

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：74329

研究種目：基盤研究 C

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22590569

研究課題名（和文） IFN・サイトカインシステム検討による新型インフルエンザ重症化ハイリスク群の検証

研究課題名（英文） Determining patient's IFN/cytokine system may reveal vulnerability to new strains of influenza viruses.

研究代表者

宇野賀津子（UNO KAZUKO）

（財）ルイ・パストゥール医学研究センター

研究者番号：50211082

研究成果の概要（和文）：

新型インフルエンザ等易感染性疾患や重症化しやすい疾患、またその病態と IFN システムについて検討する計画をたてた。しかしながら、新型インフルエンザは 2010 年以降大きな流行がなく、当初計画した研究を遂行できなかった。そこで感染重症化リスクの高い、糖尿病、MPO-ANCA 腎炎、慢性閉塞性呼吸器疾患 (COPD) 患者と健常人の IFN 産生能を比較、これら疾患患者では健常人に比べて有意に低下している事、MPO-ANCA 腎炎患者ではプラズマサイトイド樹状細胞数の著しい低下や血中 IFN の存在を明らかにした。COPD 患者では、憎悪回数と IFN 産生能との関連性は認められなかったが、糖尿病患者では、歯周病罹患群で IFN 産生能が特に低下していて、IFN システムは易感染性と関連している指標として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Our aim in this report was to determine the relationship between IFN- $\alpha$  producing capacity and susceptibility to common infection in patients with diabetes, MPO-ANCA nephritis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Originally, influenza was chosen as one such common infection however since there has been no new influenza pandemic since 2010, we lacked a sample population that was infected. In light of this, we have changed direction and our focus is now on the relationship between the IFN cytokine system and patient vulnerability to periodontal disease and frequency of COPD exacerbation.

We compared IFN production capacity in diabetes, MPO-ANCA nephritis and COPD patients with those of healthy subjects and found that IFN production in these diseased subjects was significantly low compared with healthy subjects. We also observed that MPO-ANCA nephritis patients showed extreme impairment of plasmacytoid dendritic cell number and existence of plasma IFN. Among diabetes patients, those with periodontal disease showed lower IFN production capacity than non-periodontal patients. However, we observed no significant relationship between the frequency of COPD exacerbation and IFN production capacity. These results suggest that IFN- $\alpha$  production capacity could be good marker to predict susceptibility to infection in patients with existing diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000 円	390,000 円	1,690,000 円
2011 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2012 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
総計	3,500,000 円	1,500,000 円	4,550,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学、感染症、インフルエンザ、インターフェロン、サイトカイン、歯周病

### 1. 研究開始当初の背景

2009年春に日本に上陸したH1N1亜型新型インフルエンザの本格流行が予想以上に早く猛威をふるい、去っていった。しかしながら、過去のインフルエンザの歴史から考えると、この新型インフルエンザは、今後強毒化して更に猛威をふるい、通常の季節性インフルエンザと同様、基礎疾患を抱えた高齢者の中に広がり、死亡率が上昇することが危惧されていた。

### 2. 研究の目的

新型インフルエンザに罹患した時に特に重症化しやすいとされている糖尿病や腎炎、慢性閉塞性呼吸器疾患(COPD)という基礎疾患を抱えた患者を対象として、申請者がこれまでの研究成果から、感染抵抗性の指標と考える IFN- $\alpha$  産生能と新型インフルエンザ感染との関連を検討し、事前に重症化ハイリスク群の選択の可能性の検討を試みた。またこれらの疾患と関連性の強い他の感染症との関連についても検討し、易感染性指標・病態を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

特に重症化しやすいとされている基礎疾患を抱えた患者の IFN・サイトカイン産生能を測定、期間内に罹患したインフルエンザおよび他の感染症履歴との関連を検討し、これらの疾患患者ではどのような病態が感染ハイリスク群に属するか、また重症化のリスク予見の可能性について、IFN- $\alpha$  産生能や血中 IFN などの検査でどの程度予測可能か、検討した。また感染症を契機に重篤な急速進行型腎炎を含む血管炎を呈する MPO-ANCA 関連血管炎のサイトカインストームを呈する状況での急性期の IFN 産生能を検討し、

他の疾患との比較を行なった。

IFN 産生能は、患者から静脈血を 5mL へパリン採取し、採血後 8 時間以内に 500HA/ml Sendai virus (HVJ) にて刺激し IFN 産生能を bioassay にて測定した。血中 IFN については ELISA および、bio-plex 法にて測定した。

### 4. 研究成果

#### a. 健常人と各疾患患者の IFN 産生能

2009 年に流行した新型インフルエンザは 2010 年には一部地域での小規模な流行は散見されたが、幸いにして大流行はなく、申請者が対象として観察していた、糖尿病患者、腎炎患者、慢性閉塞性肺疾患患者の間での流行も特に認められなかった。従って、新型インフルエンザ感染リスクと IFN 産生能について検討するという当初の研究目的は遂行することが出来なかった。そこで、各疾患が抱えている他の感染症や疾患の悪化との関連について検討を行った。

対象とした疾患は糖尿病（京都府立医大、糖尿病受診患者）、MPO-ANCA 腎炎および PR3-ANCA 腎炎患者（北野病院入院患者）、COPD 患者（京都大学医学部附属病院呼吸器内科を受診患者）、健常人（レイ・パストゥール医学研究センターにて免疫ドック受診者）である。各組織における倫理委員会の承認のもとに、対象者から informed consent を得て検査を行った。

図に示すように、健常人は  $10830 \pm 831$ 、糖尿病患者  $5571 \pm 854$ 、COPD  $6796 \pm 681$ 、MPO-ANCA 腎炎  $4784 \pm 770$ 、PR3-ANCA 腎炎  $7591 \pm 2527$  (IU/ml) と、糖尿病、COPD、MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- $\alpha$  産生能は健常人に比較して有意に低下していた。

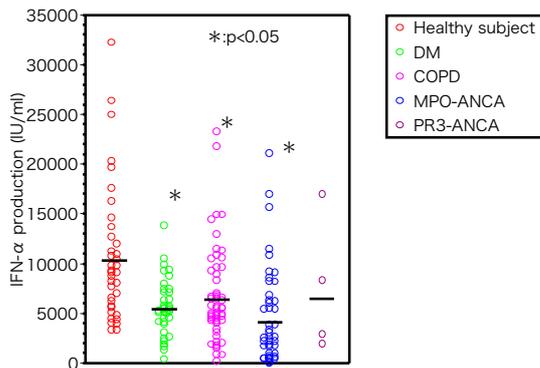


図1 健常人と各疾患患者の IFN 産生能

### b. 糖尿病患者の IFN 産生能と感染抵抗性

糖尿病患者の IFN 産生能は図 1 に示すように健常人に比較して有意に低下していた。期間中に大きなインフルエンザ流行はなく、IFN 産生能測定患者での、インフルエンザ感染はなかった。そこで糖尿病患者の病態悪化との関連が近年指摘されている、歯周病と IFN 産生能について検討したところ、歯周病無し群 (n=26) では  $6169 \pm 531$ 、有り群 (n=9) では  $3846 \pm 902$  (IU/ml) となり、有り群で IFN 産生能が有意に低下していた (P=0.033)

### c. APO-ANCA 腎炎患者の IFN 産生能と感染抵抗性

MPO-ANCA腎炎患者の主たる死因は感染症であることが、これまでに報告されている。そこで IFN- $\alpha$  産生能を測定したところ、他の疾患と比較しても特に低値である割合が高いことが明らかとなった。IFN- $\alpha$  産生能不全の原因としては、1)、IFN産生細胞である、pDC数の減少、あるいは pDC機能の不全、2)、IFN産生調節の不全等が考えられた。

#### c-1. MPO-ANCA 腎炎の IFN- $\alpha$ 産生能とプラズマサイトイド樹状細胞

pDC が主たる IFN- $\alpha$  産生細胞であることはよく知られた事実なので、IFN- $\alpha$  産生能低値の原因を探るために同時に、末梢血中の pDC 数を計測した。pDC は CD3、CD19、CD14 (T 細胞、B 細胞、単球でない)、BDCA-2+ (CD303+)、HLA-DR+細胞を pDC とした。

