

令和元年5月25日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07090

研究課題名（和文）インフルエンザ感染後肺炎球菌2次感染におけるエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名（英文）Epigenetic regulation during lethal post-influenza pneumococcal infection

研究代表者

八木 一馬 (Yagi, Kazuma)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：00594566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：致死性であるインフルエンザウイルス感染に続発する肺炎球菌2次感染のメカニズム解明は急務である。同2次感染を再現するマウスモデル（非致死量インフルエンザウイルス経鼻投与7日後に肺炎球菌経鼻投与）を確立した。エピジェネティクス（DNAの配列変化を伴わない遺伝子発現を制御・伝達する機構）に注目し、同モデルでEzh2 cKO群の生存率が対照群と比較して有意に低下し、肺炎球菌感染後の肺NK細胞がcKO群で有意に増加することを示した。肺炎球菌感染前のNK細胞中和抗体投与でcKO群の生存率は改善傾向を示し、同2次感染でEzh2がNK細胞関連遺伝子群の発現調節を介して保護的作用を示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルス感染に続発する肺炎球菌2次感染は致死性であり病態は十分に明らかになっておらず、抗菌薬や抗ウイルス薬による治療のみでの予後改善が難しいという現状がある。本研究では、同疾患においてエピジェネティクス（DNAの配列変化を伴わない遺伝子発現を制御・伝達する機構）という新しい角度からのアプローチを試み、NK細胞という免疫担当細胞がその病態に関与している可能性を見出した。将来的な新規薬剤の創薬や予後改善につながる一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Secondary bacterial pneumonia following influenza virus infection is associated with high mortality, but the mechanism is largely unknown. We established mouse model of secondary bacterial pneumonia following influenza virus infection. Mice were infected intranasally with *Streptococcus pneumoniae*, 7 days after intranasal inoculation with influenza virus. We hypothesized that epigenetic gene regulation via histone methylation was involved in the pathogenesis of lethal postinfluenza bacterial pneumonia. The survival rate of Ezh2 cKO mice was significantly decreased after post-influenza pneumococcal pneumonia. Lung NK cells were significantly higher in Ezh2 cKO mice after pneumococcal infection, and the survival rate of Ezh2 cKO mice was improved by administering NK cell neutralizing antibody. These results suggest that Ezh2 might have protective effect via regulation of NK cell-related genes in the mouse model of post-influenza pneumococcal infection.

研究分野：呼吸器感染症

キーワード：インフルエンザ感染後肺炎球菌2次感染 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染の臨床的重要性

肺炎は日本人の死因の第 3 位である。その中でもインフルエンザウイルス感染に続発する細菌 2 次感染はしばしば致死性的となり予後不良であり、2009 年の新型インフルエンザウイルス感染症死者の 50%以上で 2 次性細菌性肺炎が関与したという報告がある(McCullers JA et al. *Nat Rev Microbiol.* 2014)。肺炎球菌はその主要な起因菌であるが、インフルエンザ感染後細菌 2 次感染の重症化メカニズムの詳細は明らかになっていない(Metzger DW et al. *J Immunol.* 2013)。インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染の病態の詳細な解明が予後改善に向けて急務である。

(2) 当研究室における炎症性疾患のエピジェネティクスに関する検討

エピジェネティクスとは DNA の配列変化を伴わない遺伝子発現を制御・伝達する機構であり、種々のヒストン修飾(メチル化、アセチル化、ユビキチン化、リン酸化) DNA メチル化などにより制御される。発生学・腫瘍学分野でその関与は確立され、近年は炎症性疾患分野への関与が報告されている。これまで、研究代表者の指導教官・石井誠講師は、炎症性疾患のエピジェネティクスにおける検討を継続・研究し、国際学術誌に報告してきた。例えば、M2 マクロファージのエピジェネティック制御 (Ishii M et al. *Blood.* 2009)、敗血症における好中球のエピジェネティック制御 (Ishii M et al. *J Immunol.* 2012)等の報告がある

