

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591187
 研究課題名（和文） ウイルス感染症におけるスタチン系薬の宿主応答作用と抗ウイルス作用の解明
 研究課題名（英文） Regulatory effects of statin reagents on both host responses and viral productions in the infections
 研究代表者
 高橋 孝（TAKAHASHI TAKASHI）
 北里大学・大学院感染制御科学府・研究員（客員教授）
 00292855

研究成果の概要：動物モデルや細胞実験を用いて、ウイルス感染症におけるスタチン系薬の宿主応答作用と抗ウイルス作用を解析した。肥満マウスのウイルス性心筋炎モデルではウイルス感染前からのスタチンの予防投与によって死亡率の低下が認められ、その機序として腹腔内マクロファージにおける機能や形質の調節が介在することが考えられた。さらに、ヒト胎児肺線維芽細胞へのサイトメガロウイルス感染実験において、スタチンによるウイルス産生の抑制が見られ、宿主細胞における分化増殖に関わる遺伝子群の発現変動が関与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：感染症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病－アレルギー－感染症内科学

キーワード：①ウイルス感染症・②スタチン・③宿主応答・④抗ウイルス作用

1. 研究開始当初の背景

(1) HMG-CoA 還元酵素阻害薬として高コレステロール血症の治療に利用されているスタチン系薬が敗血症や市中肺炎の死亡率を低下させたと報告されている。このようなスタチン系薬の効果発現の機序として、抗炎症作用や免疫調節機構が推測されているが、未だ、不明な点が多い。

(2) 世界的に高病原性鳥インフルエンザを含めたインフルエンザの大流行に対して危機感を深めている。米国感染症学会でのイン

フルエンザ流行対策委員会では、インフルエンザの予防・治療薬としてのスタチン系薬の利用に期待を寄せている。なぜならば、ワクチンやオセルタミビルよりスタチンが安価であるという点と同薬の抗ウイルス(ポリオウイルス・HIV)作用が実証されているからである。

(3) 我々は肥満マウスに対する心筋炎ウイルス接種による致死的なウイルス感染症モデルを既に確立している。さらに、新興感染症であるヒトメタニューモウイルス気道感

感染症の高齢者における集団発生を経験して、高齢者を対象とした感染症のサーベイランス環境が整備されている。これらを踏まえて本研究の実施展開へ応用したい。

2. 研究の目的

本研究では、以下の項目を明確にすることを目的とする。

(1) ウイルス性心筋炎モデルの生存率改善に寄与するスタチン系薬の至適な投与開始時期と至適な用量を決定する。

(2) スタチンが投与されたウイルス性心筋炎モデルより分離した腹腔内マクロファージを用いて、マクロファージ表現型への作用を明らかにする。

(3) ヒトより分離した末梢血単球を用いて、スタチン内服の有無に分けた単球表現型の相違を解析する。

(4) ヒト単球やヒト線維芽細胞の培養系を利用したヒトサイトメガロウイルスとスタチンとの共培養により、同薬の抗サイトメガロウイルス作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肥満症と健常のマウスへ心筋炎ウイルス(500 pfu/マウス)を接種して致死的なウイルス性心筋炎を発症させる。スタチン系薬(simvastatin/pravastatin)とプラセボを上記ウイルス接種の4日前、接種当日、接種4日後の3ステップより開始し、スタチンは0.1-0.5-1.0 mg/kgの3用量で連日皮下投与を行う。2週間の生存観察と共に、ウイルス接種の4日前-接種当日-接種4日後-8日後-12日後における心臓を含めた各臓器や腹腔内マクロファージの採取を通じて病態の形成や改善を評価する。

また、スタチン系薬以外の介入として、スタチン骨格を有する白血球機能抗原阻害薬を上記方法と同様に投与し、生存率を確認する。

(2) (1)で確認された至適な投与開始時期と用量でスタチン投与を受けたウイルス性心筋炎のマウスより感染の3日前-感染当日-感染3日後-6日後-9日後の各段階において腹腔内マクロファージを回収・分離する。分離されたマクロファージを用いて羊赤血球に対する食

食機能とフローサイトメトリーによる細胞表面抗原の発現解析を実施する。

(3) ヒトより分離する末梢血単球を利用する研究の予備的な実験として、ヒト単球細胞系(THP-1)の培養を確立する。インターフェロン- γ (5 unit/ml)の刺激下あるいは非刺激下において、3段階の濃度(0.1-1.0-10 [M])のスタチンあるいはプラセボを細胞へ曝露させて、THP-1における表面抗原(樹状細胞抗原-白血球機能抗原-細胞間接着分子抗原)の発現度をフローサイトメトリーにて解析する。

