

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591565

研究課題名(和文)ライノおよびRSウイルス感染による喘息増悪メカニズムの解析と原因ゲノムアレイ検索

研究課題名(英文) Mechanism of asthma exacerbations induced by rhinovirus and RS virus infection and its genome array analysis

研究代表者

加藤 政彦 (KATO, Masahiko)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30292593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：RSウイルス感染気道上皮を用いて、好酸球性顆粒蛋白の役割を検討した。ヒト気道上皮細胞(A549細胞)に、RSウイルスと好酸球性顆粒蛋白(MBP, EPO, ECP, EDN)を加えて実験を行った。MBPとEPOは、RSウイルス感染気道上皮の傷害と細胞死を誘導した。MBPは、RSウイルス感染A549細胞からGM-CSFとIL-17産生を亢進させ、Erk1/2, p38MAPK, JNKのリン酸化も誘導した。好酸球性顆粒蛋白、特にMBPは、RSウイルス感染気道上皮の傷害を引き起こすことから、RSウイルス感染喘息における好酸球性炎症の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of eosinophil granule proteins on bronchial epithelial cell infected with RS virus. Morphological changes in human type II pulmonary alveolar epithelial cells, A549 with RS virus and/or eosinophil granule proteins such as MBP, EPO, ECP, and EDN were observed by microscopy. Apoptosis/necrosis was evaluated by trypan blue exclusion test. We also measured 27 types of cytokines/chemokines production in supernatant of the cells and 12 types of phosphorylated proteins in the cells. MBP or EPO induced cytotoxicity and necrosis of A549 cells with RS virus. GM-CSF and IL-17 production was elevated in RS virus- and MBP-treated A549 cells. MBP induced the phosphorylation of ERK 1/2, p38 MAPK, JNK, and STAT 3 in A549 cells with RS virus. Eosinophil granule proteins specifically MBP damage RS virus-infected bronchial epithelial cells, indicating that eosinophilic inflammation might be associated with pathophysiology of RS virus-induced acute exacerbations of asthma.

研究分野：小児アレルギー学

キーワード：ウイルス感染 好酸球 気管支喘息 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 原因ウイルス

喘息を悪化させる可能性のあるウイルスとしては、ライノウイルス、Respiratory syncytial (RS) ウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、エンテロウイルスなどが報告されている (Johnston SL et al, BMJ, 1995) が、これらの中でもライノウイルスと RS ウイルスは、喘息症状を増悪させるのみならず、喘息の発症にも関与している (Lemanske RF Jr et al, J Allergy Clin Immunol, 2005; **Kato M** et al, Allergol Int, 2004)。

### (2) 喘息の病態

喘息は慢性の気道性炎症であり、種々の炎症性細胞による脱顆粒や各種のサイトカイン放出から組織を損傷し、気道過敏性の亢進をきたす。好酸球は、ロイコトリエン等の産生による気管支収縮のみならず、major basic protein (MBP)、eosinophil peroxidase (EPO) 等の顆粒蛋白を放出し気道上皮細胞を傷害する。さらに、transforming growth factor (TGF)- $\beta$  や platelet-derived growth factor (PDGF) などの増殖因子を放出し、線維芽細胞を増殖させ、気道上皮下の線維増生、平滑筋および粘膜分泌細胞の過形成などの構造的変化 (リモデリング) を起こし、不可逆的に気道閉塞が進行する。このリモデリングは、喘息の重症化、難治化の原因の一つと考えられている (Humbles AA et al. Science, 2006)。

### (3) 我々のこれまでの検討

我々は、174 例の小児喘息患者における発作時に検出されたウイルスについて解析を行ったところ、ライノウイルスおよび RS ウイルス感染が全体の約 60%を占めていることがわかった。特にライノウイルスによる喘息発作では、大発作をきたすことが少なくなく、また鼻汁および血清中 IL-5 の上昇を認め、好

