

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3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790445
 研究課題名（和文） インフルエンザウイルス感染に伴発する細菌性肺炎のエピジェネティクス解析
 研究課題名（英文） The epigenetic analysis of secondary bacterial pneumonia following influenza virus infection
 研究代表者
 伊藤 利洋（ITO TOSHIHIRO）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
 研究者番号：00595712

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザウイルス感染症における死亡原因として、インフルエンザウイルス感染に伴発する二次性細菌性肺炎が大きな要因である。研究者は網羅的遺伝子解析にて、ウイルス防御に必須なサイトカインであるType I Interferon (IFN-I)やインフルエンザウイルスの刺激を受けた気道上皮細胞ならびにマクロファージは遺伝情報を抑制する酵素の一つであるSET domain, bifurcated 2 (SETDB2)が上昇することを見出した。その上昇はIFN-I依存性で、IFN-Iのレセプター欠損マウスでは、SETDB2の上昇は見られず、二次性細菌性肺炎モデルでは、野生型マウスと比較して有意な生存率の改善を認めた。以上からSETDB2を制御することにより二次性細菌性肺炎の予防につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The main cause of death in influenza viral infection is secondary bacterial pneumonia. The expression of SET domain bifurcated 2 (SETDB2), an enzyme which leads to gene depression, was increased in both macrophages and bronchial epithelial cells, followed by type-I interferon (an essential cytokine against viral infection) and influenza viral stimulation itself. The expression of SETDB2 is type-I interferon (IFN-I) dependent, and IFN-I receptor knockout mice improved a significant survival compared with wild-type mice in secondary bacterial infectious model. These results suggest that SETDB2 has the potential to be a clinical key to prevent secondary bacterial pneumonia following influenza viral infection.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：インフルエンザウイルス、エピジェネティクス、気道上皮細胞、マクロファージ、細菌性肺炎

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザウイルスは、毎年感染流行を起こし、社会活動に大きな影響を与えている。昨年(2009年)は、新型インフルエンザが発生し、世界中で猛威を振るったのは我々の記憶に新しい。インフルエンザウイルス感染単独による死亡率は低いものの、インフルエンザウイルス感染症は細菌性肺炎などの二次感染の危険性を高め、二次感染を併発すると死亡率は飛躍的に上昇する。ウイルス感染時に誘導される Type I Interferon (IFN-I) は、ウイルス複製の抑制することで細胞のウイルス抵抗性を上昇させたり、NK細胞を活性化させウイルス感染細胞を除去する。一方、IFN-Iは細菌性肺炎などの二次感染に対しては、易感染性を誘発し死亡率を上昇させる (Sun K, *Nat. Med.* 14: 558, 2008)。申請者は肺感染症モデルを用いた自然免疫(マクロファージ)ならびに獲得免疫(T細胞)の分野で研究を展開してきた (*J. Clin. Invest.* 119: 33, 2009; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180: 1227, 2009; *Eur. J. Immunol.* 37: 2847, 2007)。近年、ヒストンの化学修飾は、転写制御やその維持、DNA修復などに深く関わっており、あらゆる生命現象の調節に関わりうる分子機構として、特にヒトの健康や疾患を考える観点からも、その状態を明らかにすることが重要となってきた。

(2) ウイルスおよび細菌感染時に生体防御に重要な役割を果たすのは、自然免疫を担うマクロファージである。マクロファージを除去するとインフルエンザウイルス感染や細菌感染には易感染性となる (Tate MD, *J. Virol.* 84: 7569, 2010; Zhang Z, *J. Clin. Invest.* 119: 1899, 2009)。マクロファージはウイルス感染に対してIFN-Iを産生し、オートクリンに自らを刺激し抗ウイルス作用を発揮する。しかし、細菌二次感染時には免疫抑制状態に陥り、細菌排除機構が作用しないことが示唆されている。申請者は一連の研究を通して、インフルエンザウイルス感染時に産生されるIFN-Iはマクロファージにヒストン化学

修飾を誘導し、細菌感染時に生体防御に必要なサイトカインの産生や食食作用に関わる因子の転写制御が抑制されるのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルス感染に併発する細菌性肺炎は致死的であるが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、初動感染免疫に重要な役割を果たすマクロファージに焦点をあて、エピジェネティクスの観点から、インフルエンザウイルス感染に併発する細菌感染への免疫力低下のメカニズムを明らかにする。

- (1) インフルエンザウイルス感染におけるヒストン化学修飾の役割
- (2) ヒストン化学修飾による細菌感染抵抗力低下の分子基盤解明
- (3) ヒストン化学修飾によるマクロファージ食食能制御機構
- (4) インフルエンザ感染モデルにおける呼吸器免疫ネットワークの解明

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス感染に伴うヒストン化学修飾によるマクロファージの遺伝子発現機構を明らかにする。

① マウス骨髄よりマクロファージを誘導し、インフルエンザウイルス刺激後のマクロファージのRNAを回収し、ヒストン化学修飾に関わる酵素の同定をマイクロアレイ法 (Superarray System – Mouse epigenetic Chromatin Modification Enzymes) にて解析する。