図 2 に示すように健常人や糖尿病患者では特に減少は認められなかったが、MPO-ANCA 腎炎患者では約半数が 1000 個以下であり、極端に pDC 数が大きく減少している症例があること

が明らかとなった。また、IFN 産生能との関連をみたところ、特に産生能低値群で減少が認められた。PR3-ANCA 腎炎では症例が少なく、今後の検討が必要である。

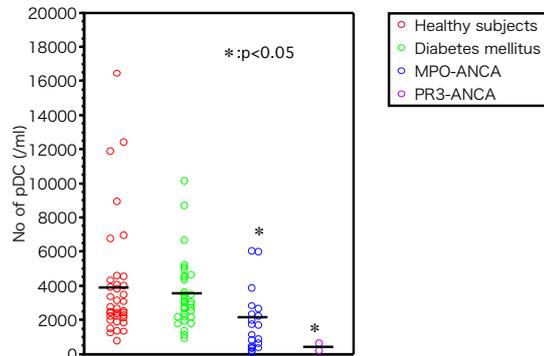


図2 プラズマサイトイド樹状細胞数

#### c-2. MPO-ANCA 腎炎の IFN- $\alpha$ 産生能と血中 IFN- $\alpha$ 、 $\beta$ の検討

Type I IFN (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ) は、弱い Type I IFN の存在により、更に大量の IFN を産生 (Priming)、一方、十分量の IFN が産生されると産生が抑制されるという調節作用がある (Negative regulation)。従って、低 IFN 産生と血中 IFN との関連について検討した。

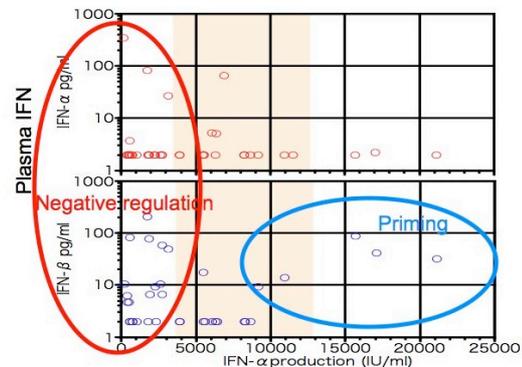


図 3 MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- $\alpha$  産生能と血中 IFN- $\alpha$ 、 $\beta$

表 1 MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- $\alpha$  産生能と血中 IFN- $\alpha$ 、 $\beta$

	IFN- $\alpha$ production (IU/ml)		
	$\leq 4,000$	4,000 - 9,000	$\geq 9,000$
n	23 (100%)	12 (100%)	6 (100%)
Plasma IFN- $\alpha$ positive	5 (21.7%)	1 (8.3%)	0 (0%)
Plasma IFN- $\beta$ positive	13 (56.5%)	1 (8.3%)	6 (100%)

健常人、MPO-ANCA 腎炎患者の血中 IFN- $\alpha$  および  $\beta$  を測定した。健常人からは、ほとんど血中 IFN は検出できなかった。一方、MPO-ANCA 腎炎

患者の血中からは IFN 産生低値群で、高頻度で IFN- $\alpha$  および  $\beta$  が認められた。(図 3、表 1)。

### C. 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の IFN 産生能と増悪

COPD 患者のインターフェロン産生能を測定し、これまでに外来で施行してきた呼吸機能検査・CTを含めた画像・COPD 日誌・診療録などとの関連を検討した。前向きに 1 年間の増悪回数を検討した。増悪は日誌に基づいて測定した。

表 2 COPD 患者の背景

患者背景		n=49
年齢 (年)		72.9 (64.6-81.3)
性別 (男/女)		47/2
Pack-years		64.3 (29.7-98.6)
現/過去喫煙		7/42
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		21.9 (19.6-23.6)
FEV <sub>1</sub> (L)		1.40 (0.96-1.86)
MRC		1 (0-2)
BDI		9 (8-10)
在宅酸素療法		3cases
平均増悪回数 (/年)		0.57
GOLD ( I / II / III / IV)		(4/20/20/6)

median (25th-75th percentiles)

