

機関番号：11401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20200081

研究課題名（和文） 高病原性インフルエンザウイルスによる呼吸不全における細胞膜リン脂質の役割

研究課題名（英文） Role of phospholipids in the pathogenesis of respiratory failure mediated by highly pathogenic influenza virus infection

研究代表者

今井 由美子（IMAI YUMIKO）

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50231163

研究成果の概要（和文）：

近年、新型肺炎（SARS）、H5N1 鳥インフルエンザ、新型インフルエンザ等の新興ウイルス感染症が社会的問題となっている。これらのウイルス感染症はヒトに急性呼吸不全や多臓器不全をはじめとした集中治療が必要な重篤な疾患を引き起こす。イノシトールリン脂質（PIs）は、タンパク質との特異的な相互作用を介して細胞内局在および活性を制御し、細胞の極性形成、細胞運動、細胞内物質輸送などの多彩な生命現象を支えている。本研究ではインフルエンザによる重症呼吸不全の発症における宿主 PIs 代謝系の役割を検討した。培養細胞を用いた PIs 代謝関連遺伝子のノックダウンの実験から、PI3P を中心としたパスウェイの関与が示唆された。マウス ICU モデルを用いた PI3P 代謝関連遺伝子欠損マウスによる解析から、インフルエンザウイルスによる呼吸不全の重症化における PI3P を中心としたエンドゾームに存在する PIs の重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Since April 2009, a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus has emerged, and is spreading rapidly among humans on a worldwide scale. Also, H5N1 avian influenza virus continues to cause outbreaks in poultry and sporadic infections in humans. The mortality rate of H5N1 avian influenza in humans has been as high as 60%. Most patients who died of the influenza developed the acute respiratory distress syndrome (ARDS), which is characterized by an extremely severe pulmonary inflammation and respiratory failure. Such patients with ARDS require critical cares including mechanical ventilation in the intensive care units (ICUs). In the present study, using mouse ICU model system, we examined the role of phosphatidylinositol pathway in the pathogenesis of ARDS mediated by influenza virus infection. We found that PI pathway, in particular PI3P related genes, were involved in the influenza virus replication and the pathogenesis of ARDS, suggest the critical role of endosomal PIs in the pathogenesis of severe influenza.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2009 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
総計	22,600,000	6,780,000	29,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：救急医学・集中治療

キーワード：集中治療、呼吸不全、ウイルス感染症、細胞膜イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

近年、H5N1鳥インフルエンザのヒトへの感染が多数報告され、ウイルスが変異してヒトからヒトへ感染するいわゆる“新型インフルエンザ”の大流行を起こすリスクが続いている。H5N1鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの死亡率は60%に及び、この高い致死率の原因となっているのは、制御範囲を逸脱した過剰炎症で特徴づけられる急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)である。重症化した患者では、集中治療室(ICU)における人工呼吸をはじめとした集中治療が救命の鍵を握る。これまで、致死性に繋がるウイルス因子の同定、ワクチンの開発研究が精力的に行われてきた一方、インフルエンザがヒトで重症化する分子メカニズムに関しては不明な点が多い。新型インフルエンザに加え、新興呼吸器感染症、吸入型生物兵器を用いたバイオテロの脅威等の社会的情勢を背景に、ウイルス感染症による重症呼吸不全の病態の解明と新しい治療法の開発が待たれている。

2. 研究の目的

H5N1鳥インフルエンザをはじめとした高病原性インフルエンザの高い致死率の原因は、制御範囲を逸脱した肺局所の過剰炎症、サイトカインの過剰産生で特徴づけられる重症呼吸不全である。一方、イノシトールリン脂質(PIs)は、細胞膜シグナル伝達分子として機能し、細胞の分化、増殖、運動、小胞輸送などの多彩な生命現象を支えている。本研究では、インフルエンザによる重症呼吸不全の発症における宿主 PIs 代謝系の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、PIs 代謝系全体を解析の対象として、培養細胞を用いた PIs 代謝関連遺伝子のノックダウン、マウス ICU モデルによる PIs のリン酸化酵素あるいは脱リン酸化酵素の遺伝子欠損マウスを用いた機能解析を組み合わせて、重症呼吸不全を惹起するウイルス宿主応答機構における PIs 代謝系の機能を解析した。

