイルスは、プロテアソームによる β -cateninの分解を誘導していることから、感染によるGSK3-の活性化及び β -cateninのリン酸化に着目して解析を行った。

血管内皮細胞間の透過性亢進についての検討：ウイルス感染による血管内皮細胞障害に基づく血管内皮細胞間の透過性の亢進は、経内皮細胞電気抵抗(TEER)から計測を行った。

血管内皮細胞障害のin vivo解析：PR8をマウスに経鼻感染させた後に、浮腫化した肺組織での接着結合構成タンパク質に与える影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) A型インフルエンザウイルスは、HUVECにおいて接着結合構成タンパク質 β -cateninの発現を著しく減少させる：HUVECをPR8で1時間感染させた後28時間後に、タンパク質とRNAを抽出し、 β -cateninの発現量をウエスタンブロットング並びにRT-PCRにて検証した。PR8は、HUVECでの β -cateninのタンパク質発現量を著しく減少させたが、mRNAの発現量には殆ど影響を与えなかった。これらの結果により、PR8は、HUVECにおいて β -cateninの分解を誘導している可能性が示唆された。

(2) ラクタシスチンは、PR8による β -catenin分解誘導を抑制する：プロテアソーム阻害剤のラクタシスチン(2 μ M)でHUVECを処理すると、PR8による β -cateninの発現量低下が抑制された事により、PR8は、プロテアソームによる β -cateninの分解を誘導していることが示唆された。

(3) PR8はHUVECにおいてGSK3-を活性化させる： β -cateninのプロテアソームによる分解には、 β -cateninのN末がリン酸化が必要となる。PR8が、 β -cateninリン酸化酵素GSK3-を活性化し、実際に β -cateninがリン酸化されているか否かについて検討をおこなった。その結果、PR8は、HUVECにおい

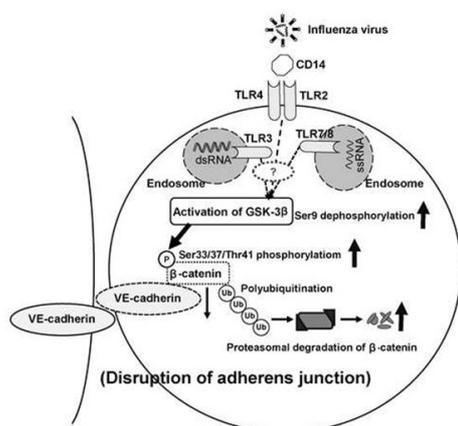
て非感染細胞に比べて活性型 GSK3- (9番目のセリンの脱リン酸化型)を誘導していることが明らかになった。

(4) GSK3- ノックダウンは、PR8 による -catenin の発現抑制を阻害する：HUVEC において、RNAi により GSK3- の発現量を特異的に減少させた所、PR8 による -catenin の発現低下が著しく抑制された。これらの結果より、PR8 は、GSK3- 依存的に -catenin のプロテアソームによる分解を誘導していることが明らかとなった。

(5) -catenin の強制発現は、PR8 による血管内皮細胞障害(血管内皮細胞間透過性亢進)を保護する：HUVEC を、コラーゲンコートしたセルカルチャーインサート上にコンフルエントの状態まで培養後、PR8 に感染させ 24 時間後に Millicell-ERS を用いて TEER の測定を行った。PR8 感染で TEER の著明な低下が認められ、感染による血管内皮細胞間の透過性の亢進が認められた。一方、リコンビナント -catenin を強制発現させた HUVEC では、TEER の低下が抑制された。

(6) PR8 感染マウス肺での GSK3- の活性化及び -catenin 発現量の低下：マウスに PR8(100PFU)を経鼻感染させ、1~6 日後に浮腫化した肺を各々ホモゲナイズしてタンパク質の抽出を行った。 -catenin の発現と GSK3- の活性化状態をウエスタンブロッティングにて検証した。その結果、PR8 感染によりマウス肺における GSK3- の活性化及び -catenin 発現量の低下が確認された。

以上の結果から、A 型インフルエンザウイルスは、血管内皮細胞において、接着結合構成分子である -catenin のプロテアソームによる分解を誘導することで血管内皮細胞間の透過性を亢進させていることが明らかとなった。以上の成果を下記モデル図 1 に示す。



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 7 件)

1. H Endo, M Yano, Y Okumura, H Kido. Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. 2014. **Cell Death and Disease** Jan 30;5:e1027. 査読有
2. M Inoue, K Yasuda, H Uemura, N Yasaka, H Inoue, A Schnauffer, M Yano, H Kido, D Kohda, H Doi, T Fukuma, A Tsuji, N Horikoshi. Trypanosoma brucei 14-3-3I and II proteins predominantly form a heterodimer structure that acts as a potent cell cycle regulator in vivo. 2013. **J Biochem**. May;153(5):431-439. 査読有
3. C Fujimoto, N Takeda, A Matsunaga, A Sawada, T Tanaka, T Kimoto, W Shinahara, T Sawabuchi, M Yamaguchi, M Hayama, H Yanagawa, M Yano, H Kido. Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adults. 2012. **Influenza Other Respi Viruses**. Nov;6(6):396-403. 査読有
4. H Kido, Y Okumura, E Takahashi, HY Pan, S Wang, D Yao, M Yao, J Chida J, M Yano. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. 2012. **Biochim Biophys Acta**. Jan;1824(1):186-94. 査読有
- 5 矢野仁康 木戸博. インフルエンザ重症化と脳症の分子機構 2011 化学療法の本 (医薬ジャーナル社). Vol.27.No.12. 54-60. 査読無
6. H-P Pan, M Yano, H Kido. Up-regulation of ectopic trypsins in the myocardium by influenza A virus infection triggers acute myocarditis. 2011. **Cardiovasc Res**. 89. 595-603. 査読有
- 7 D Mizuno, T Kimoto, T Takei, A Fukuta, W Shinahara, T Takahashi, M Yano, H Kido. Surfactant protein C is an essential constituent for mucosal adjuvanticity of

Surfacten, acting as an antigen delivery vehicle and inducing both local and systemic immunity. 2011. **Vaccine** 26:5368- 5679, 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 日吉 峰麗 矢野 仁康、木戸 博 インフルエンザ感染の重症化促進因子、血管内皮細胞の細胞間接着に与えるウイルス感染と解熱剤の障害促進効果の解析 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 京都
2. 日吉 峰麗 矢野 仁康、木戸 博 ヒト内皮細胞に感染したインフルエンザウイルスは、アドヘレンスジャンクションの崩壊を誘導する 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 福岡
3. 矢野 仁康 酵素と感染症：タンパク質分解酵素によるインフルエンザ重症化機序 日本栄養・食糧学会第 52 回近畿支部大会 招待講演 2013 年 彦根

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野仁康 (YANO Mihiro)
滋賀県立大学・人間文化学部・生活栄養学
科・教授
研究者番号：40304555

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

木戸博 (KIDO Hiroshi)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・特任
教授
研究者番号：50144978

千田淳司(CHIDA Junji)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号：20437651