

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07590

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染における好中球の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of neutrophils in influenza virus infection

研究代表者

今井 正樹 (IMAI, MASAKI)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・国際ウイルス感染症研究センター 部長

研究者番号：30333363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：感染細胞への好中球の接着がインフルエンザウイルスの排除に寄与しているのかどうかを明らかにするために、好中球と接触あるいは非接触条件下で共培養した感染細胞におけるウイルスの増殖性を解析した。接触あるいは非接触条件下におけるウイルス量は、コントロール(好中球未添加)と比べていずれも顕著に低いことがわかった。また、接触条件下におけるウイルス量は、非接触条件よりも有意に低かった。さらに、好中球は感染細胞に直接接触することで、抗ウイルス活性を持つミエロペルオキシダーゼを効率よく感染細胞内に移行させることがわかった。好中球は、感染細胞に直接接着することで、より効果的にウイルス増殖を抑制していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染細胞への好中球の接着がウイルス排除に寄与しているのかどうかを明らかにするために、好中球と共培養した感染細胞でのウイルスの増殖性を調べた。さらに、好中球が接着した感染細胞内における好中球由来殺菌性因子の検出を行なった。インフルエンザウイルス性肺炎における好中球の役割が明らかにされれば、インフルエンザウイルスに対する感染防御機序とウイルス性肺炎の病態形成に関する理解が深まり、さらには好中球による正常組織への傷害を抑制した上で、その抗ウイルス作用を効率よく引き出す新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils rapidly infiltrate the respiratory tract during influenza virus infections in humans. Here, we co-cultured influenza virus-infected human lung epithelial cells with human neutrophils to assess whether the direct interaction of the neutrophils with the infected cells impaired the growth of the influenza viruses. We observed a marked reduction in viral titers in the human lung cells when we directly and indirectly co-cultured these cells with neutrophils in vitro. The titer reduction during direct co-culture was significantly greater than that during indirect co-culture. An immunofluorescence study of the virus-infected cells revealed that the neutrophils efficiently transferred myeloperoxidase (MPO), which has antiviral effects, to the virus-infected cells via direct cell-cell contact. These results suggest that neutrophils interact directly and indirectly with infected cells in the lung during influenza virus infection, and may thereby contribute to antiviral immunity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：A型インフルエンザウイルス感染 好中球 接着 ヘマグルチニン (HA)

1. 研究開始当初の背景

冬季に流行する急性呼吸器感染症の原因ウイルスである季節性インフルエンザウイルスは、主に鼻腔や咽頭などの上気道に感染する。しかし、2009年のパンデミック・H1N1ウイルス(H1N1pdm)は、肺などの下気道にも感染してウイルス性肺炎を引き起こす。さらに、H5N1やH7N9といった鳥インフルエンザウイルスに感染した患者の多くは、早期に下気道症状が出現し重度のウイルス性肺炎を併発する。重篤なウイルス性肺炎を呈した患者には抗インフルエンザ薬の投与に加えて、呼吸器症状や全身症状に応じた対処療法が行われるが、有効な治療法は確立していないのが現状である。

ウイルス性肺炎を呈したH1N1pdm感染患者や鳥インフルエンザ患者の肺組織には、感染局所に浸潤した多数の好中球が観察される。免疫応答の最初の段階で動員される好中球は、細菌感染と同様に種々の殺菌性因子を分泌・放出することで、ウイルス感染拡大を防ぐことが知られている。実際、好中球を除去したマウスにインフルエンザウイルスを感染させると、肺におけるウイルス増殖が亢進されることが示されている。その一方で、好中球から産生される種々の活性物質は正常な組織も傷害するため、その過剰な浸潤は肺炎の重症化の一因となっている。このように好中球は、インフルエンザウイルス性肺炎の病態形成に関与していることが明らかにされてきている。しかし、炎症局所に動員された好中球はどのようにしてウイルスを排除しているのか、その詳細な機序については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

好中球がインフルエンザウイルスを感染させたイヌ腎臓由来の細胞に接着することが先行研究によって示された。しかし、この接着がどのような意義をもつのかは不明である。本研究では、感染細胞への好中球の接着がインフルエンザウイルスの排除に寄与しているのかどうかを明らかにするため、好中球と共培養した感染細胞におけるウイルスの増殖性を解析した。また、好中球が接着した感染細胞内における好中球由来の殺菌性因子の検出を行なった。

3. 研究の方法

ウイルスは、蛍光タンパク質 Venus の遺伝子を組み込んだ A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, Venus-PR8) を用いた。細胞はヒト肺腺癌由来 型肺胞上皮細胞 A549 細胞を用いた。Venus-PR8 を感染させた A549 細胞を 6 時間培養した後、健康者の末梢血から分離した好中球を添加して共培養した。

4. 研究成果

初めに好中球がインフルエンザウイルス感染細胞に接着するかどうかを調べた。感染 A549 細胞と好中球を 1 時間共培養した後、感染細胞を洗浄して、細胞に接着した好中球を蛍光抗体法で検出した。その結果、感染細胞に接着した好中球の数は、非感染細胞に接着したそれよりも 4 倍程度多いことがわかった。

続いて、好中球と共培養した感染細胞におけるウイルスの増殖性を解析した (接触条件)。また、直接的な細胞間接触を防ぐため、感染細胞を含むプレートに Transwell インサートを装填し、好中球をインサート内に添加して共培養した (非接触条件)。添加後 3、6、18、33 及び 42 時間目に回収した培養上清中のウイルス力価をプラークアッセイ法で測定した。非接触条件におけ

るウイルス力価は、添加後 18 時間目と 33 時間目ではコントロール (好中球未添加) とほぼ同じであったが、3、6、及び 42 時間目では有意に低下していた。一方、接触条件におけるウイルス力価は、いずれの時間においてもコントロールと比較して有意に低かった。

好中球との共培養が感染細胞におけるウイルス蛋白質の合成に影響するのかどうかを解析した。インフルエンザウイルス粒子の主要な表面糖蛋白質であるヘマグルチニン (HA) と内部蛋白質である NP について解析した。好中球を添加後 6 及び 18 時間目における発現量を Cell ELISA で定量したところ、接触条件と非接触条件における細胞表面の HA 量は、いずれの時間においてもコントロールに比べて有意に低かった。また、接触条件における HA の発現量の低下は非接触条件よりも大きいことがわかった。一方、NP 発現量は、いずれの条件においてもコントロールと同程度であった。

好中球が分泌する主要な殺菌性因子の一つであるミエロペルオキシダーゼ (MPO) は、インフルエンザウイルス粒子を不活化することが報告されている。さらに、好中球が血管内皮細胞に直接接触すると、MPO が好中球から内皮細胞に移送されることが示されている。そこで、好中球と共培養した感染細胞内において MPO が検出されるのかどうかを調べた。好中球と 1 時間共培養した非感染細胞 (接触条件) あるいは感染細胞 (接触条件と非接触条件) における MPO を蛍光抗体法で検出した。接触条件の非感染細胞と感染細胞の細胞質において、MPO の強い蛍光シグナルが検出された。さらに、感染細胞では、細胞質のみならず核内でも検出された。一方、非接触条件の感染細胞では、細胞質において、MPO の弱い蛍光シグナルが検出された。接触条件の感染細胞で検出された MPO の蛍光強度は、接触条件の非感染細胞と非接触条件の感染細胞よりも有意に高かった。

本研究により、好中球は活性酸素種等の生理活性物質を産生分泌することでインフルエンザウイルス粒子を不活化しているだけでなく、感染細胞に直接接着することで、より効果的にウイルス増殖を抑制していることが示された。この成績は、好中球と感染細胞との相互作用が宿主のウイルス感染に対する生体防御において重要な役割を担っていることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井正樹
2. 発表標題 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの出現と性状
3. 学会等名 第70回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第68回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------