

機関番号：82610
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390233
 研究課題名（和文）ヒトおよびトリインフルエンザウイルス感染症とその重症化に関わる
 宿主因子の解明
 研究課題名（英文）Host factors affecting human illness with avian and human A
 influenza viruses
 研究代表者
 慶長 直人 (KEICHO NAOTO)
 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所・呼吸器疾患研究部・部長
 研究者番号：80332386

研究成果の概要（和文）：

ヒトおよび鳥のA型インフルエンザウイルス感染症に関連する宿主側因子を明らかにするため、ヒト正常気道上皮細胞を用い、インフルエンザウイルスレセプターとなる糖鎖合成に関わる糖転移酵素遺伝子群・気道粘膜抗ウイルス遺伝子群の発現解析を行ったところ、ある炎症刺激でレセプター発現に関わるシアル酸転移酵素遺伝子の発現が増強することが明らかになった。また抗ウイルス作用を有するMxA遺伝子の多型と発現の関連も明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the study was to elucidate host factors affecting illness with avian and human influenza A viruses. Expression of glycosyltransferase genes related to the synthesis of influenza virus receptors and antiviral genes was analyzed in human bronchial epithelial cells. A sialyltransferase gene expression was upregulated by an inflammatory stimulus. Expression of antiviral MxA gene in airway epithelial cells was related to genetic polymorphisms in the promoter region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

H5N1高病原性鳥A型インフルエンザウイルス(以下H5N1)は、現在のところヒトへの感染事例は少ないものの、今後もしパンデミックを起こした場合には、人類にとって大きな脅威となることが予想されている。ヒトA型インフルエンザウイルス感染は主に上気道症状を起こすのに対し、H5N1感染では重篤な下

気道症状がみられる。このような症状の違いには、ウイルス側の因子、宿主側の因子の双方が関わっていると考えられるが、インフルエンザウイルス感染症に関連する宿主側の因子については、今なお不明な点が多い。Shinyaらは、気道におけるウイルスレセプターの分布の違いが感染症状の違いに関わっているのではないかと報告した(Shinya et

al. Nature, 2006)。インフルエンザウイルスのレセプターはシアル酸(SA)を末端に持つ糖鎖 SA α 2,6(3)Gal β 1,3(4)GlcNAc β 1-であるが、ヒトインフルエンザウイルスのレセプターの SA α 2,6Gal は上気道の線毛上皮細胞に分布し、H5N1 のレセプターの SA α 2,3Gal は II 型肺胞上皮細胞に多く分布する。しかし、このようなレセプター分布の違いが、どのような機構で制御されているのか不明である。

我々は、ベトナムとの国際共同研究で、SARS-CoV 感染・SARS 発症および重症化に関連する ACE、OAS1、MxA の遺伝的多型を見だし(Itoyama 2004, Hamano 2005)、これらの遺伝的多型の機能解析を進めてきた。これらが SARS の重症化に関連する機序は、インフルエンザウイルス感染症の重症化とも共通の部分が大いと考えられる。また、我々は、慢性気道炎症性疾患を対象に気道粘膜防御関連遺伝子群の多型解析を行い、疾患に関連する複数の多型を見出した。遺伝的要因の関与による粘膜防御機能の個人差が慢性気道感染症の発症に関連していると思われるが、このような多型による機能の違いは、インフルエンザウイルスに対する粘膜防御の違いにも関連している可能性がある。

これらの成果に基づき、我々の保有する手術検体由来の 100 以上のヒト気道上皮初代培養細胞を用いて、上記遺伝子群の遺伝的多型と発現量との相関を検討することにより、当該遺伝子群の発現や制御の機序を解明し、気道粘膜抗ウイルス遺伝子の役割を明らかにしていくことは、インフルエンザウイルス感染症の理解においても重要であると考えられた。さらに、これら気道粘膜抗ウイルス作用に関わる遺伝子に加え、ヒトインフルエンザウイルスのレセプターである SA α 2,6Gal、あるいは H5N1 のレセプターである SA α 2,3Gal を有する糖鎖の合成に関わる遺伝子群の遺伝的多型の探索、その発現の解析を加えることにより、ヒトインフルエンザウイルスおよび H5N1 に対する易感染性あるいは感染抵抗性に関連する宿主側の因子や、重症化など病態に関連する因子、それらに関連する機序を見いだしていくことができると考えた。

2. 研究の目的

我々が保有する多数の初代培養ヒト正常気道上皮細胞を用い、H5N1 高病原性鳥 A 型インフルエンザウイルスとヒト A 型インフルエンザウイルスのレセプターとなる糖鎖を合成するシアル酸転移酵素の遺伝子発現解析を行い、ヒト気道上皮細胞における遺伝子発現制御の機序を解明する。レクチン染色にて気道上皮細胞表面の SA α 2,6Gal、SA α 2,3Gal の分布を解析する。また、MxA 遺伝子・ムチ