最終的に 49 人が解析対象となった。患者背景を表 2 に示す。IFN 産生能を健常人のそれと比較したところ、前述のように、慢性閉塞性肺疾患患者では有意に低下していた。平均増悪回数は 0.57 回/年であり、エントリー時の IFN $\alpha$  産生能と増悪回数・肺機能との間には直接の関連は認められなかった(図 4)。以上の結果は IFN 産生能と増悪回数との間に、関連は認められなかったという結果となった。ただ、増悪回数が非常に少なく(平均 0.57 回) 検出できなかった可能性も考えられた。

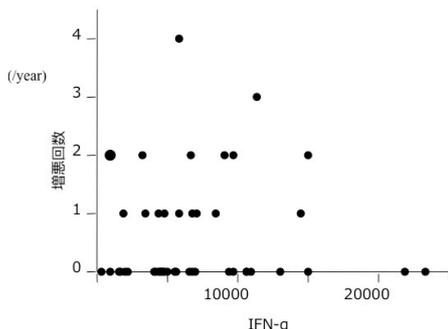


図 4 COPD 患者の増悪回数と IFN- $\alpha$  産生能

### D. 結語

感染重症化リスクの高い、糖尿病、MPO-ANCA 腎

炎、慢性閉塞性呼吸器疾患(COPD)患者と健常人の IFN- $\alpha$  産生能比較したところ、これら疾患患者では IFN- $\alpha$  産生能が有意に低下している事が明らかにされた。しかしながら、更に各疾患に於ける低値群と高値群での感染との関連については、十分な検討が出来なかった。部分的ではあるが、歯周病群で、IFN 産生能の低下が認められた。

### 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 10 件)

1. Tominaga M, Uno K, Yagi K, Fukui M, et al., Association between capacity of interferon- $\alpha$  production and metabolic parameters. J IFN cytokine Res. 2010 vol 30, No.7, 35-38.
2. 宇野賀津子, 八木克巳, 他 健常人における IFN- $\alpha$  産生能と加齢の影響 Pasken J (2008/2009) Vol.21/22 P1-4
3. Phung TT, Sugamata R, Uno K, et al., Key role of regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, non- structural protein1 and myeloperoxidase in cytokine storm induced by influenza virus PR-8 (A/H1N1) infection in A549 bronchial epithelial cells. Microbiol Immunol. 2011 Dec;55(12):874-84.
4. Miyata H, Uno K, Muso E, et al., Low density lipoprotein apheresis ameliorates interferon- $\gamma$  production in patients with nephrotic syndrome. Ther Apher Dial. 2012 Apr;16(2):189-94
5. Ozaki S, Muso E, et al., Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: the JMAAV study Mod Rheumatol. 2012 Jun;22(3):394-404.
6. Wada T, Hara A, Arimura Y, Muso E et al., Risk factors associated with relapse in Japanese patients with microscopic polyangiitis. J Rheumatol. 2012 Mar;39(3):545-51.
7. Takahashi T, Muro S, Uno K, et al., Relationship between periodontitis- related antibody and frequent exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. PLoS One. 2012;7(7): e40570.
8. Yamanishi Y, Uno K, Muso E, et al., Clinical features of patients with anti-neutrophil cyto- plasmic autoantibodies targeting native myelo- peroxidase antigen. Mod Rheumatol. 2012 Oct 21

9. Uno K, Yagi K, et al., IFN production ability and healthy ageing: mixed model analysis of a 24 year longitudinal study in Japan. *BMJ Open*. 2013 Jan 11;3(1).

10. Kudo D, Uno K, et al., Low-dose Interferon- $\alpha$  Treatment Improves Survival and Inflammatory Responses in a Mouse Model of Fulminant Acute Respiratory Distress Syndrome. *Inflammation*. 2013 Feb 14.

