

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461585

研究課題名(和文) 血管内皮細胞におけるインフルエンザ重症化宿主因子の検討

研究課題名(英文) Investigation of host factors for severe influenza virus infection

研究代表者

山下 信子 (Yamashita, Nobuko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40379798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスが気道上皮に感染した場合、血管内皮細胞でIL-11、Fas L、Angiotensin II receptor遺伝子の発現上昇が認められ、これはインフルエンザウイルス特異的な反応と考えられた(in vitro)。また、気道上皮におけるインフルエンザウイルス複製に関与する遺伝子としてVNN1を新たに同定した。VNN1はPantetheineを加水分解する酵素であり、Pantetheineの分解産物であるCysteamineにウイルス複製抑制作用があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Results: (i) Increased expression of IL-11, Fas L, Angiotensin II receptor genes was observed in vascular endothelial cells, when influenza virus infected the respiratory epithelium (in vitro). It was thought to be an influenza virus specific response. (ii) VNN1 was newly identified as a gene involved in influenza virus replication in the respiratory epithelium. VNN1 is an enzyme that hydrolyzes pantetheine, and it was found that cysteamine which is a degradation product of pantetheine, has a virus replication inhibiting action.

研究分野：小児感染症

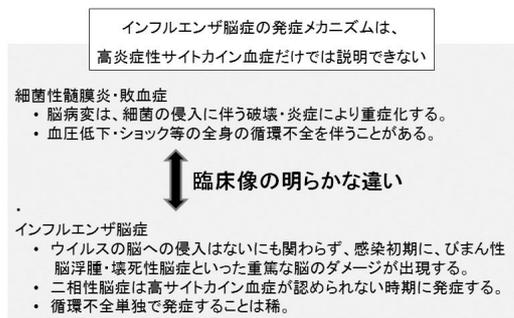
キーワード：インフルエンザ VNN1

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ脳症の脳病変には、発病初期にびまん性に出現するという大きな特徴がある。しかしこのような広範囲の脳病変は、同じように高サイトカイン血症を呈する細菌性髄膜炎では認められない。この違いから、インフルエンザ脳症では、高サイトカイン血症に加えて、血管内皮細胞・脳血管関門 (BBB) に何らかの未知の反応が生じているということが推測できる。

また、インフルエンザ感染特有時の血管の反応は、脳症だけでなく、軽症者の眼結膜充血にも見てとることができる。

### インフルエンザ感染時には、血管内皮細胞に何か特異的な反応が生じているのか?と考えられた。



### 2. 研究の目的

(1) インフルエンザウイルス感染特有の、血管内皮細胞の反応を明らかにする。

(2) 我々の報告「Yamashita N et.al, Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int.* 2013」では、「2009H1N1pdm 患者末梢血プロファイル」では、重症者(肺炎群・中枢神経症状群)と軽症者との末梢血の遺伝子プロファイルをマイクロアレイを用いて比較し、重症化に関与する遺伝子が推測できている(表1)

これらの遺伝子についても、本研究で、更に検討を行った。

### 3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス感染時の、血

表1

Gene Symbol	Gene Title	Probe ID	Fold Change (Pneumonia / Control)	Fold Change (CNS / Control)
CNTNAP3	contactin associated protein-like 3	223796_at	15.47	18.27
CNTNAP3B	contactin associated protein-like 3B	244065_at	23.68	29.11
OLAH	oleoyl-ACP hydrolase	219975_x_at	15.58	3.03
		233126_s_at	7.46	5.43
VNN1	vanin 1	1558549_s_at	9.10	3.39
		205844_at	5.37	3.36
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	204748_at	<2	6.01
		1554997_a_at	<2	4.33
SNCA	synuclein, alpha	207827_x_at	<2	3.37
		211546_x_at	<2	3.11
		204467_s_at	<2	3.41
		204468_s_at	<2	4.91

管内皮細胞の反応に対しては、気道上皮細胞とヒト正常血管内皮細胞の共培養系をもちいて、インフルエンザウイルス感染(A/H1N1) + サイトカイン添加(TNF-α)を行った場合の血管内皮細胞の遺伝子発現を PCR アレイ (Human Endothelial Cell Biology Panel; Qiagen) を用いて評価した。本パネルで、84 血管内皮細胞特異的遺伝子を、リアルタイム PCR プロファイリングすることが可能である。

(2) 表1にあげられた遺伝子の中で、特に VNN1 (vascular non-inflammatory molecule 1, vanin-1) における作用に着目して検討を行った。VNN1 は、上皮細胞(主に腸上皮)に発現している。その作用は、食品中補酵素 (CoA) から生じるパンテテイン (pantetheine) を加水分解し、パントテン酸 (pantothenic acid; VitB5) と、システアミン (Cysteamine) を生成するというものである。ヒト肺胞上皮由来の A549 細胞を用いて、VNN1 が、インフルエンザウイルス増殖を抑制することを明らかにした。