(3) インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染とヒストンアセチル化及びメチル化の関与

ある遺伝子プロモーター領域のヒストン H3 や H4 にアセチル化が生じるとクロマチン構造が弛緩して転写活性は上昇し、アセチル化はヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase; HDAC)により抑制される。HDAC 阻害薬はその抗炎症効果から敗血症マウスモデルにおける保護的効果を示すと報告がある(Roger T et al. *Blood.* 2011, Takabe M et al. *J Surg Res.* 2014)。研究代表者は、インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染マウスモデルにおいて HDAC 阻害薬である trichostatin A (TSA)の投与が保護的効果を有し、同 2 次感染の病態にヒストンアセチル化が関与することを報告した(Yagi K, Ishii M et al. *Crit Care Med.* 2016)。

ヒストン H3 や H4 のメチル化では、その修飾部位により転写活性の影響が異なる。インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染におけるヒストンメチル化の関与の可能性については、転写抑制性ヒストン修飾の H3K9 メチル化を増加させるメチル基転移酵素 *Setdb2* がインフルエンザ感染後の細菌感染の感受性を増強させて重症化に関係するという報告がある(Schliehe C et al. *Nat Immunol.* 2015)。上記のように同 2 次感染の病態にヒストンアセチル化及びヒストン H3K9 メチル化をはじめとするエピジェネティックな制御機構が関与している可能性が示唆されているが、転写抑制性ヒストン修飾の H3K27 メチル化の関与について報告した研究はない。ヒストンメチル化はアセチル化とクロストークしながら転写活性を調節しており(Wang Z et al. *Nat Genet.* 2008)、ヒストン H3K27 メチル化もインフルエンザ感染後細菌 2 次感染の病態に関与している可能性が十分ある。

(4) インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染と Ezh2 関与の可能性

研究代表者は、転写抑制性ヒストン修飾である H3K27me3 のメチル基転移酵素 Ezh2 に注目し、既に確立した同 2 次感染マウスモデルを用いてその関与について予備検討を行った。Ezh2 コンディショナルノックアウト(cKO) (*Ezh2^{lox/flox}* ERT2-Cre)マウス及び対照マウスに対して非致死量のインフルエンザウイルス(5 pfu)を経鼻感染し、その 7 日後に肺炎球菌(1×10^4 cfu)を経鼻感染して生存率を評価した。Ezh2 cKO 群で対照群と比較し有意に生存率が低下した。また、肺炎球菌感染 24 時間後の気管支肺胞洗浄(BAL)液総細胞数及びマクロファージ数が cKO 群で有意に上昇し、24 時間後の BAL 液中の IL-1 α が cKO 群で有意に上昇した。以上より、同 2 次感染において Ezh2 は保護的に作用し、その病態に H3K27 メチル化を介するエピジェネティックな制御が関与する可能性が示唆される。本研究では Ezh2 cKO マウスや Ezh2 特異的阻害薬を用いてインフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染における Ezh2 の意義をさらに詳細に免疫学的に検討する。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者の研究室で確立されているインフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染マウスモデルにおいて、Ezh2 cKO マウスや Ezh2 特異的阻害薬、さらには臨床検体を用いてインフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染における Ezh2 を介するエピジェネティクス制御機構の寄与を動物実験および臨床検体で検討し、その機序の包括的解明をめざすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Ezh2 cKO マウス及び対照マウスに、非致死量のインフルエンザウイルス感染 7 日後に肺炎球菌を感染させ、生存率、肺内細菌量、サイトカイン発現、肺内免疫担当細胞分画、肺病理所見、などを比較検討する。さらに、肺内免疫担当細胞毎に網羅的に遺伝子発現解析(RNA-sequence)を行い、Ezh2 の標的候補遺伝子を探索する。Ezh2 特異的阻害薬投