[学会発表] (計 25 件)

1. Uno K, Yagi K, Muso E, Fukui M, et al., Effect of age and diseases on Human Type I IFN System 2010.8.22-27 14th International Congress of Immunology, Kobe Japan

2. Uno K, Yagi K, et al., Ageing Effects on Human Type I IFN System in Healthy Subjects 2010 Joint Meeting of ICS and ISICR Chicago

3. 富永真澄, 宇野賀津子, 八木克己, 福井道明, 他 IFN- $\alpha$  産生能と代謝因子 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 (岡山) 2010.5.27-29

4. 宇野賀津子 未病先防: インターフェロン・サイトカインシステム測定の有用性 シンポジウム「免疫と老化の最前線」 第 10 回抗加齢医学会総会 (京都) 2010.6.11-13

5. Muso E, Uno K, et al., Effect of IVIg monotherapy on “cytokine and chemokine storm” in acute phase of MPO-ANCA positive MPA ISN NEXUS April 15-18, 2010 (Kyoto, Japan)

6. 武曾恵理, 宇野賀津子, 他 MPO-ANCA 陽性 MPA への IVIg 療法の急性期の血中サイトカイン・ケモカインに対する抑制効果 第 53 回日本腎臓学会 2010.6.17 (神戸)

7. 宇野賀津子 ヒト IFN システム不全と感染抵抗性、癌抵抗性 シンポジウム「私たちの身体を守る IFN システム」第 75 回日本 IFN・サイトカイン学会学術集 2010.6.25-26

8. 高橋珠紀, 室 繁郎, 寺田邦彦, 宇野賀津子, 他 血清歯周病抗体価と COPD (慢性閉塞性肺疾患) 増悪との関連性 第 75 回日本 IFN・サイトカイン学会学術集会 2010.6.25-26

9. 宇野賀津子, 他 健康人、癌からの長期生存者、末期癌患者の IFN- $\alpha$  産生能の個人史の比較 (Comparison of IFN-alpha production in healthy subjects, long term cancer survivors and non-survivors) 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪) 2010.9.22-24

10. Muso E, Uno K, et al., Effect of IVIg monotherapy on “cytokine and chemokine storm” in acute phase of MPO-ANCA positive microscopic polyangiitis (MPA) 15th International Vasculitis & ANCA Workshop. May 15-18, 2011, in Chapel Hill, North Carolina

11. Uno K, Muso E, et al., Impairment of IFN- $\alpha$  production, peripheral plasmacytoid dendritic cell number and susceptibility to MPO-ANCA-associated glomerulonephritis and vasculitis 9<sup>th</sup> Joint Conference of the ICS and the ISICR, Italy, Oct. 9-11, 2011

12. 宇野賀津子, 武曾恵理, 他 ヒトのサイトカイン産生能と疾患特性、個人特性の検討 第 16 回 MPO 研究会 2011.1.28 (仙台)

13. Uno K, Yagi K, 他 Aging effects on human type I IFN system: generalized linear mixed model analysis of longitudinal study for 24 years

第 76 回日本 IFN・サイトカイン学会/第 19 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポ (大阪)

14. 宇野賀津子, 武曾恵理, 他 MPO-ANCA 関連血管炎患者の IFN システム不全と感染抵抗性 第 17 回 MPO 研究会 2011.10.25 (熊本)

15. Uno K, Tanigawa M Aging effects on human type I IFN system: linear mixed model analysis of 24 year longitudinal study 第 40 回日本免疫学会 2011.11.27-29 (幕張)

16. Phung TT, Uno K, et al., MPO and NS-1 modulate cytokine/chemokines induced by influenza A H1N1 virus via down-modulation of excessive immune responses in mice 第 40 回日本免疫学会 2011.11.27-29 27, 23.

17. Kudo D, Uno K, Ishi K, Kushimoto S, Kawakami K Anti-inflammatory and therapeutic effects of interferon- $\alpha$  in a mouse model of acute respiratory distress syndrome. 第 40 回日本免疫学会 2011.11.27-29 (幕張)

18. Uno K, Muso E, Yagi K, et al., Dysfunction of IFN system causes susceptibility to infection in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis 3.28-31 Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012 (東京)

19. Muso E, et al., Evaluation of the Newly Proposed Histological Classification Based on Glomerular Lesion 3.28-31 Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012 (東京)

20. Endo T, Iwasaki Y, Uno K, Muso E, et al., :

Specific Cytokines as the Predictor of Chronicity and Prognosis in Patients with MPO-ANCA Positive MPA 3.28-31 Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012 (東京)

