

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790455

研究課題名(和文) 重症急性呼吸器症候群の重症化機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms underlying the development of severe acute respiratory syndrome

## 研究代表者

安井 文彦 (YASUI FUMIHIKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：40399473

## 研究成果の概要(和文)：

老齢 BALB/c マウスへの SARS コロナウイルス(SARS-CoV)の感染では、感染 6 日から 9 日後にかけて急激なウイルス排除と肺炎の発症が見られる。一方、免疫不全マウスである SCID マウスでは、肺炎を発症することなく、持続感染化した。よって、獲得免疫がウイルス排除とともに肺炎発症に寄与していることが示唆された。そこで、老齢 BALB/c マウスへの特異的抗体投与による CD4<sup>+</sup> 細胞及び CD8<sup>+</sup>細胞の枯渇実験と SCID マウスへの老齢 BALB/c マウスの脾細胞の養子移入実験を行ない、SARS-CoV 感染後の肺炎への影響を解析した。その結果、肺炎発症には体細胞からのサイトカイン等の液性因子の産生とリンパ球以外の免疫担当細胞群が関与していることが示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

Old BALB/c mice infected with SARS-CoV showed the viral clearance and the development of pneumonia during 6-9 dpi. In contrast, young SCID mice were persistently infected with SARS-CoV during experimental periods (by 21 dpi) without pneumonia, indicating that adaptive immune responses are involved in not only the viral clearance but also the development of pneumonia. We depleted CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> cells of old BALB/c mice by specific antibodies. On the other hand, the splenocytes of old BALB/c mice were adoptively transferred into young SCID mice. After SARS-CoV infection, we investigated the development of pneumonia in both mouse models. These results suggest that proinflammatory cytokines produced by pneumocytes and immune competent cells except for lymphocytes result in the development of pneumonia in old BALB/c mice.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・個体  
キーワード：個体、免疫応答、肺炎

## 1. 研究開始当初の背景

重症急性呼吸器症候群（SARS）の最も重要な特徴は、65 歳以上の高齢感染者での致死率が 50%以上にも及ぶのに対して、乳幼児では、一人の死亡例も確認されていないことである。よって、SARS コロナウイルス（SARS-CoV）感染症の重症化は、ウイルスによる直接的な細胞障害とは異なる機序によって引き起こされていると考えられる。実際、死亡した患者では、様々な炎症性サイトカインが過剰産生される、いわゆる“サイトカインストーム”状態に陥っている事が報告されている (Peiris, et al., 2003)。しかしながら、それぞれの患者によって、過剰産生されるサイトカイン種にもバラツキが見られることから、肺炎の重症化機序との関連については不明な点も多い。

近年、老齢 BALB/c マウスが、SARS-CoV 感染により肺炎を発症する事が報告された (Roberts, et al, JVI, 2005)。更に、マウスでの馴化を行った SARS-CoV 変異株による感染では、老齢マウスにおける致死性と種々の炎症性サイトカインの過剰産生という感染患者で見られる結果との相関性が認められた (Nagata, et al., AJP, 2008)。しかしながら、如何にして過剰な免疫応答が誘導され、そのうちの如何なる因子が肺炎の重症化を引き起こしているのかについては依然として不明なままである。

## 2. 研究の目的

我々は、老齢 BALB/c マウス、及び若齢 BALB/c マウスへの SARS-CoV の経鼻感染を行ったところ、いずれのマウスにおいても感染後 6 日から 9 日の間に肺中ウイルスは完全に排除されているにもかかわらず、9

日後の病理組織解析では、老齢 BALB/c マウスにおいてのみ明らかな肺炎像が観察されるという結果を得ている。よって、SARS-CoV 感染により肺炎を発症する老齢 BALB/c マウスを用いて、ウイルス感染後に誘導される宿主免疫応答が肺炎発症に与える影響を解析し、SARS-CoV 感染に対する免疫応答を介した肺炎の重症化機序の解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

老齢 BALB/c マウス (>6 ヶ月齢) 及び免疫不全マウスである SCID マウス (7-9 週齢) への SARS コロナウイルス感染による肺中ウイルス量の経日変化と肺病理解析を行った。

老齢 BALB/c マウスでは、SARS-CoV による感染 6 日以降にウイルス排除と肺炎発症が引き起こされる。よって、肺炎の発症には、獲得免疫の関与が示唆される。ウイルス感染細胞の排除、及び炎症誘導には、細胞障害性 T 細胞 (CTL) の活性化が重要であることから、特異的抗体の投与によりそれぞれ CD4<sup>+</sup>細胞、及び CD8<sup>+</sup>細胞、またはその両細胞群を枯渇させた老齢 BALB/c マウスに対して SARS-CoV を感染させる。一方、老齢 BALB/c マウス由来の脾細胞を SCID マウスへ養子移入した後に SARS-CoV を感染させる。これにより、獲得免疫誘導を介したウイルス排除機構、及び肺炎発症に至る機序との関係を解析する。