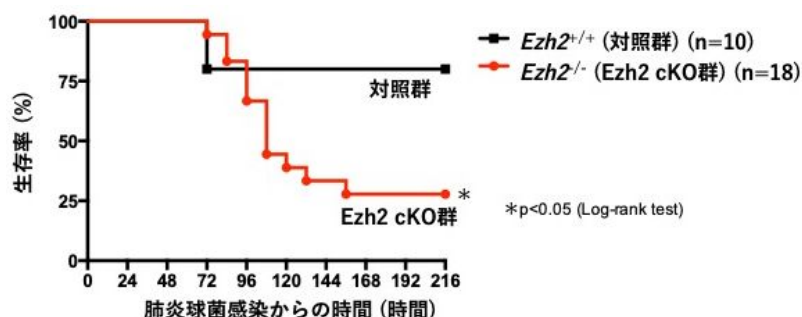
与マウスと対照マウスについても上記と同様の検討を行う。

- (2) Ezh2 の標的候補遺伝子(Ezh2 cKO 群で発現が上昇する遺伝子)プロモーター領域における Ezh2 及び H3K27me3 の発現を ChIP assay で検討する。また、**ChIP(クロマチン免疫沈降)-sequenc 法により Ezh2 が作用する標的遺伝子を網羅的に探索し、Ezh2 の役割を包括的に解明する。**

4. 研究成果

(1) Ezh2 cKO マウス用いたインフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染実験

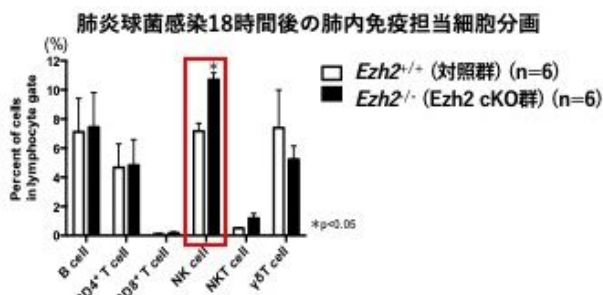
① インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染マウスモデルを作成し、8-12 週齢 Ezh2 cKO マウス及び対照マウスに対して、**非致死量のインフルエンザウイルス(A/PR8;H1N1) 5 pfu を経鼻投与、7 日後に肺炎球菌(血清型 3 型)1.0×10⁴ cfu を経鼻投与する実験系を確立した。Ezh2 cKO 群で対照群と比較し有意に生存率が低下することを繰り返し確認した【図 1】。**



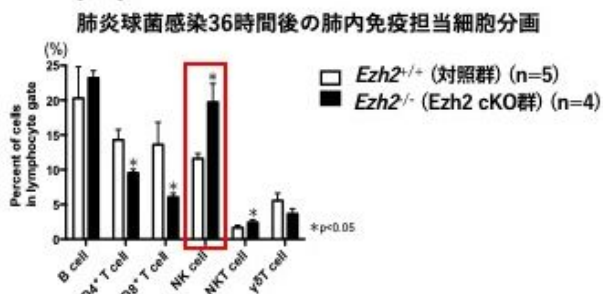
【図1】 Ezh cKOマウスではインフルエンザ感染後肺炎球菌2次感染マウスの生存率が有意に低下する。

② また、肺炎球菌感染 24 時間後の気管支肺胞洗浄(BAL)液総細胞数及びマクロファージ数が cKO 群で有意に上昇し、24 時間後の BAL 液中の IL-1 β が cKO 群で有意に上昇することを繰り返し確認した。

③ Flow cytometry を用いて肺内免疫担当細胞の検討を行ったところ、**肺炎球菌感染 18・36 時間後の肺 NK 細胞が Ezh2 cKO 群で有意に増加することを繰り返し確認した【図 2】。**インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染における NK 細胞の関与の可能性が考えられた。



④ 同感染モデルにおける NK 細胞の関与をさらに検討するため、肺炎球菌感染前に NK1.1 中和抗体を投与してインフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染マウスの生存率を評価したところ、有意差は認めないものの **NK1.1 中和抗体投与群で Ezh2 cKO マウスの生存率が改善傾向を示すことを繰り返し確認した。**



【図2】 Ezh cKOマウスでは肺炎球菌感染18・36時間後の肺内NK細胞が有意に増加する。

上記の実験により、**Ezh2 cKO 群の生存率低下の一因として NK 細胞の関与が考えられ、インフルエンザ感染後肺炎球菌 2 次感染マウスモデルにおいて、Ezh2 が NK 細胞関連遺伝子群の発現調節に寄与している可能性が示唆された。**

