

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860825

研究課題名(和文) インフルエンザ感染に伴うARDS後の肺線維化の発症機序の解明

研究課題名(英文) The role of claudins in the lung fibrosis post influenza virus-induced acute lung injury

研究代表者

青柳 哲史 (Aoyagi, Tetsuji)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50581609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性肺傷害(ALI)とその後の肺線維化の病態における細胞間タイトジャンクション構成分子：Claudinの役割を検討した。感染性・非感染性ALIモデルにおいて特に急性期にClaudin-4の発現亢進、Claudin-18の発現低下を認め、Claudin-4が上皮細胞以外に炎症細胞に発現を認めた。また、In vitroでInfluenza virus感染肺胞上皮細胞からMicroparticlesの誘導を認め、これらが肺マクロファージにおける炎症性サイトカイン/ケモカインの誘導に関与することがわかった。以上より主にALIの急性期にClaudin分子が深く関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The clinical course and pathophysiological feature of ARDS are characterized as three phases: acute exudative, proliferative and fibrotic. We investigated the role of claudins, a family of proteins in the components of the tight junction, in acute and fibrotic phase of lung injury. We induced nonviral ARDS by alpha-galactosylceramide(GalCer) and LPS and viral ARDS by influenza virus infection. Claudin-5 and -18 are expressed in naive lungs. In both ARDS model, expression of claudin-4 was elevated and claudin-18 mRNA decreased in acute phases of lung injury. Claudin-4 was expressed in not only epithelial cells but leukocytes recruited into the lungs. Microparticles in BAL fluid after influenza virus infection was observed. Influenza virus induced MPs have a potential to induced the cytokines and chemokines in alveolar macrophage. These results indicated that claudins may be involved in the pathogenesis of acute phase of lung injury.

研究分野：臨床感染症

キーワード：急性肺傷害 線維化 Influenza virus Lipopolysaccharides Claudin Microparticles

1. 研究開始当初の背景

急性肺傷害(ALI)およびその重症型の急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の臨床経過で急性期を超えても、その後線維化が起こり呼吸機能低下による死亡率の上昇および QOL の低下が知られている(N Engl J Med 200;342:1334-49.)。新型インフルエンザウイルス(2009pdmH1N1)感染症でも、ICU 入室症例の大部分が ARDS を呈し死亡率が高いことが知られている (JAMA 2009;302:1872-9.) が、その ARDS 発症症例で 10-20%に肺の線維化を認め(Radiol Med. 2012;117:185-200. , Eur J Radiol. 2011;79:447-51.)、その長期予後において呼吸機能の低下による QOL 低下が問題となっている(Chest. 2012 Sep1;:583-92.)。

生理状態で、肺上皮細胞のタイトジャンクション(T-J)がバリアとなり、恒常的に呼吸スペースが確保される。近年、本邦の研究者が中心となり T-J 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クロデイン(Cldns)を発見された。現在少なくとも 24 種類が知られ、臓器により発現パターンが異なる (Oncogene 2008;27: 6930-38.)

ALI/ARDS の急性期および組織修復期において、炎症細胞の浸潤、肺上皮細胞—血管内皮細胞のバリアの破綻が病態の中心となるが、一連の経過における肺組織細胞間の恒常性維持に關与する Cldns の役割は不明である。

2. 研究の目的

急性肺傷害およびそれに引き続く肺の繊維化における Cldns の役割について検討を行う。

3. 研究の方法

非感染性の劇症型 ARDS 動物モデル(Aoyagi T et. al. Int Immunol. 2011;23: 97-108.)およびインフルエンザウイルス感染誘発 ALI モデルの二つを用いて検討を行った。

使用マウス：C57BL/6 6-8 週齢

動物実験に關しては、東北大学動物実験施設の倫理規定を順守し施行した。

劇症型 ARDS 動物実験モデル(非感染性)：iNKT 細胞活性物質である α -galactosylceramide 投与 24 時間後に Lipopolysaccharide を投与し 72 時間以内に全例死亡し ALI/ARDS の病理所見に特徴的な硝子膜形成を有する。

インフルエンザウイルス誘発 ALI モデル(感染性)：非致死量の Influenza A virus (strain A/Puerto Rico/8/1934 H1N1)を経鼻投与し感染 11-14 日目に病理所見で肺傷害が最も観察され、感染 21-35 日目に肺の組織修復および繊維化が観察される。

1. 経時的な Cldns(-2, -4, -5, -18)の発現の変化

2. cldns の発現の局在

3.インフルエンザウイルス誘発 ALI モデルにおける Microparticles の発現と抗凝固剤をターゲットとした治療戦略

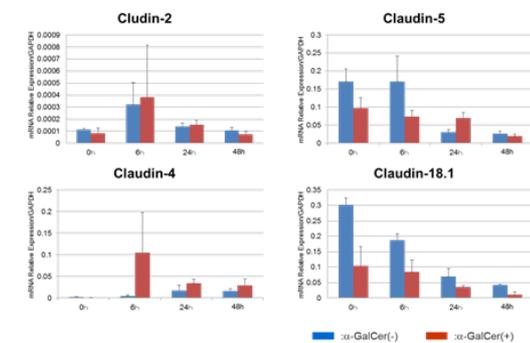
4. 研究成果

(1) 非感染性および感染性 ALI/ARDS 動物モデルにおける Cldns の発現

-非感染性モデル

Naive な肺において Cldn-5, -18 が発現している。非致死性 ALI/ARDS モデルでは LPS 投与 6 時間後に Cldn-2, -4 の発現が増加し、Cldn-2 は 24 時間後にはベースライン、Cldn-4 は 24 時間で降漸減傾向にあった。さらに、Cldn-5, -18 は 24 時間で減少した。a-GalCer 投与することで、naive な肺と比較し、Cldn-5, -18 の発現が低下した。致死性 ALI/ARDS モデルでは LPS 投与 6 時間後で非致死性モデルと比較し、有意に Cldn-4 の発現亢進、観察期間で Cldn-5, -18 の発現抑制を認めた。肺胞気管支洗浄液細胞や末梢血中白血球に Cldn の発現を認め、発現の推移が肺組織のそれとは異なっていた。特に、末梢血白血球に Claudin-5, -18 の発現レベルが非致死性モデルと比較し、有意に低下していた(図 1)。

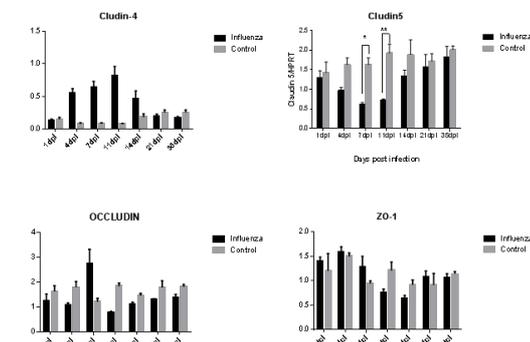
図 1



-感染性モデル

感染性モデルでは、Cldn-5 は肺傷害が局期になる感染 14 日目まで著しく低下したが、その後漸増傾向にあり、感染 35 日目にはコントロールと同レベルであった。一方、Cldn-4 は 14 日目まで著しく発現が亢進したが、21 日目以降はコントロールと同レベルであった。一方、Cldn-2, -18 の発現はコントロールと比較し有意差を認めなかった。さらに、細胞間 T-J の裏打ちタンパク Occludin、ZO-1 の発現について 2 群間で比較したが、差をみとめなかった(図 2)。

図 2

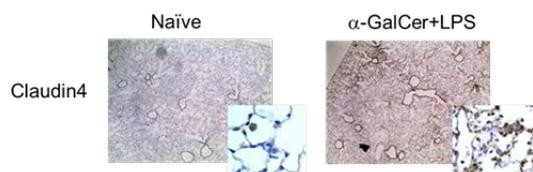


以上より、感染性、非感染性の ALI/ARDS において、特に急性期において Cldns-4, -18

が細胞間 T-J の構成に関与していることが示唆された。

(2) cldns の発現の局在

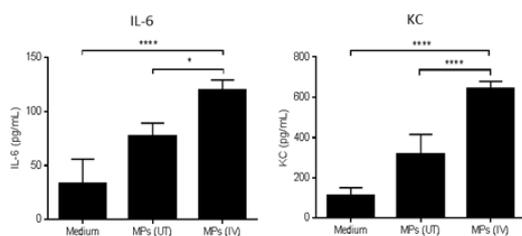
感染性・非感染性 ALI/ARDS において発現の亢進する Cldn-4 の局在について免疫染色を用いて検討を行った。非感染性モデルでは血管内皮細胞ならびに好中球に発現していることが判明し(図 3)、Caludin 分子が細胞間接着因子としての役割以外に炎症細胞の肺胞内への集積にも関与していると考えられた。図 3



(3) インフルエンザウイルス誘発 ALI モデルにおける Microparticles の発現と抗凝固剤をターゲットとした治療戦略

本研究者はインフルエンザウイルス感染で感染 4 日目に肺上皮細胞の Apoptosis の誘導を確認している。近年、Apoptosis を起こした細胞や活性化された細胞から Extracellular microvesicle (Microparticles, Exosomes)が放出され、これらが炎症病態に深く関与していることが判っている。これらの細胞は、放出した細胞の表面に発現しているタンパク質を保持しており、非感染性モデルにおいて BAL 液中からも Cldns の発現を認めており、本細胞が Cldns の発現を示唆している可能性がある。そこで本研究者もマウスから肺上皮細胞を取り出し In vitro でインフルエンザウイルスを感染させ、Microparticles を取り出し、同じくマウスから取り出した肺胞マクロファージを刺激したところ、IL-6 ならびに好中球遊走因子 KC の産生が亢進していた(図 4)。

図 4



加えて、肺胞上皮細胞から放出された Microparticles は凝固・線溶系促進因子を保持し ALI/ARDS の病態に関与していることから、それらを制御する recombinant Thrombomodulin をマウスに投与し、Influenza virus を感染させ肺傷害および死亡率への影響を検討したが、肺傷害ならびに死亡率に差を認めることはなかった。

以上より、ALI/ARDS の病態の急性期に Claudin 分子が深く関与しているが、繊維化期

での関与は少ないと考えられた。

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 11 件)

1. Ishii K, Tabuchi F, Matsuo M, Tatsuno K, Sato T, Okazaki M, Hamamoto H, Matsumoto Y, Kaito C, Aoyagi T, Hiramatsu K, Kaku M, “Moriya K, Sekimizu K. Phenotypic and genomic comparisons of highly vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains developed from multiple clinical MRSA strains by in vitro mutagenesis.” Sci Rep. 2015 Nov 25;5:17092. doi: 10.1038/srep17092. (査読有)
2. Inomata S, Yano H, Tokuda K, Kanamori H, Endo S, Ishizawa C, Ogawa M, Ichimura S, Shimojima M, Kakuta R, Ozawa D, Aoyagi T, Gu Y, Hatta M, Oshima K, Nakashima K, Kaku M. “Microbiological and molecular epidemiological analyses of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus at a tertiary care hospital in Japan.” J Infect Chemother. 2015;21(10):729-36. doi: 10.1016/j.jiac.2015.07.005. (査読有)
3. Endo S, Nemoto T, Yano H, Kakuta R, Kanamori H, Inomata S, Ishibashi N, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Kitagawa M, Kaku M. “First confirmed case of spondylodiscitis with epidural abscess caused by Parvimonas micra.” J Infect Chemother. 2015;21(11):828-30. doi: 10.1016/j.jiac.2015.06.002. (査読有)
4. Kakuta R, Yano H, Kanamori H, Shimizu T, Gu Y, Hatta M, Aoyagi T, Endo S, Inomata S, Oe C, Tokuda K, Ozawa D, Goto H, Katori Y, Kaku M. “Helicobacter cinaedi infection of abdominal aortic aneurysm, Japan.” Emerg Infect Dis. 2014;20(11):1942-5. doi: 10.3201/eid2011.140440. (査読有)
5. Kanamori H, Tokuda K, Ikeda S, Endo S, Ishizawa C, Hirai Y, Takahashi M, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Yano H, Weber DJ, Kaku M. “Prevaccination antibody screening and immunization program for healthcare personnel against measles, mumps, rubella, and varicella in a Japanese tertiary care hospital.” Tohoku J Exp Med. 2014;234(2):111-6. (査読有)
6. Tokuda K, Kunishima H, Gu Y, Endo S, Hatta M, Kanamori H, Aoyagi T, Ishibashi N, Inomata S, Yano H, Kitagawa M, Kaku M. “A survey conducted immediately after the 2011 Great East Japan Earthquake: evaluation of infectious risks associated

- with sanitary conditions in evacuation centers.” *J Infect Chemother.* 2014;20(8):498-501. doi: 10.1016/j.jiac.2014.04.012. (査読有)
7. Endo S, Yano H, Kanamori H, Inomata S, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Tokuda K, Kitagawa M, Kaku M. “High frequency of *Acinetobacter soli* among *Acinetobacter* isolates causing bacteremia at a tertiary hospital in Japan.” *J Clin Microbiol.* 2014;52(3):911-5. doi: 10.1128/JCM.03009-13. (査読有)
 8. Aoyagi T, Kaito C, Sekimizu K, Omae Y, Saito Y, Mao H, Inomata S, Hatta M, Endo S, Kanamori H, Gu Y, Tokuda K, Yano H, Kitagawa M, Kaku M. “Impact of psm-mec in the mobile genetic element on the clinical characteristics and outcome of SCCmec-II methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Japan.” *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):912-9. doi: 10.1111/1469-0691.12575. (査読有)
 9. Aoyagi T, Yamada M, Kunishima H, Tokuda K, Yano H, Ishibashi N, Hatta M, Endo S, Arai K, Inomata S, Gu Y, Kanamori H, Kitagawa M, Hirakata Y, Kaku M., “Characteristics of infectious diseases in hospitalized patients during the early phase after the 2011 great East Japan earthquake: pneumonia as a significant reason for hospital care.” *Chest.* 2013;143(2):349-56. doi:10.1378/chest.11-3298 (査読有)
 10. 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.* 2013; 173(2): 276-87. doi: 10.1111/cei.12106. (査読有)
 11. Kudo D, Uno K, Aoyagi T, Akahori Y, 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.* 2013; 36(4): 812-20. doi: 10.1007/s10753-013-9607-1. (査読有)
- 〔学会発表〕(計5件)
1. T. Aoyagi, M. Kawauchi, Y. Kishihara, K. Tokuda, M. Kaku. “Distribution of the Ba813 gene among *Bacillus cereus* in the Hospital Setting.” ICCAC/ICC2015, Sep 17-21, 2015, San Diego, USA.
 2. 青柳哲史, 佐藤由紀夫, 川上和義, 河内美奈, 金森肇, 遠藤史郎, 八田益充, 具芳明, 徳田浩一, 矢野寿一, 賀来満夫.” 炎症性単球をターゲットにした劇症型急性肺傷害実験動物モデルの治療”2014年6月18日—21日、第88回日本感染症学会学術講演会・第62回日本化学療法学会総会合同学会、福岡、ヒルトン福岡シーホーク

3. T. Aoyagi, Y. Sato, K. Kawakami, M. Toyama, K. Ishi, H. Kanamori, S. Endo, M. Hatta, Y. Gu, K. Tokuda, H. Yano, M Kaku. “Improvement Lipopolysaccharide-Induced Fulminate Acute Respiratory Distress Syndrome Model by Etoposide Plus Steroid Therapy.” ATS 2014, May 16-21, 2014, San Diego, USA.
 4. Aoyagi T, Kaito C, Sekimizu K, Omae Y, Saito Y, Mao H, Inomata S, Endo S, Hatta M, Gu Y, Tokuda K, Yano H, Kitagawa M, Kaku M. “Association between psm-mec on the Mobile Genetic Element and Clinical Manifestation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection.” IDweek, Oct 2-6, 2013, San Francisco
 5. 青柳哲史, 川上和義, 石井恵子, 金森肇, 遠藤史郎, 八田益充, 具芳明, 徳田浩一, 矢野寿一, 國島広之, 北川美穂, 賀来満夫.” 肺線維化をきたすインフルエンザウイルス感染肺障害モデルマウスの作成” 第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会合同学会、2013年6月5日-6日、横浜、パシフィコ横浜
- 〔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
青柳 哲史 (AOYAGI TETSUJI)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：50581609

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：