② マクロファージに対して、同定された酵素を siRNA システムを用いて、ノックダウンを行い、インフルエンザウイルス刺激後の各種サイトカイン (IFN-I: IFN- α , IFN- β) の測定ならびに、IFN-I により誘導され抗ウイルス作用を発揮する ISG (IFN-stimulated gene) の発現を調べる。

③ クロマチン免疫沈降 (ChIP: chromatin immunoprecipitation) 法により、インフルエンザウイルス刺激によるヒストン修飾や転写因子のクロマチン上での局在を調べる。

④ インフルエンザウイルスによる IFN-I 誘導には、Toll-like receptor 3 (TLR3) と RIG-I like receptor によるシグナル伝達が重要である (Cell. 140:805,2010)。各々の欠損マウスを用いて、マクロファージの IFN-I 産生ならびに同定酵素の発現を検討する。

(2) インフルエンザウイルス感染モデルにおけるヒストン化学修飾解析を行う

① マウスにインフルエンザウイルス肺炎を誘導し、全肺ならびに肺マクロファージを回収し、ヒストン化学修飾を誘導する酵素を superarray system、Real-time PCR、ならびに Western blotting にて解析する

② IFN- α R KO マウスにインフルエンザウイルス肺炎を誘導し、病理学的検討ならびに上記酵素の発現を野生型マウスと比較検討する。

(3) インフルエンザウイルス感染に併発する二次感染モデルの病態を明らかにし、予防ならびに治療の可能性を検討する。

ターゲット酵素のノックダウンを siRNA システムにて誘導し (Thorax. 65:334, 2010)、インフルエンザウイルス肺炎モデルマウスならびに二次性に肺炎球菌 (グラム陽性菌) の経鼻投与により、二次性細菌性肺炎を誘導し、コントロール群とノックアウト群とのマウス死亡率を比較する。また病理組織・肺内炎症細胞分画・サイトカイン産生量を調べ、マウス細菌保有量を定量する。またターゲット酵素阻害剤を用いて、同様の検討を行う。

4. 研究成果

(1) はじめにマイクロアレイシステムを用いた解析にて、IFN-I またはインフルエンザウイルスの刺激を受けたマクロファージは H3K9 のメチル化 (転写抑制) を誘導する酵素の一つである SET domain, bifurcated 2

(SETDB2) の有意な上昇を認めた。さらには IFN-I レセプター欠損 (IFN- α R KO) マウスならび RIG-I like レセプター欠損 (RIG-like R KO) マウスのマクロファージでは、SETDB2 の上昇は見られなかったことから、SETDB2 の上昇は IFN-I 依存性でかつ RIG-I like レセプター依存性であった。インフルエンザウイルスで刺激した気道上皮細胞ならびにマクロファージを H3K9me3 抗体にてクロマチン免疫沈降法を行い、回収した断片化した DNA を ChIP sequencer にて解析を行っている。

(2) マウスにインフルエンザウイルス肺炎を誘導し、WT マウスでは肺における SETDB2 の有意な上昇を認めるも、IFN-I レセプター欠損 (IFN- α R KO) マウスならび RIG-I like レセプター欠損 (RIG-like R KO) マウスにおいては、SETDB2 の上昇は認めなかった。また SETDB2 の誘導による H3K9 メチル化の発現も同様の結果であった。

(3) 二次性細菌性肺炎の原因菌として最も頻度の高い肺炎球菌を用いて作成した二次性細菌性肺炎モデルでは、野生型 (WT) マウスと比較して IFN-I レセプター欠損 (IFN- α R KO) マウスでは有意な生存率の改善を認めた。サイトカイン/ケモカインの発現では、好中球遊走に必須なケモカインである CXCL1 の発現が有意に低下していた。また、SETDB2 をノックダウンした気道上皮細胞の解析では、SETDB2 ノックダウン群では H1N1 刺激後に TNF α R 発現の有意な上昇を認めた。細菌感染において TNF- α は必須なサイトカインであり、SETDB2 は TNF- α のシグナル伝達系に関与している事が示唆される。SETDB2 の in vitro (気道上皮細胞、マクロファージ) ならびに in vivo (二次性細菌性肺炎モデル) における TNF- α 産生ならびにシグナル伝達系への関与を検討中である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 伊藤利洋
エピジェネティクスを介した難治性感染症
に対する新たな治療戦略
第2回ブレインストーミングin直島
(2012年9月8日-9日)

(2) 伊藤利洋、吉村昭彦、松川昭博
The Critical Role of Spred-2 in Influenza
A Virus (H1N1)-induced Pneumonia
第40回日本免疫学会総会、千葉市美浜区、
(2011年11月27日-29日)

[その他]

ホームページ等

[http://www.okayama-u.ac.jp/user/byouri/
pathology-1/HOME.html](http://www.okayama-u.ac.jp/user/byouri/pathology-1/HOME.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 利洋 (ITO TOSHIHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
講師

研究者番号：00595712