ン遺伝子などの気道粘膜抗ウイルス遺伝子群の多型解析・機能解析とあわせて、ヒトおよび鳥インフルエンザウイルス感染症およびその重症化に関連する宿主側の因子を明らかにすることができるかと考えた。

呼吸器疾患における疾患感受性遺伝的変異を同定し、ヒト検体を用いてその機能的意義まで明らかにした研究はまだ乏しい。遺伝子変異解析と機能解析を並行して行うことにより、呼吸器疾患で見られる遺伝子変異が、どのような機序でヒトの呼吸器疾患の病態と関連するかを明らかにすることができる。特に、インフルエンザウイルス感染症の研究においては、ウイルス自体の詳細な研究は十分に行われているのに対し、気道粘膜の抗ウイルス機能について、ヒト気道上皮が、ヒトあるいは鳥インフルエンザウイルス感染に対してどのような感受性あるいは抵抗性を有しているのか、どのような因子が関わっているのか、遺伝的要因による個体差はあるのか等について、いまだ不明な点が多い。鳥インフルエンザウイルス感染症の重症化病態においても、ウイルスによる直接・間接的な気道上皮・肺胞上皮障害やアポトーシスの誘導が致死的な急性肺障害の病態を考える上で重要だと考えられ、SARS の重症化機構の研究の成果は重要な手がかりを与えるものである。我々が行ってきた抗ウイルス遺伝子群などの解析に、シアル酸転移酵素遺伝子の解析、多数のヒト正常気道上皮細胞でのレセプター(SA α 2,6Gal、SA α 2,3Gal)発現の解析を加えていくことにより、インフルエンザウイルス感染症に関連する宿主側の因子について明らかにしていき、将来的にはインフルエンザ感染症の治療または感染予防の創薬シーズ創出につながるような知見を得ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ヒトインフルエンザウイルスレセプターの SA α 2,6Gal、鳥型レセプターの SA α 2,3Gal となる糖鎖の末端にシアル酸を付加するシアル酸転移酵素遺伝子のうち、ヒト上気道・下気道で発現しているものを確認するために、気管・肺組織の total RNA から real time RT/PCR を行い、遺伝子発現を調べた。

ヒト気道上皮細胞で発現しているシアル酸転移酵素遺伝子の転写開始点を 5' RLM-RACE (RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends)法で決定した。気管・肺組織由来 total RNA および手術検体由来の初代培養ヒト気道上皮細胞、さらに気相液相培養法で再分化させた初代培養細胞を用いた。

初代培養ヒト気道上皮細胞 3 検体を用いて 1 1 種類の炎症関連刺激を加え、各シアル酸転移酵素遺伝子 mRNA の発現量を TaqMan

Gene Expression Assayを利用した real time RT/PCRにて検討した。

シアル酸転移酵素遺伝子の発現増強が認められた炎症刺激については、さらに30検体の初代培養ヒト気道上皮細胞を用いて、刺激による発現誘導を調べ、遺伝子発現誘導の個体差について検討した。

5' RLM-RACE 法にて刺激時の転写開始点を再度確認し、その上流約 1kb までの範囲で遺伝的多型の検索を行った。刺激を加えた 30 検体で、上記範囲のプロモーター領域遺伝的多型のタイピングと、炎症刺激のレセプター分子遺伝子の既知の遺伝的多型タイピングを行い、発現誘導と多型の関連を検討した。

さらに、レクチン染色による細胞表面のレセプター発現の解析を行った。上記炎症刺激を用い、不死化ヒト気道上皮 BEAS2B 細胞を刺激し、細胞表面のレセプター分布をレクチン染色で検討した。ヒト型のインフルエンザウイルスレセプター SA α 2, 6Gal は *Sambucus Nigra* レクチン (SNA) で染色され、鳥型レセプター SA α 2, 3Gal は *Maackia Amurensis* レクチン (MAA) で染色される。鳥型レセプターについては、下気道に分布する鳥型レセプターを染める MAL-II (*Maackia Amurensis Lectin-II*) と、上気道に分布する SA α 2, 3Gal を染める MAL-I (*Maackia Amurensis Lectin-I*) の 2 種類の MAA を別々に用いた。

また、初代培養ヒト気道上皮細胞を用いて、気道粘膜防御関連遺伝子群の多型解析と発現解析を行った。39 検体の初代培養細胞のターゲット遺伝子の既知の遺伝的多型をタイピングし、TaqMan Gene Expression Assay を利用した real time RT/PCR にて遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