4. 研究成果

(1) A549細胞を用いて PIs 代謝系全体を対象として関連したリン酸化酵素あるいは脱リン酸化酵素の siRNA、インフルエンザウイルス(PR8株)の感染を行い、これらの遺伝子ノックダウンのウイルス増殖ならびに宿主免疫応答に及ぼす影響を検討し、ウイルスの増殖に関与するリン酸化酵素ならびに脱リン酸化酵素を同定した。その結果、PI3Pを中心としたパスウェイに関連した遺伝子が

インフルエンザウイルスの増殖に影響を与えることがわかった。

(2) インフルエンザウイルスに感染し呼吸不全を起こした患者が ICU で人工呼吸等の治療を受ける状態をマウスで再現するインフルエンザマウス ICU モデルを用いて検討した。マウスに経気道的にインフルエンザウイルス (PR8株)を投与し、呼吸機能解析システムで呼吸機能の経時的变化を解析したところ呼吸機能の指標であるエラストランスの悪化が認められた。同モデルを用いて、ウイルス価、ウイルス RNA の増幅、宿主の遺伝子発現解析、肺病理所見、サイトカインプロファイル等を解析した。バイオインフォマティクス的手法を用いたパスウェイ解析から感染に伴い、PI3Pならびに PI(4,5)P2を中心としたイノシトールリン脂質代謝系が大きく変動することがわかった。

(3)ウイルス感染に関与する遺伝子(リン酸化酵素あるいは脱リン酸化酵素)の候補の中で、Class III PI3 キナーゼに着目して、マクロファージおよび好中球特異的遺伝子欠損マウスを作製した。①同マウスはコントロール状態では特別な異常を認めなかった。②マウス ICU モデルを用いて、呼吸機能、ウイルス RNA の増幅、肺病理所見、サイトカインプロファイル、オートファジー関連遺伝子の発現変化等を経時的に解析した。③同マウスから単離したマクロファージあるいは好中球をインフルエンザウイルスで刺激すると炎症性サイトカインの産生の変化を認めた。

これらの結果から、インフルエンザウイルスによる呼吸不全の重症化における PI3Pを中心としたエンドゾームに存在する PIs、とりわけ Class III PI3 キナーゼが重要な役割を果た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 16件)

①Kuba K, Imai Y, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol Ther.* 128(1):119-28. (2010) (査読有)

②Neely GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmén L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NN, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Kogelgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA,

Imai Y, Pfeufer A, Hicks AA, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM. A global in vivo Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*. 141(1):142-53. (2010) (査読有)

③ Haubner BJ, Neely GG, Voelkl JG, Damilano F, Kuba K, Imai Y, Komnenovic V, Mayr A, Pachinger O, Hirsch E, Penninger JM, Metzler B. PI3Kgamma protects from myocardial ischemia and reperfusion injury through a kinase-independent pathway. *PLoS One*. 22;5(2):e9350. (2010) (査読有)

④ Imai Y, Kuba K, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circ J*. 74(3):405-10. (2010) (査読有)

⑤ Imai Y. Further advances in immunity against highly pathogenic influenza viruses. *European Infectious Disease*. 3(1):61-4.(2009) (査読有)

⑥ Oudit GY, Imai Y, Kuba K, Scholey JW, Penninger JM. The role of ACE2 in pulmonary diseases--relevance for the nephrologist. *24(5):1362-5*.(2009) (査読有)

⑦ Imai Y, Kuba K, Penninger JM. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. *Exp Physiol*. 93(5):543-8. (2008) (査読有)

⑧ Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, Ermolaeva M, Veldhuizen R, Leung YH, Wang H, Liu H, Sun Y, Pasparakis M, Kopf M, Mech C, Bavari S, Peiris JS, Slutsky AS, Akira S, Hultqvist M, Holmdahl R, Nicholls J, Jiang C, Binder CJ, Penninger JM. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 18;133(2):235-49.(2008) (査読有)

⑨ 今井由美子. ARDS 発症機序解明の新たな展開 最新医学 66:505-510.(2010) (査読無)

⑩ 今井由美子他. 宿主システムからのウイルス病原性発現機構解明へのアプローチ 実験医学 28:2924-26.(2010) (査読無)

⑪ 今井由美子他. 新興ウイルス感染症における ARDS 発症、重症化の分子機構 実験医学 28: 2934-39.(2010) (査読無)

⑫ 今井由美子. 新型インフルエンザによる LI/ARDS の特徴は？ 救急・集中治療 22: 1114-1119.(2010) (査読無)

⑬ 今井由美子. 重症型インフルエンザの病態生理 人工呼吸 27: 62-69.(2010) (査読無)

⑭ 今井由美子他. ACE2 と呼吸器疾患 呼吸 9: 1070-1074.(2010) (査読無)

⑮ 今井由美子他. 新型インフルエンザと acute respiratory distress syndrome (ARDS) 日本集中治療医学会誌 17:11-17.(2010) (査読有)

⑯ 今井由美子他. インフルエンザによる呼吸不全の発症機構 細胞 41(14):8-11.(2009) (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

① Yumiko Imai. The role of TLR4 in influenza pathogenesis and ACE2 interventional therapy. Gordon conference satellite symposium; Mechanisms of lung injury and immunomodulator interventions in influenza (招待講演) 2010年3月5日 Ventura, USA

② Yumiko Imai. The role of ACE2 in the pathogenesis of ALI: a therapeutic perspective. Korean Critical Care Medicine(招待講演)2009年4月26日 Soul, Korea

③ Yumiko Imai. Molecular pathogenesis of respiratory failure in influenza. BMB2010 Biochemistry and Molecular Biology (シンポジウム) 2010年12月7日 神戸

④ Yumiko Imai. Hyper-response of innate immune system triggered by oxidative stress and oxidized phospholipids controls the severity of acute lung injury. Keystone symposia 2010年6月8日 京都

⑤ Yumiko Imai. Acute lung injury (ALI)/ARDS mediated by emerging respiratory virus infection. HKU-PASTEUR IMMUNOLOGY COURSE (招待講演) 2010年11月5日 Hong Kong

⑥ 今井由美子. インフルエンザによる重症呼吸不全の病態 集中治療学会近畿地方会 (招待講演) 2010年6月22日 大阪

⑦今井 由美子. 新型インフルエンザ 呼吸療法医学会 (招待講演) 2010年7月24日 東京

⑧今井 由美子. 脂質メタボロミクスからみえてきたインフルエンザ重症化機構 適応医学会 (招待講演) 2010年7月2日 東京

⑨今井 由美子. インフルエンザによる呼吸不全の病態と治療戦略 日本麻酔科学会 (招待講演) 2009年6月3日 福岡

[図書] (計 1件)

①Valenza F, Frank JA, Imai Y, Slutsky AS. Pathogenesis of Ventilator-Induced Lung Injury, Physiological Basis of Ventilatory Support (Marcel Dekker Inc.) 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 由美子 (IMAI YUMIKO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50231163

(2) 連携研究者

佐々木 雄彦 (SASAKI TAKEHIKO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50333365

佐々木 純子 (SASAKI JUNKO)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30333371

高須賀 俊輔 (TAKASUGA SHUNSUKE)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90375262

江口 賢史 (EGUCHI SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70457117

樗木 俊聡 (OHTEKI TOSHIAKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50233200