### 4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルス感染特有の、血管内皮細胞の反応 (PCR アレイ (Human Endothelial Cell Biology Panel; Qiagen) の結果を表2に示す。

表2

Fold Change (comparing to control group)				
TNF	IV	TNF+IV		
Fold Change	Fold Change	Fold Change		
4005.1	1194.0	6562.4	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
5269.5	842.9	5184.5	SELE	Selectin E
311.0	183.6	382.0	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
387.1	79.6	300.2	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
2102.7	67.6	873.1	CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
3.2	23.4	1.8	IL11	Interleukin 11
1.5	20.6	1.2	FASL	Fas ligand
12.1	17.0	124.5	IL1B	Interleukin 1, beta
13.5	12.2	121.9	IL6	Interleukin 6
0.4	6.9	5.1	AGTR1	Angiotensin II receptor, type 1
7.6	6.0	19.2	PF4	Platelet factor 4
11.3	4.5	20.3	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
0.1	0.81	0.1	NOS3	Nitric oxide synthase 3
4.7	0.51	5.9	MMP9	Matrix metalloproteinase 9

TNF-α添加、またはInfluenza virus (IV) 感染させたヒト肺胞上皮細胞と共培養を行った場合のヒト血管内皮細胞(HUVEC)の遺伝子変化 (PCR array)

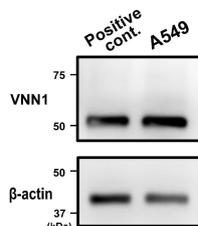
表2の結果から、インフルエンザウイルス感染時の血管内皮細胞の遺伝子変化について、これまで報告されていない新たなものが見つかった (IL-11、Fas L、Angiotensin II receptor)。IL-11については、単球・マクロファージに作用し、炎症性サイトカイン産生する働きを抑制する作用があり、気管支喘息様症状との関係が示唆される。また、Angiotensin II receptor は、トリインフルエンザの重症患者血清で上昇しているとの文献報告があるが、この結果から、Angiotensin II receptor は H1N1 でも関与している可能性が示された。FasLについては、炎症細胞の血管外浸潤制御に関与しているといわれている。しかし、主に動脈硬化における研究が主であり、感染領域での報告はほとんどない。低酸素を刺激で上昇するともいわれている。

(2) VNN1 (vascular non-inflammatory molecule 1, vanin-1) がインフルエンザウイルス感染に果たす役割

A549 細胞における蛋白発現の確認 (Western blot)

VNN1 は、これまで腸上皮・肝臓・腎臓で検討されてきた。そのため A549 細胞での VNN1 蛋白発現を確認した (図1)。

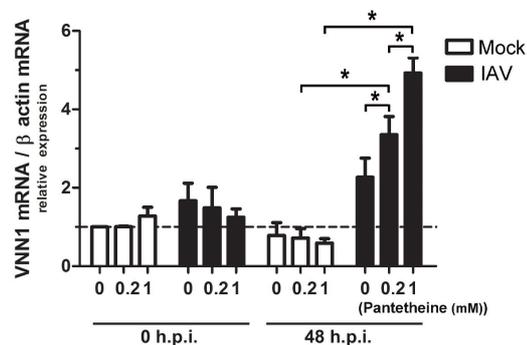
図1



インフルエンザウイルス感染 + pantetheine 添加で、A549 細胞における VNN1 mRNA 発現は、有意に上昇する。

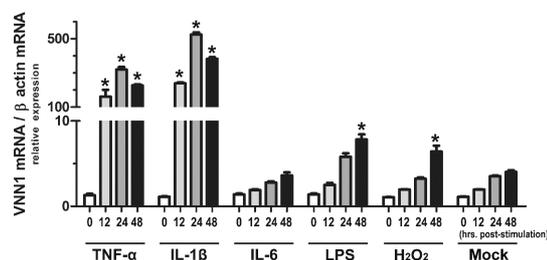
VNN1 の基質である pantetheine を培地に 0.2mM, 1mM で添加した場合、インフルエンザウイルス感染 48 時間後の VNN1 mRNA は、pantetheine 濃度に比例して増加した (図2)。

図2



細胞内 VNN1 mRNA 量は、培地に TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  を添加することによって、数百倍と著明に上昇した。インフルエンザ重症患者では、血中 TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  が上昇する (Hypercytokinemia) ことが知られており、この系が、特に重症患者で重要になる可能性が示唆された。(図3)