ヒトインフルエンザウイルスレセプターの SA α 2, 6Gal、鳥型レセプターの SA α 2, 3Gal となる糖鎖の末端にシアル酸を付加するシアル酸転移酵素遺伝子のヒト気道上皮細胞で使われている転写開始点の特定を 5' RACE 法で行ったところ、気道上皮細胞の再分化に伴い異なる転写開始点が使われる場合、上気道と下気道で転写開始点異なる場合などが認められた。細胞・組織特異的に遺伝子発現制御が行われている可能性が示唆された。

初代培養ヒト気道上皮細胞に種々の炎症刺激を加え、各シアル酸転移酵素遺伝子 mRNA の発現量を real time RT/PCR にて検討し、鳥型レセプター発現に関わる遺伝子のヒト気道上皮細胞での発現を誘導する炎症刺激があることを明らかにした。ヒト正常気道上皮細胞 30 検体を用い、その刺激で遺伝子発現誘導をかけたところ、非刺激時と比較して 7.5 倍の発現が認められた細胞から 2 倍程度の細胞まで、遺伝子発現誘導には個体差があ

った。

5' RLM-RACE 法にて刺激時の転写開始点を確認し、上流約 1kb の遺伝的多型の検索を行ったところ、2つの単塩基多型が見いだされた。また、この刺激のレセプター分子遺伝子の既知の機能的遺伝的多型のタイピングも行った。ヒト気道上皮細胞 30 検体での遺伝子発現誘導に関連していたのは、レセプター分子の機能的多型であり、この遺伝的多型がヒト気道上皮細胞での鳥インフルエンザウイルスレセプター発現に関係する可能性が示唆された。

さらに、レクチン染色による細胞表面のレセプター発現の解析を行った。上記炎症刺激を用い、不死化ヒト気道上皮 BEAS2B 細胞を刺激し、細胞表面のレセプター分布をレクチン染色で検討した。その結果、刺激後にヒト型レセプターの発現も刺激前より強く認められ、鳥型のレセプターとヒト型のレセプターの発現に共通に関わる糖転移酵素も炎症刺激時のレセプター発現増加に関わっているのではないかと考えられた。

ヒト気道上皮細胞で炎症刺激によってインフルエンザウイルスレセプター発現が増強していた事、遺伝的多型とその遺伝子発現誘導に関連していたことは新しい知見であり、インフルエンザウイルス感染において重要であると考えられる。

気道粘膜抗ウイルス遺伝子群の多型解析・機能解析として検討したものうち、MxA 遺伝子のヒト気道上皮細胞での発現がプロモーター多型と関連していることが明らかになった。MxA はインフルエンザなどのウイルス感染によって発現が誘導され、抗ウイルス作用を有する。MxA は H5N1 感染肺で強く発現する事が既に知られており (Thitithanyanont *et al.* 2010)、気道上皮細胞での遺伝的多型と発現の関連は H5N1 感染の重症化機構を考える上で興味深い知見である。

本研究により、インフルエンザウイルスレセプターの発現に影響を与える炎症刺激と、それに関わるヒトの遺伝的多型が明らかになった。このような成果は他に報告がなく、現在論文化準備中である。また、抗ウイルス遺伝子の MxA の遺伝的多型により気道上皮細胞での遺伝子発現量が異なることも明らかになった。今後は、今回明らかになった宿主因子と、インフルエンザウイルス感染との関連について検討を加え、インフルエンザ感染防御、重症化防御に応用するためにさらに発展させていきたい。

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0件）

〔学会発表〕（計2件）

(1) Hainam Mai, Minako Hijikata, Ikumi Matsushita, Hideyuki Ito, Naoto Keicho. A Study on Molecular Pathogenesis of Avian Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelial Cells. 第50回日本呼吸器学会総会 平成23年4月22日 東京

(2) 土方美奈子, 松下育美, 濱野栄美, 伊藤秀幸, 慶長直人. 抗ウイルス蛋白 OAS1 遺伝子のSNPとヒト気道上皮細胞におけるmRNA発現の解析. 第50回日本呼吸器学会総会, 平成22年4月23日, 京都.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

慶長 直人 (KEICHO NAOTO)

独立行政法人国立国際医療研究センター
研究所・呼吸器疾患研究部・部長
研究者番号：80332386

(2) 研究分担者

土方 美奈子 (HIJIKATA MINAKO)

独立行政法人国立国際医療研究センター
研究所・呼吸器疾患研究部・ウイルス性呼吸器疾患研究室長
研究者番号：90332387

櫻田 紳策 (SAKURADA SHINSAKU)

独立行政法人国立国際医療研究センター
研究所・呼吸器疾患研究部・細菌性呼吸器疾患研究室長
研究者番号：50178620

(3) 連携研究者

なし