(4) ヒト胎児肺線維芽細胞系(MRC-5)とサイトメガロウイルス(Towne株)・スタチン(simvastatin, pravastatin, mevastatin, lovastatin—濃度 0.01-0.1-1-10[M])との共培養を行う。培養上清中におけるサイトメガロウイルスの力価(プラーク形成能)、ウイルスmRNAの発現量(定量的PCR)、ウイルス由来早期抗原—後期抗原の発現度(WB)を測定して、抗ウイルス効果を評価する。

そして、DNAマイクロアレイ(Affymetrix GeneChip® arrays)を用いて感染早期(1日目)⇒後期(3日目)における宿主細胞遺伝子群の発現変動を網羅的に解析する。プラセボと比較してスタチン投与下にて2倍以上に発現上昇あるいは低下した遺伝子群を同定する。さらにIngenuity Pathway Analysis (Ingenuity systems Inc.)を利用してスタチン投与に伴う変動遺伝子群が有する機能を推測する。

4. 研究成果

(1) 脳心筋炎ウイルスによる心筋炎を呈した肥満症マウスでは、プラセボ群と比較してsimvastatin投与群でその生存率が有意に良好であった(図1)。そして、その至適な投与開始時期と用量はウイルス接種の4日前と0.5 mg/kg/日であった。ウイルス感染8日後-12日後の心臓病理所見として炎症の軽減も確認さ

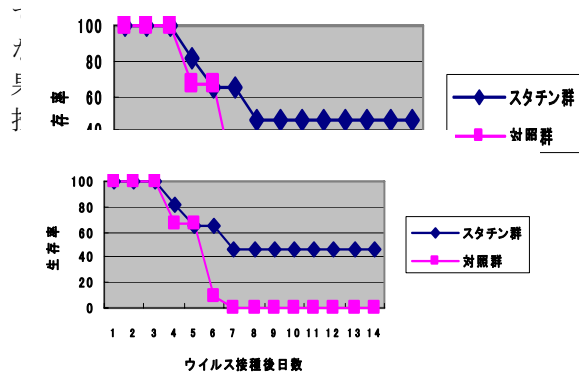


図1 ウイルス性心筋炎の死亡率

また、スタチン骨格を有する白血球機能抗原阻害薬を上記 simvastatin の投与方法と同様にウイルス接種の4日前より0.5 mg/kg/dayの用量で連日皮下投与を実施した。しかし、感染後1週間で全てのマウス(n=20)が死亡し、同薬の生存率向上の効果は確認されなかった。以上の所見から、スタチンによるウイルス性心筋炎の生存率向上の効果は白血球機能抗原の阻害作用以外の機序が関与する可能性が推測された。

(2) プラセボ投与群と比較して simvastatin 投与群から分離された腹腔内マクロファージにおいては、羊赤血球の貪食能がウイルス感染3日後において亢進し、同時期のCD11b(白血球機能抗原)の発現が抑制されていた。これらのデータから、ウイルス性心筋炎の病態改善の一つとして、スタチンによる腹腔内マクロファージの機能や表面抗原発現の調節作用が関わっている可能性が考慮された。

上記(1)(2)のスタチンに関する知見は新規性があり、ウイルス感染症におけるスタチン系薬の位置付けとしてインパクトを与えるものである。

(3) インターフェロン- γ (5 unit/ml) 刺激下における THP-1 の表面抗原(樹状細胞抗原-白血球機能抗原-細胞間接着分子抗原)の発現を解析した結果、インターフェロン- γ 刺激により表面抗原の発現亢進は確認されたが、スタチン(0.1-1.0-10 [M])による発現亢進の有意な抑制は認められなかった。これらの結果より、インターフェロン- γ 刺激時のマクロファージ表面抗原発現へのスタチンによる調節作用は低いものと推定される。この点は、動物モデルにおける腹腔内マクロファージの機能や表面抗原発現のスタチンによる調節作用が認められた所見とは異なり、今回の細胞実験においては介在しない機序が動物実験では存在する可能性があり、この解明が今後の課題である。

(4) ヒト胎児肺線維芽細胞へのサイトメガロウイルス(Towne株)感染実験において、mevastatin(図2)やsimvastatinの共培養でウイルス産生の抑制効果が確認された。そして、ウイルス由来の早期抗原-後期抗原の発現解析では、mevastatinは早期抗原の発現を抑制し、一方、simvastatinは後期抗原の発現を低下させていることが判明した。定量的PCR解析においても、mevastatinによる早期抗原をコードするmRNAの発現量の減少が認められた。以上のデータより、mevastatinやsimvastatinはサイトメガロウイルスの産生抑制作用を有することが発見された。