図3



Pantetheine 添加で、A549 細胞におけるインフルエンザウイルス複製は減少する。

A549 細胞にインフルエンザウイルスを MOI 0.1 で感染、トリプシン添加で培養した。培養開始 48 時間後の 培養上清のウイルス感染価 (図4(A)) と、A549 細胞のウイルス mRNA 量 (図4(B)) を示す。

図4(A)

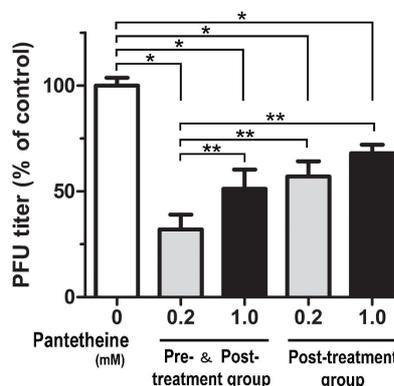
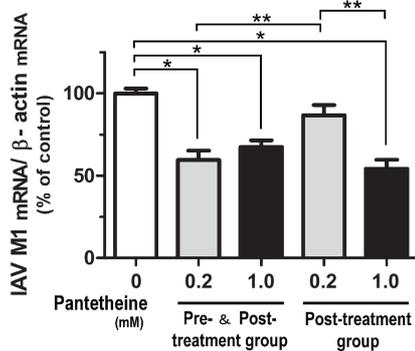


図4(B)



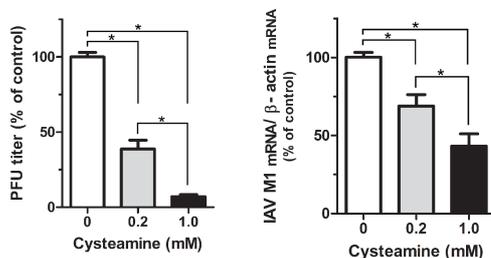
いずれも Pantetheine をインフルエンザ感染する前から添加した群で (Pre and post treatment group) で、ウイルス量の減少が認められた。また、図 4 には示していないが、Pantetheine 添加の有無で、ウイルス侵入(感染後 8 時間のウイルス mRNA 量)に差は認められていない。このため、Pantetheine 添加により、VNN1 発現が上昇し、ウイルス複製を抑制していると考えられた。

Pantetheine の加水分解産物である Cysteamine と Pantotheic acid のどちらが、インフルエンザウイルス複製を抑制したのかについて、検討を行った。インフルエンザウイルス感染後、培地に Cysteamine と Pantotheic acid を添加して、48 時間後の培養上清のウイルス感染価と、A549 細胞のウイルス mRNA 量を検討した。

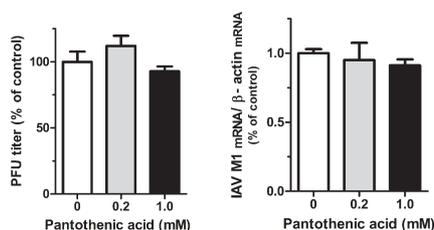
図 5 に示すように、Cysteamine 添加で著明なウイルス量の減少が認められた。

図 5

Cysteamine:



Pantotheic acid:



以上より、気道上皮細胞の VNN 1 は、Pantetheine を加水分解 分解産物 Cysteamine により、インフルエンザウイルス複製抑制する作用があることが明らかとなった。また、VNN 1 の作用は、インフルエンザウイルス感染が引き起こす高サイトカイン血症 (TNF-α・IL-1β) によって増強する可能性が示唆された。

## 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 1 件)

Yamashita N., Yashiro M., Ogawa H., Namba H., Nosaka N., Fujii Y., Morishima T., Tsukahara H., Yamada M. Metabolic pathway catalyzed by Vanin-1 pantetheinase plays a suppressive role in influenza virus replication in human alveolar epithelial A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (In press, May 29, 2017 accepted) 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

山下信子、難波ひかる、小川寛人、山田雅夫、Pantetheine-Vanin-1-Cysteamine 系は、A549 細胞でインフルエンザウイルス増殖を抑制する、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日～25 日、札幌コンベンションセンター(北海道)

〔図書〕(計 1 件)

1: Yamashita N. Neurotropic Influenza infections. *Neurotropic viral infections 2nd edition* (ed. Carol S. Reiss), Springer International Publishing, Switzerland, (2016) Volume 1, 295-314

〔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)研究代表者

山下 信子 (YAMASHITA Nobuko)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・病原  
ウイルス学・助教  
研究者番号：40379798

(2)研究分担者

八代 将登 (YASHIRO Masato)  
岡山大学・大学病院・小児科・助教  
研究者番号：80585943

難波 ひかる (NAMBA Hikaru)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・病原  
ウイルス学・助教  
研究者番号：20273972