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Yagi K, Oyamada Y, Oshima H, et al. (計 10 名中 1 番目(筆頭)) Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus lentulus* in an adult patient: A case report and literature review. *J Infect Chemother*. 査読有, Epub ahead of print, 2019, S1341. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.02.003>

Yagi K, Asakura T, Betsuyaku T, Hasegawa N, et al. (計 13 名中 1 番目(筆頭)) Association between six-minute walk test parameters and the health-related quality of life in patients with pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *BMC Pulm Med*. 査読有, 18(1), 2018, 114-121. <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0686-5>

Namkoong H, Ishii M, Fujii H, **Yagi K**, Betsuyaku T, et al. (計 18 名中 4 番目) Clarithromycin expands CD11b+Gr-1+ cells via the STAT3/Bv8 axis to ameliorate

lethal endotoxic shock and post-influenza bacterial pneumonia. *PLoS Pathog.* 査読有,14(4), 2018,e1006955 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006955>

Asakura T, Ishii M, **Yagi K**, Betsuyaku T, et al. (計 15 名中 6 番目) Sphingosine 1-phosphate receptor modulator ONO-4641 stimulates CD11b+Gr-1+ cell expansion and inhibits lymphocyte infiltration in the lungs to ameliorate murine pulmonary emphysema. *Mucosal Immunol.* 査読有, 11(6), 2018, 1606-1620.

<https://doi.org/10.1038/s41385-018-0077-5>

Yagi K, Ishii M, Betsuyaku T, Hasegawa N, et al. (計 17 名中 1 番目(筆頭)) The efficacy, safety, and feasibility of inhaled amikacin for the treatment of difficult-to-treat non-tuberculous mycobacterial lung diseases. *BMC Infect Dis.* 査読有, 17, 2017, 558-564. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2665-5>

Yagi K, Morimoto K, Kurashima A, Hasegawa N, et al. (計 16 名中 1 番目(筆頭)) Clinical characteristics of pulmonary *Mycobacterium lentiflavum* disease in adult patients. *Int J Infect Dis.* 査読有, 67, 2018, 65-69.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.12.001>

Kamata H, **Yagi K**, Hasegawa N, et al. (計 14 名中 5 番目). Impact of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection on health-related quality of life in *Mycobacterium avium* complex lung disease. *BMC Pulm Med.* 査読有, 13, 2017, 198-206.

<https://doi.org/10.1186/s12890-017-0544-x>

Asakura T, Yamada Y, **Yagi K**, Hasegawa N, et al. (計 14 名中 8 番目). Impact of cavity and infiltration on pulmonary function and health-related quality of life in pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease: A 3-dimensional computed tomographic analysis. *Respir Med.* 査読有, 126, 2017, 9-16.

<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.03.010>

〔学会発表〕(計 3 件)

Yagi K, Asakura T, Betsuyaku T, Hasegawa N, et al. (計 13 名中 1 番目(筆頭)) Impact of six-minute walk test on health-related quality of life in pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. European Respiratory Society (ERS) International Congress 2018 (国際学会), 2018 年

Yagi K, Ishii M, Betsuyaku T, Hasegawa N, et al. (計 17 名中 1 番目(筆頭)) The efficacy, safety and feasibility of inhaled amikacin for the treatment of refractory non-tuberculous mycobacterial lung diseases. European Respiratory Society (ERS) International Congress 2017 (国際学会), 2017 年.

八木一馬, 石井誠, 長谷川直樹, 別役智子、ら. (計 13 名中 1 番目(筆頭)) ヒストンメチル基転移酵素 Ezh2 はインフルエンザウイルス感染後肺炎球菌 2 次感染マウスに保護的に作用する. Histone methyltransferase Ezh2 protects mice against lethal post-influenza pneumococcal infection. 第 57 回日本呼吸器病学会学術講演会(ミニシンポジウム). 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。