## 4. 研究成果

老齢 BALB/c マウスでは、感染後 9 日目には検出限界以下にまで肺中ウイルス量が減少していたのに対して、免疫不全マウスである SCID マウスでは感染 21 日後においてもウイルスは排除されず、持続感染化している

ことが判明した。興味深いことに、重篤な肺炎を呈することなく、持続感染化しており、SARS の肺炎の重症化には獲得免疫応答の関与が強く示唆された。そこで、SCID マウスへ老齢 (>6 ヶ月齢) BALB/c マウスの脾細胞を移入した後に、SARS-CoV を感染させたところ、BALB/c マウスと同様に感染9日後までに肺中ウイルス量は、検出限界以下にまで減少していた。しかしながら、移入した免疫担当細胞は、老齢マウス由来であるにも関わらず、顕著な肺炎像は認められなかった。

また、特異的抗体を用いて CD4 陽性細胞及び CD8 陽性細胞の枯渇実験を行い、ウイルス排除への影響を解析した。CD8 陽性細胞枯渇群では、野生マウスと同様に感染9日後までに肺中ウイルス量は検出限界以下にまで低下していた。一方、CD4 陽性細胞枯渇群では、ウイルス排除に失敗した。さらに、CD4 陽性細胞を SCID マウスに移入した場合には、SARS-CoV を排除できないが、T 細胞欠損している nude マウスへの CD4 陽性細胞移入した場合には、SARS-CoV が排除された。

以上の結果より、SARS-CoV 感染に対しては、何らかの原因により CTL がうまく誘導されず、液性免疫がウイルス排除により高い寄与を果たしていることが明らかとなった。また、CD4 陽性細胞枯渇老齢 BALB/c マウス及び CD8 陽性細胞枯渇老齢 BALB/c マウスともに肺炎像は軽減されていないこと、老齢 BALB/c マウスの脾細胞を移入した SCID マウスにおいても、肺炎は惹起されなかったことから、老齢 BALB/c マウスでの肺炎発症には体細胞からのサイトカイン等の液性因子の産生及びリンパ球以外の免疫担当細胞群が関与していることが示唆された。

#### 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 2 件)

- (1) Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. Identification of SARS-CoV spike protein-derived and HLA-A2- restricted human CTL epitope by using a new muramyl dipeptide-derivative adjuvant. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2010, 23, 165-177. (査読有)
- (2) 安井文彦、小原道法, SARS ワクチン, 医薬ジャーナル社・化学療法の領域 2009, 25, 47-55 (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 安井文彦 (代表)  
インフルエンザウイルス HA 遺伝子発現組換えワクチニアウイルスの感染防御効果の検討 第 14 回日本ワクチン学会 2010. 12. 11-12 東京
- (2) 安井文彦 (代表) 細胞障害性 T 細胞を介さない貧食細胞-抗体相互作用による肺組織中 SARS コロナウイルスの排除 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010. 11. 7-9 徳島
- (3) 安井文彦 (代表) Prior immunization with nucleocapsid protein of SARS-CoV aggravates pneumonia in mice after SARS-CoV infection. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2010. 10. 27-11. 1. Seattle, WA USA
- (4) 安井文彦 (代表) Analysis of the mechanism by which BALB/c mice having prior immunization with nucleocapsid protein of SARS-CoV develop severe pneumonia after SARS-CoV infection. 3<sup>rd</sup> Global Vaccine Congress, 2009. 10. 4-6. Singapore

(5) 安井 文彦 (代表)

SARS-CoV のヌクレオキャプシドタンパク質を前免疫したマウスへの SRAS-CoV 感染により惹起される肺炎重症化機序の解析 第 13 回日本ワクチン学会  
2009. 9. 27 札幌

(6) 安井 文彦 (代表)

SARS-CoV のヌクレオキャプシドタンパク質を前免疫したマウスへの SARS-CoV 感染により惹起される肺炎重症化機序の解析 第 4 回中国バイオメディカルフォーラム 2009. 8. 8-10. 大連

[その他]

ホームページ

(<http://www.rinshoken.or.jp/MCB/index.html>)]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 文彦 (YASUI FUMIHIKO)  
財団法人東京都医学研究機構・  
東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
研究者番号：40399473

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし