

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659841
 研究課題名（和文）インフルエンザ誘発劇症型ARDS発症へのクローディン接着分子ネットワークの関与
 研究課題名（英文）Involvement of claudin-network in the development of ARDS caused by influenza virus infection
 研究代表者
 川上 和義（KAWAKAMI KAZUYOSHI）
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：10253973

研究成果の概要（和文）：

劇症型ARDSモデルマウスを用いて、発症病態へのClaudinの関与を検討した。リアルタイムPCRで、傷害肺においてClaudin 2、4の発現が亢進し、Claudin 5、6、9、18-1の発現が低下した。病理では、気道上皮細胞でClaudin 2、4の発現が強く認められた。Claudin 4遺伝子欠損マウスではLPSによる肺水腫が悪化する傾向がみられた。これらの結果から、劇症型ARDSの発症にClaudinsが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We addressed the possible involvement of claudins in the development of acute lung injury. In a real-time PCR analysis, expression of claudin 2 and 4 was increased in the injured lungs, whereas that of claudin 5, 6, 9 and 18-1 was reduced. In an immunohistochemical analysis, expression of claudin 2 and 4 was detected in the bronchoepithelial cells of injured lungs. Lung edema caused by LPS administration tended to be worsened in claudin 4 gene-disrupted mice. These results suggest that claudins may be involved in the development of ARDS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：ARDS、インフルエンザ、タイトジャンクション、クローディン

1. 研究開始当初の背景
 急性呼吸促迫症候群（Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS）は肺の炎症と血管透過性の亢進を特徴とし、肺におけるガス

交換の障害を呈する疾患で、致死率も高く、有効な治療も限られている。高病原性トリインフルエンザウイルス（A/H5N1）感染によって短期間に劇症型ARDSが誘発され60%もの高

死亡率が世界的な大きな社会問題となっている。A/H5N1 インフルエンザウイルス感染症では、ヒト血清中の interferon (IFN) - γ 、tumor necrosis factor (TNF) - α 、IL-6 などの炎症性サイトカインの上昇が知られている。また、種々の原因による早期 ARDS 患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中で、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 の上昇を認めると報告されており、これらの炎症性サイトカインが ARDS の発症機序において重要な因子であると考えられてきた。我々は、ベトナムでの臨床研究によってその病態に関与する因子の解析を行ってきた (Jpn. J. Infect. Dis. 61: 157-160, 2008; J. Infect. Dis. 200: 510-515, 2009)。

ARDS は非心原性に起こる肺水腫であり、急激な炎症により透過性の高まった血管から炎症細胞や液性成分が肺胞上皮細胞間隙を経て肺胞腔へ浸出する病態である。しかし、生理状態下では、肺胞上皮細胞間のタイトジャンクション (TJ) がバリアとなり、恒常的に呼吸スペースが確保されている。近年、わが国の研究者が中心となって TJ の分子機構の研究が急速に進展し、その構築に重要な分子群が見出されてきた。その中で、クローデイン (Claudin) は中心的な役割を担っている。現在少なくとも 24 種類が知られているが、臓器によって発現が異なる (Oncogene 27: 6930-6938, 2008)。ARDS の病態を考えると、TJ、特に Claudin の重要性が想像に難くないが、その研究はまだ途についたばかりである (Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 297: 217-218, 2009)。

2. 研究の目的

申請者らは、インフルエンザウイルス A/H1N1 の感染によって劇症型の急性肺傷害を起こす ARDS モデルマウスの作製に成功し

ており、炎症細胞及びサイトカイン・ケモカインと病態との関連性について解析を行っている (Microbiol. Immunol. 56: 171-182, 2012)。さらに、NKT 細胞の活性化により感作されたマウスの気道内に LPS を投与することで、激しい急性肺傷害をとめない致死的経過を示す劇症型 ARDS モデルマウスの作製にも成功している (Int. Immunol. 23: 97-108, 2011)。本研究では、これらのモデルを用いることで、インフルエンザ誘発劇症型 ARDS の発症病態における Claudin の関与とともに、炎症細胞やサイトカインによる制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) インフルエンザウイルス感染モデル

Balb/c または C57BL/6 マウスにインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR-8 株) を経鼻または直接気管内に投与することで感染させた。感染肺を経時的に摘出し病理学的解析を行うとともに、抽出した RNA からリアルタイム RT-PCR にて Claudin 2、4、5、6、9、18-1 の mRNA の発現を解析した。さらに、感染 7 日後の肺に対し免疫染色にて Claudin 2、4 の発現を検討した。

2) LPS 誘発劇症型 ARDS モデル

C57BL/6 マウスの気管内に NKT 細胞の活性化剤である α -galactosylceramide を投与し、24 時間後に LPS を同じく気管内に投与することで劇症型 ARDS のモデルマウスを作製した。一方、コントロールとして、 α -galactosylceramide の代わりに PBS を投与し、同じように 24 時間後に LPS を気管内投与したマウスを作製し、コントロール群とした。これらのマウスから、経時的に肺ホモジネート、BALF、末梢白血球を採取し、抽出した RNA からリアルタイム RT-PCR にて Claudin 2、4、5、6、9、18-1 の mRNA の発現を解析した。さらに、

感染7日後の肺に対して、免疫組織化学染色にて、気管支上皮細胞や炎症細胞におけるClaudin 2、4の発現を検討した。

ARDSの発症病態におけるClaudin 4の役割を調べるために、遺伝子欠損(Claudin 4KO)マウス(大阪大学 月田早智子教授より分与)と野生型マウスの気管内にLPSを投与し、肺水腫の指標として48時間後の肺湿乾重量比を検討した。