酸球活性化の関与が示唆された。一方、RS ウイルスによる喘息発作の患者では、血清および鼻水中の IL-1ra の上昇を認め、ステロイドなどの治療により、低下するサイトカインパターンは、ライノウイルスと異なっていた (**加藤**, **Kato M** et al, Pediatr Allergy Immunol, 2011; **Kato M** et al, Int Arch Allergy Immunol, 2011)。また、基礎的な検討では、RS ウイルスはヒト好酸球を活性化し、その活性化の増強効果は接着分子である  $\alpha$ M $\beta$ 2 に依存していることを明らかにした (Tachibana A, Kimura H, **Kato M** et al. Intervirology, 2002)。さらに、脂質メディエーターである血小板活性化因子 (PAF) やロイコトリエンの好酸球活性化とその特異的なシグナル伝達機構についても証明した (**Kato M** et al. J Immunol, 2002; **Kato M** et al. Immunology, 2005; Yamaguchi T, **Kato M** et al. Immunol Lett, 2008)。最近では、喘息の増悪および発症における好酸球性炎症と脂質メディエーターの関連性について遺伝子改変マウスなどを用いて検討した (平成 20-22 年度学術振興会科学研究費による研究, **加藤**)。

## 2. 研究の目的

以上の研究をもとに、本研究では、ヒト気道上皮を用いたウイルス感染喘息モデルにおいて、好酸球性炎症、気道リモデリングの役割について蛋白レベルから検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

ライノウイルスまたは RS ウイルス感染喘息と好酸球顆粒蛋白との相互作用について、ヒト II 型肺胞上皮細胞 (A549) における両ウイルスの感染と、好酸球性顆粒蛋白 (MBP, MPO, ECP, EDN) を添加し、上皮傷害の測定および網羅的なサイトカイン解析を行った。また、その分子機構について検討した。

(1) 種々のウイルスの分離・精製

ライノウイルス、RS ウイルスについて、それぞれ感受性のある細胞 (Hela, HEp-2, A549 等)を用いて、増殖する。増殖したウイルスは、5,000rpm, 30 分遠心後、上清をショ糖密度勾配超遠心分離法によって精製する。

(2) ウイルス感染気道上皮細胞における好酸球性顆粒の影響

ウイルスを感染させた A549 細胞に好酸球性顆粒蛋白 (Hirohito Kita M.D., Mayo Clinic, USA から分与) を曝露し、実際の気道のウイルス感染および好酸球性炎症モデルを再現した。その後、気道上皮細胞の形態学的変化を顕微鏡で、アポトーシス/ネクローシスをトリパンブルー法にて検討した。

(3) ウイルス感染気道上皮細胞におけるサイトカイン/ケモカイン産生の解析

ウイルスと好酸球性顆粒蛋白との相互作用による気道上皮細胞の炎症機構について、27 種類のサイトカインまたはケモカイン (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, G-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IP-10, Eotaxin, FGF Basic, PDGF-bb, RANTES, VEGF) を Bio-Plex による microbeads assay (Bio-Rad) により網羅的に測定した。

(4) ウイルス感染気道上皮細胞傷害の分子機構の検討

ウイルス感染気道上皮細胞における好酸球性炎症の病態における細胞内シグナル伝達機構について 12 種類の分子 [ATF-2 (Thr71), Akt (Ser473), ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187), GSK-3 $\alpha/\beta$  (Ser21/Ser9), I $\kappa$ B- $\alpha$  (Ser32/Ser36), JNK (Thr183/Thr185), MEK1 (Ser217/Ser221), p38 MAPK (Thr180/Thr182), p70 S6 kinase (Thr421/Ser424), p90RSK

(Thr359/Ser363), Stat2 (Tyr689), Stat3 (Tyr705)] のリン酸化について、サイトカイン産生と同様に Bio-Plex による microbeads assay (Bio-Rad) にて網羅的に解析した。

4 . 研究成果

(1) A549 細胞の形態学的変化

RS ウイルス (RSV) は、1.0 MOI (multiplicity of infection) では、感染 48 時間後までは形態学的変化が見られなかったが、50  $\mu$ g/ml の MBP, EPO 単独および4種の蛋白混合 (Comb) において、24 時間後には形態学的変化が見られた (図 1a-f)。一方、1.0 MOI の RS ウイルスを感染させた 24 時間後の A549 細胞に各好酸球顆粒蛋白を添加した場合、添加 24 時間後には MBP, EPO 単独, 4 種蛋白と比較して RS ウイルスと各蛋白の両者において、より明確な形態学的変化が観察された (図 1g-l)。

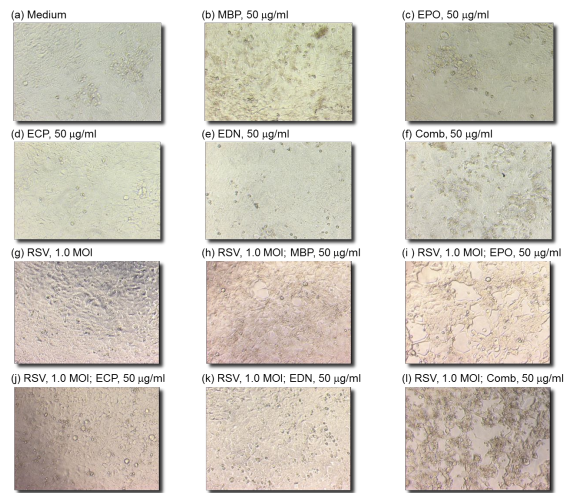
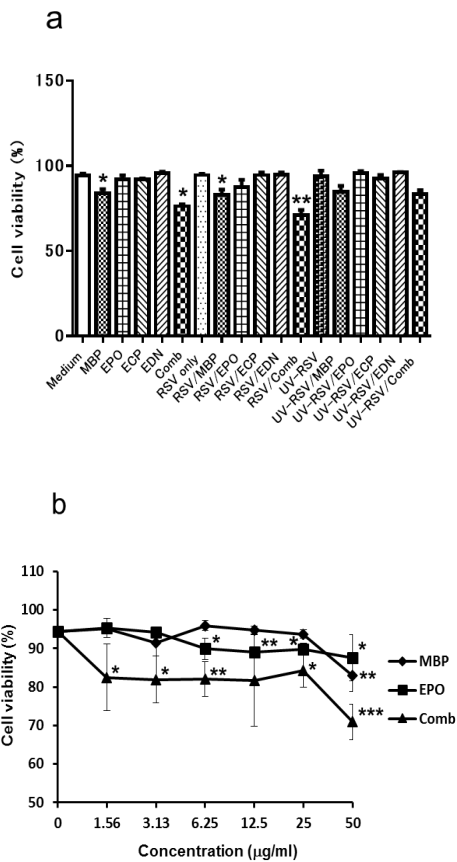


図 1. A549 細胞の形態学的変化

(2) A549 細胞の細胞死

上記の条件 (1) において、それぞれの細胞生存率を測定したところ、MBP, EPO, 4 種蛋白においては、各蛋白単独と比較して RS ウイルスとの両者混合の方が、各蛋白の濃度依存性に A549 の細胞死をさらに亢進することが示された。なお、UV は紫外線照射によるウイルス不活化処理を行った (図 2a, b)。

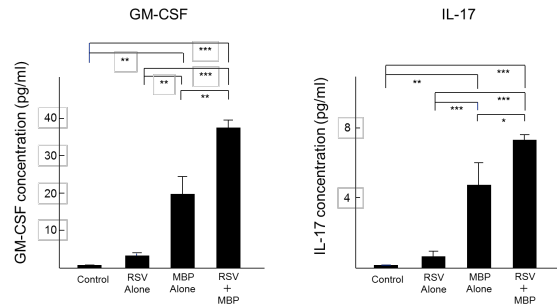


**図 2. A549 細胞の細胞生存率**

データは mean ± SEM (n=3-4)、対照に対する有意差を: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 で示した。

(3) A549 細胞上清からのサイトカイン/ケモカイン産生

次に、1.0 MOI の RS ウイルスを感染させた 24 時間後の A549 細胞に 50µg/ml の MBP を添加した場合の、A549 細胞上清から産生されるサイトカインおよびケモカインについても測定したところ 27 種類の中で、MBP 単独よりも RS ウイルスと MBP の両者により、GM-CSF および IL-17 のみが、有意に更新することから、RS ウイルス感染と好酸球性顆粒蛋白との相乗的な細胞傷害性を惹起する重要な因子であることを明らかにした。

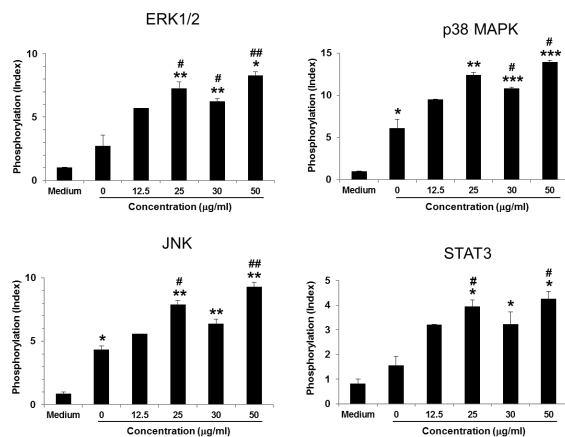


**図 3. A549 細胞からのサイトカイン産生**

データは mean ± SEM (n=6)、対照に対する有意差を: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 で示した。

(4) RS ウイルス感染 A549 細胞中のリン酸化蛋白の測定

最後に、RS ウイルス感染による好酸球性炎症増悪のメカニズムとして、細胞内シグナル分子の関与を検討したところ、MBP (0-50 µg/ml) により、RS ウイルス感染 (1.0 MOI) A549 細胞における Erk1/2, p38MAPK, JNK などのリン酸化が、一部は MBP の濃度依存性に有意に上昇した。以上より、好酸球性顆粒蛋白、特に MBP は、RS ウイルス感染気道上皮傷害の増悪を引き起こすと考えられ、そのメカニズムには、MAPK family が関与している可能性が示唆された。



**図 4. A549 細胞中のリン酸化蛋白**

データは mean ± SEM (n=3-4)、medium に対する有意差を\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 で、RS ウイルス単独 (MBP 0 µg/ml) に対す

る有意差を#:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$  で示した。

なお、ライノウイルスについては、国内で実験を行っている数少ない施設である東北大学に依頼したが、種々の条件により共同研究には至らなかった。今後、ライノウイルスの感染実験については、他の施設との共同研究を含めて、今後の課題としたい。

#### 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 16 件)

1. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Age at onset of asthma and allergen sensitization early in life. *Allergol Int*. 2014; 63 (Suppl 1): 23-28.  
DOI: 10.2332/allergolint.13-OA-0631.
2. Yamada Y, Kato M, Isoda Y, Nishi A, Jinbo Y, Hayashi Y. Eosinophilic gastroenteritis treated with a multiple-food elimination diet. *Allergol Int*. 2014; 63 (Suppl 1): 53-56.  
DOI: 10.2332/allergolint.13-LE-0633.
3. Kato M. Eosinophils in allergy and related diseases. Preface. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 161 (Suppl 2): 1-2.  
DOI: 10.2332/allergolint.13-OA-0631.
4. Ishioka T, Yamada Y, Kimura H, Yoshizumi M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Maruyama K, Hayashi Y, Kato M. Elevated MIP-1 $\alpha$  and IL-17 production in experimental asthma model infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 161 (Suppl 2): 129-137.  
DOI: 10.1159/000350427.
5. Yamada Y, Nishi A, Kato M, Toki F, Yamamoto H, Suzuki N, Hirato J, Hayashi Y. Esophagitis with eosinophil infiltration associated with congenital esophageal atresia and stenosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 161 (Suppl 2): 159-163.  
DOI: 10.1159/000350400.
6. Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park MJ, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, Ariga T. Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J Immunol*. 2012; 189: 1521-1526.  
DOI: 10.4049/jimmunol.1200926.
7. Kato M, Ishioka T, Kita H, Kozawa K, Hayashi Y, Kimura H. Eosinophil granular proteins damage bronchial epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012; 158 (Suppl 1): 11-18.  
DOI: 10.1159/000337752.
8. Yamada Y, Kato M, Toki F, Watanabe M, Nishi A, Matsushita I, Hirato J, Hayashi Y. Eosinophilic gastrointestinal disorder in an infant with feeding dysfunction. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012; 158 (Suppl 1): 83-86.  
DOI: 10.1159/000337797.

以上の論文はすべて査読有  
その他、和文 8 編

[学会発表](計 29 件)

1. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Mochizuki H. Viral detection and cytokine profile in relation to age among acute exacerbations of childhood wheezing. 71th Annual meeting of American Allergy, Asthma and Immunology, Houston, USA, 2015. 2. 22.
2. 加藤政彦. ウイルス感染と気道アレルギー. 第 331 回日本小児科学会神奈川県地方会, 神奈川県総合医療会館, 神奈川県横浜市, 2014. 11. 15.
3. 加藤政彦, 山田佳之, 望月博之. 小児気

- 管支喘息発作時におけるウイルス検索とサイトカイン/ケモカイン産生-年齢別の検討. 第 51 回日本小児アレルギー学会, 四日市市文化会館, 三重県四日市市, 2014. 11. 8.
4. 加藤政彦, 山田佳之. RS ウイルス感染喘息マウスにおける好酸球性炎症の検討. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 国立京都国際会館, 京都府京都市, 2014. 5. 9.
  5. 加藤政彦, 山田佳之. Major basic protein (MBP) は RS ウイルスによる気道上皮細胞のアポトーシスおよび気道炎症を増強する. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, ホテルニューオータニ, 東京都千代田区, 2013. 11. 30.
  6. 加藤政彦, 山田佳之. 当センターにおける小児気管支喘息とアレルギー性鼻炎患者の発症年齢とアレルギー感作状況に関する検討. 第 50 回日本小児アレルギー学会, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 2013. 10. 20.
  7. Kato, M, Ishioka, T, Kita H, Kozawa K, Hayashi Y, Kimura H. Major basic protein enhances apoptosis and production of GM-CSF and IL-17 in bronchial epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization 2013, Milan, Italy, 2013. 6. 25.
  8. Kato M, Ishioka T, Yamada Y, Kimura H, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Kozawa K, Maruyama K, Hayashi Y. Elevated MIP-1 $\alpha$  and IL-17 production in antigen-sensitized mice infected with respiratory syncytial virus. 69th Annual meeting of American Allergy, Asthma and Immunology, San Antonio, USA, 2013. 2. 25.
  9. 加藤政彦, 山田佳之. 好酸球性顆粒蛋白

によるウイルス感染気道上皮細胞傷害とそのメカニズム. 第 62 日本アレルギー学会学術大会, 大阪国際会議場, 大阪府大阪市, 2012. 12. 1.

10. 加藤政彦, 山田佳之, 丸山健一, 林 泰秀. 当センターにおける RS ウイルス感染症の過去 3 年間の検討. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡国際会議場, 福岡県福岡市, 2012. 4. 21.

その他、国内発表 19 題

〔図書〕(計 2 件)

1. 加藤政彦. 血清病. 福井次矢, 高木 誠, 小室一成編. 今日の治療指針 2014 版 - 私はこう治療している. 東京, 医学書院, 2014, p771-772.
2. 加藤政彦. 高 IgE 症候群. 福井次矢, 高木 誠, 小室一成編. 今日の治療指針 2014 版 - 私はこう治療している. 東京, 医学書院, 2014, p772-773.

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
なし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 政彦 (KATO Masahiko)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 30292593

### (2) 研究分担者

山田 佳之 (YAMADA Yoshiyuki)  
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員  
研究者番号 : 80309252

林 泰秀 (HAYASHI Yasuhide)  
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員  
研究者番号 : 30238133

(3) 連携研究者  
なし