21. 遠藤知美, 宇野賀津子, 武曾恵理 他 MPO-ANCA 陽性 MPA 患者において、発症時 SCF 値は腎予後予測因子の可能性を有する 第55回日本腎臓学会学術総会 2012.6.1 (横浜)

22. Uno K, Yagi K, et al., Comparison of serum cytokine/chemokine level in healthy individuals, influenza and Castleman's disease patients: Using beads based multi-plex assay to determine diseases specific cytokine /chemokine pattern. 10<sup>th</sup> ICS and ISICR, 2012 (ジュネーブ)

23. Endo T, Muso E :Need of Interstitial Fibrosis Parameter on the Newly Proposed Simplified Glomerular Histological Classification to Predict the Long Term Outcome in Japanese Cohort of MPO-ANCA Associated RPGN ASN kidney Week Nov1-4 2012 (SanDiego USA)

24. Uno K, Yagi K, et al., Comparison of serum cytokine/chemokine level in healthy individuals, influenza and Castleman's disease patients: Using beads based multi-plex assay to determine diseases specific cytokine /chemokine pattern 2012.11.16-17 第18回MPO研究会 京都

25. Uno K, Muso E, Ito-Ihara T, Inaba K, Yasuda Y, Suzuki K Dysfunction of IFN system causes susceptibility to infection in patients with MPO-ANCA- associated vasculitis 2012.12.4-6 第41回日本免疫学会学術集会 神戸

[図書] (計6件)

1. 宇野賀津子 インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  日本臨床 63 巻増刊号 8 広範囲血液・尿化学検査 免疫学検査—その数値をどう読むか— [第7版] p96-101, 2010

2. 宇野賀津子 私たちの身体を守るインターフェロンシステム Schneller 2011, No.77,12-17

3. 宇野賀津子 免疫とアンチエイジング アンチエイジング 総合臨床 2011 Vol.60, 343-350

4. 宇野賀津子 他編 サイトカインハンティング 先頭を駆け抜けた日本人研究者達 京大出版会

5. 武曾恵理 : 1. 腎炎・ネフローゼ 急速進行性糸球体腎炎、ANCA 関連血管炎の治療における感染症と全身管理はどのように行うのでしょ

うか。EBM 腎臓病の治療 2011-2012 富野康日己監修、柏原直樹 南学正臣編集 中外医学社 pp53-59, 2011

6. 武曾恵理 : 第3章 RPGN の成因・病態生理 Q15 RPGN と半月体形成性壊死性糸球体腎炎との関係を教えてください。第6章 RPGN の治療 (1) 初期治療指針と病型ごとの初期治療 Q28 わが国のかかりつけ医を中心とした地域医療体制に対する RPGN の初期治療指針を教えてください Q29 わが国の ANCA 陽性 RPGN の初期治療指針の概要を教えてください。第7章 RPGN の治療 (2) 難治例, 再燃例の治療と寛解維持療法 Q44 ANCA 関連 RPGN 寛解導入期の難治例に対するIVIg 療法を教えてください。Q45 ANCA 陽性 RPGN 再燃時の難治例に対するIVIg 療法を教えてください。急速進行性糸球体腎炎 診療ガイド Q&A 第7章 RPGN の治療 急速進行性糸球体腎炎症候群 第2版ダイジェスト版 pp. 105-109 診療と診断社 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 賀津子 (UNO KAZUKO)

ルイ・パストゥール医学研究センター 基礎研究部 インターフェロン・生体防御研究室室長  
研究者番号 : 50211082

(2) 研究分担者

八木 克巳 (YAGI KATSUMI)

ルイ・パストゥール医学研究センター 基礎研究部 統計学研究室研究室主任研究員  
研究者番号 : 90029728

(3) 研究分担者

武曾 恵理 (MUSO ERI)

(財) 田附興風会 医学研究所

第3研究部 研究主幹

研究者番号 : 10190852

(4) 研究分担者

福井 道明 (FUKUI MICHIAKI)

京都府立医科大学 医学研究科 講師

研究者番号 : 30247829

(5) 研究分担者

室 繁郎 (MURO SHIGEO)

京都大学・医学研究科 講師

研究者番号 : 60344454