3) インフルエンザ誘発肺線維化モデル

C57BL/6マウスに非致死量のインフルエンザウイルスを経気道感染させ、経時的に肺を摘出し、病理学的解析を実施した。肺線維化の評価のためにマッソントリクローム染色を行った。

4. 研究成果

1) インフルエンザウイルス感染モデル

Balb/cまたはC57BL/6マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させると7日後に劇症型ARDSを発症した。Balb/cマウスを用いたモデルでは、感染肺のリアルタイムPCR解析で、Claudin 2、4の発現が亢進し、Claudin 6、9、18-1の発現が低下した。一方、C57BL/6マウスを用いたモデルでは、感染肺の免疫組織染色で、7日後の気管支上皮細胞、血管内皮細胞でClaudin 2の発現を認め、気管支上皮細胞では非感染例と比較すると低下傾向を示した。Claudin 4は気管支上皮下の基底膜、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞に発現がみられ、非感染例と比較していずれの細胞でもClaudin 4の発現増強を認めた。

2) LPS誘発劇症型ARDSモデル

これまでに我々が開発したLPSとNKT細胞活性化剤を用いた劇症型ARDSモデル(Int. Immunol. 23: 97-108, 2011)で肺組織、BALF、末梢血白血球におけるClaudin 2、4、5、18-1の発現をリアルタイムPCRにて解析したとこ

ろ、肺組織でClaudin 4の発現が亢進し、Claudin 5、18-1の発現が低下した。興味深いことに、BALF細胞や末梢血白血球にもClaudinの発現を認め、発現の推移が肺組織とは異なっていた。特に、末梢血白血球において、Claudin 2の発現が著明に増加し、Claudin 5、18-1の発現が有意に低下した。このように、BALF細胞、肺組織、末梢白血球細胞のClaudinの発現が経時的に異なるパターンを示していることから、定常状態で気道上皮に発現しているClaudinと炎症細胞に発現しているClaudinの役割が異なっている可能性が示唆された。一方、Claudin-2、4の発現分布を調べるために、ARDSマウスとコントロールマウスの肺病理標本を用いて各種Claudinに対する抗体による免疫組織化学染色を試みたところ、気道上皮細胞での発現には両マウス間で明らかな違いはみられなかった。

Claudin 4KOマウスを用いた解析では、LPS投与48時間後の肺湿乾重量比が、野生型マウスに比べ有意差はないものの増加する傾向が認められた。今後、さらに詳細な解析を行うとともに、Claudin 18KOマウスを用いた検討も実施する予定である。

1)、2)の結果から、劇症型ARDSの発症にClaudinsが深く関与する可能性が示唆された。

3) インフルエンザ誘発肺線維化モデル

非致死量のインフルエンザウイルスA/H1N1(PR8株)をマウスに経気道感染させたところ、感染7~10日頃をピークに肺内での炎症性サイトカイン産生と急性肺傷害が起こり、その後炎症の軽減とともに肺の線維化を発症した。これは、インフルエンザウイルス感染にともなう肺線維化機序を解析する上で有用なモデルになり得ると考えられた。今後は、Claudinsの関与について詳細な

検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Kudo D, Toyama M, Aoyagi T, Akahori Y, Yamamoto H, Ishii K, Kanno E, Maruyama R, Kaku M, Kushimoto S, Kawakami K: Involvement of High Mobility Group Box 1 and the therapeutic effect of recombinant thrombomodulin in a mouse model of severe acute respiratory distress syndrome, Clin. Exp. Immunol. in press, 2013. doi: 10.1111/cei.12106 (査読有り)

2. Kudo D, Uno K, Aoyagi T, Akahori A, Ishii K, Kanno E, Maruyama R, Kushimoto S, Kaku M, Kawakami K: Low-dose interferon- α treatment improves survival and inflammatory responses in a mouse model of fulminant acute respiratory distress syndrome, Inflammation, in press, 2013. doi: 10.1007/s10753-013-9607-1 (査読有り)

3. Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, Suzuki K. Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. Microbiol. Immunol. 56: 171-182, 2012. (査読有り)

4. 工藤大介, 久志本成樹, 川上和義: 病態生理, 第2章 病理・病態生理「新しい診断と治療のABC 肺炎 改訂第2版」, 最新医学別冊, 最新医学社, 39-45, 2011. (査読無し)

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 工藤大介, 外山真彦, 石井恵子, 久志本成樹, 川上和義: マウス劇症型 ARDS モデル

に対する rTM の治療効果とその作用機序, 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013 年 5 月 31 日~6 月 1 日.

2. Kudo D, Ishii K, Kushimoto S, Kawakami K: Contributions of High Mobility Group Box 1 in experimental fulminant acute respiratory distress Syndrome, 7th Congress of the International Federation of Shock Societies and 35th Annual Conference on Shock, Miami Beach, FL, USA, 2012 年 6 月 9 日~13 日.

3. Kudo D, Uno K, Ishii K, Kushimoto S, Kawakami K: Anti-inflammatory and therapeutic effects of interferon- α in a mouse model of acute respiratory distress syndrome, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011 年 11 月 27 日~29 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 和義 (KAWAKAMI KAZUYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10253973

(2) 研究分担者

鈴木 和男 (SUZUKI KAZUO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号: 20192130

(3) 連携研究者

青柳 哲史 (AOYAGI TETSUJI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 50581609