DNAマイクロアレイを用いた宿主細胞遺伝子発現の網羅的解析では、mevastatinの投与によって感染1日目より有意に発現が抑制した遺伝子としてCDK2/ARF1/IFI16が見られ、発現が亢進した遺伝子としてXRCC2/UBE2を認めた。これらの遺伝子群を機能解析した結果、細胞の分化増殖に関わる遺伝子群であることが判明した。以上のことから、上記のようなサイトメガロウイルスの複製抑制はスタチンによる宿主の細胞周期の調節を介して発揮される可能性が推定される。今後、発現変動した標的分子のmRNA発現量(定量的PCR)を再度検証することにより網羅的解析で得られた所見の妥当性を行う方針である。

(4)におけるスタチンに関するデータも新規性があり、サイトメガロウイルス感染症におけるスタチン系薬の有用性として大きなインパクトを国内外へ提供する。

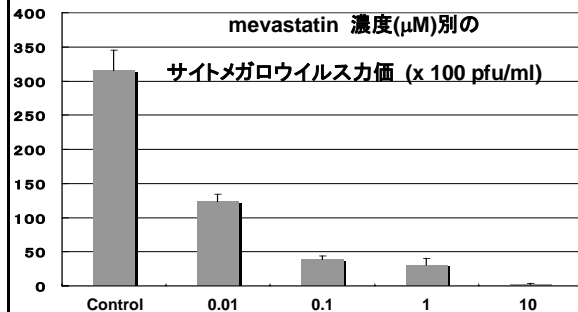


図2 サイトメガロウイルスの産生量

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 6件)

- ① Takashi Takahashi, Miyuki Morozumi, Naoko Chiba, Ryoko Asami, Kozue Kishii, Somay Y. Murayama, Kimiko Ubukata: Co-infection with respiratory syncytial virus subgroup A and *Streptococcus pneumoniae* detected by a comprehensive real-time PCR assay in an elderly patient with community-acquired pneumonia. *J Am Geriatr Soc* (in press) 査読有
- ② 高橋 孝, 村山次哉: スタチンと感染症. *Medical Practice* 26:503-503, 2009. 査読無
- ③ 高橋 孝, 石垣靖人, 高野文英: スタチンの免疫調節作用. *Medical Practice* 26:681-681, 2009. 査読無
- ④ Takashi Takahashi, Koji Nomura, Haruhito Honda, Takeshi Nakahashi, Kunimitsu Iwaj, Mikiko Atsumi, Keiichiro Ishigami, Takashi Inamatsu, Shigeto Morimoto: Association of seroprevalence of human metapneumovirus with C-reactive protein level and

apolipoprotein E-ε4 allele in elderly inpatients in Japan. *J Am Geriatr Soc* 56: 1758-1760, 2008. 査読有

- ⑤ Koji Nomura, Hiroshi Murai, Takeshi Nakahashi, Satoru Mashiba, Yukihiko Watoh, Takashi Takahashi, Sigeto Morimoto: Outbreak of norovirus gastroenteritis among elderly evacuees following the 2007 Noto peninsula earthquake in Japan. *J Am Geriatr Soc* 56: 361-363, 2008. 査読有
- ⑥ Takashi Takahashi, Tsugiyasu Kanda, Nobuo Yamaguchi: Influenza vaccines. *N Engl J Med* 356: 1172-1173, 2007. 査読有

[学会発表] (計 3件)

- ① 高橋 孝. 高齢者におけるヒトメタニューモウイルス抗体価とその感染危険因子. 第106回日本内科学会講演会. 2009年4月10日. 東京都千代田区東京国際フォーラム.
- ② 畢 長暁. スタチン系薬剤のヒトサイトメガロウイルスに対する増殖抑制効果. 第129年回日本薬学会. 2009年3月22日. 京都府京都市国立京都国際会館.
- ③ Takashi Takahashi. Seroprevalence of human metapneumovirus in elderly inpatients in Japan. The 45th Annual Meeting of Infectious Diseases of America Society. 2007年10月6日. アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サンディエゴ.

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 孝 (TAKAHASHI TAKASHI)
北里大学・大学院感染制御科学府・研究員
(客員教授)
00292855

(2) 研究分担者

神田 享勉 (KANDA TSUGIYASU)
金沢医科大学・医学部・教授
40261838
岩井 邦充 (IWAI KUNIMITSU)
金沢医科大学・医学部・准教授
40243274

(3) 連携研究者

生方 公子 (UBUKATA KIMIKO)
北里大学・大学院感染制御科学府・教授
70082302