

機関番号：37604

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010 年度

課題番号：20590131

研究課題名 (和文) インフルエンザ感染気道内における初期病態に関わるサイトカイン発現機序の解析

研究課題名 (英文) Analysis of mode of cytokine secretion in respiratory tracts of influenza-virus infected mice at the early phase of infection.

研究代表者

黒川 昌彦 (MASAHIKO KUROKAWA)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：80186527

研究成果の概要 (和文)：

インフルエンザウイルス感染初期において気道中に種々のサイトカインが誘導され、そのサイトカイン誘導がインフルエンザウイルス感染病態と密接に関係していることが知られている。そこで、マウスのインフルエンザウイルス経鼻感染モデルを用いて、インフルエンザウイルス感染初期の気道内におけるサイトカインカスケードを検討して、感染初期に気道内のマクロファージからインターロイキン (IL) -12 が他のサイトカインに先駆けて誘導される可能性を明らかにした。また、炎症性サイトカイン誘導を制御できる 7-hydroxycoumarin をインフルエンザウイルス感染マウスに経口投与して、インフルエンザ病態の軽症化に感染初期の気道内における炎症性サイトカイン誘導抑制が重要であることを明らかにした。これらの結果、サイトカイン誘導抑制物質が、インフルエンザ病態緩和に有効であることを示唆した。

研究成果の概要 (英文)：

In the influenza infection, cytokines are produced in respiratory tracts and their production is important in promoting host-immune defense to alleviate symptoms especially in the early stage of infection. Using murine intranasal infection model, we examined the cascade of cytokine production after infection and found that IL-12 was produced by macrophages infiltrating the infected epithelium as the first response cytokine. Also, in influenza virus-infected mice administered 7-hydroxycoumarin that can modulate cytokine production in macrophage-like P388D1 cells, we revealed that the modulation of inflammatory cytokines in the respiratory tracts of infected mice was critical to alleviate influenza symptoms. Thus, it was suggested that the modulators of cytokine production are the candidates of effective anti-influenza agents in alleviation of the symptoms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物・感染症学

## 1. 研究開始当初の背景

上気道感染の代表的疾患であるインフル

エンザウイルス感染は、感染力が強く他の呼吸器感染を起こすウイルスとは異なり、高熱、

頭痛等の全身症状が強いことが特徴である。特に、小児においては感染初期の解熱薬投与と急性脳炎の関係が疫学的に明らかにされている。このようにインフルエンザ感染にともなう発熱、頭痛、脳炎等の全身症状は、感染により誘導されるサイトカインに由来すると考えられている。しかし、局所感染を起こすインフルエンザ感染でなぜ全身症状が誘発されるのかについては未だ明らかにされていない。したがって、インフルエンザ感染による全身症状がどの様に起こるのかを明らかにすることにより、新たな視点からインフルエンザ感染に対する新薬の開発が可能となると考えられる。

これまで、マウスのインフルエンザウイルス経鼻感染モデルを用いたサイトカインの解析より、発熱カスケードおよび葛根湯によるインフルエンザ病状の軽症化機序を明らかにしてきた。(J. Med. Virol., 50, 152-158, 1996; J. Traditional. Med., 13, 201-209, 1996; Chem. Pharm. Bull., 46, 1444-1447, 1998)。この過程で、葛根湯は気道内で、インターロイキン (IL) -12、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  や炎症性サイトカイン産生がインフルエンザ病態と密接に関係していることを明らかにしてきた (Antiviral Res., 56, 183-188, 2002; J. Pharmacol. Exp. Ther., 298, 362-368, 2001)。

## 2. 研究の目的

インフルエンザ感染は呼吸器系組織における局所感染であるが、発熱、頭痛、脳炎等の強い全身症状が特徴である。これらの症状は感染により誘導されるサイトカインに由来すると考えられているが、その詳細は明らかではない。したがって、この機序を明らかにすることにより、新たな視点からインフルエンザ感染に対する新薬の開発が可能となると考えられる。そこで本研究では、気道内でのインフルエンザ感染初期病態を導くサイトカインカスケードを明らかにして、サイトカイン誘導を抑制することによりインフルエンザ病態を軽症化する可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

(1)インフルエンザウイルス経鼻感染マウスの肺中ウイルス量、サイトカイン量の検討：インフルエンザウイルス (A/PR/8/34, 1,000 PFU/マウス) をマウス (DBA/2, 7週齢、雌) に経鼻感染し、経日的に肺洗浄液を調製した。肺洗浄液中のウイルス量は、MDCK細胞を用いたプラーク法で測定した。また、肺洗浄液中のサイトカインやインターフェロン (IFN)

(インターロイキン (IL) -12、IL-18、腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) は、ELISA法で測定した。

(2)インフルエンザウイルス感染マウス肺の免疫組織化学的検討：インフルエンザウイルス感染マウス肺を感染後経日的に取り出し、凍結組織切片を作成して免疫組織染色を行った。肺組織中の IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-12、マクロファージ抗原、インフルエンザウイルス抗原は、それぞれラット抗マウス IL-12、IFN- $\gamma$ 、F4/80 マクロファージ抗原、IL-18 およびインフルエンザウイルス NP 抗原モノクローナル抗体を用いて染色した。また、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて IL-12mRNA を検出した。

(3)7-hydroxycoumarin (7HC) による P388D1 細胞からの炎症性サイトカイン誘導抑制：マクロファージ様である P388D1 細胞にインフルエンザウイルス (A/PR/8/34, 2 PFU/細胞) を感染し、種々の濃度の 7HC 存在下で感染細胞を一定時間培養し、培養上清中の分泌サイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。また、感染細胞を溶解し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動後、ウェスタンブロットを行い細胞内サイトカイン産生量を比較検討した。

(4)7HC の抗インフルエンザウイルス活性の測定：7HC の抗インフルエンザウイルス活性は、MDCK 細胞を用いたプラーク減少法で検討した。また、トリパンブルー染色法を用いて、7HC の細胞毒性を評価した。

(5)インフルエンザウイルス感染マウスにおける 7HC のインフルエンザ症状改善効果の検討：インフルエンザウイルス感染マウスに感染当日から感染 6 日目まで 1 日 3 回、30 mg/kg の 7HC を経口投与し、経日的に体重減少、生存日数の延長、肺洗浄液中のウイルス量やサイトカイン量を観察あるいは測定した。また、感染後の肺のコンソリデーション (硬変) の程度を観察した。

(6)7HC の血液凝固に及ぼす影響の検討：感染マウスと非感染マウスに 7HC を上記のように経口投与して、経日的に血液を採取して血液凝固測定キットを用いて 7HC による血液凝固の影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1)インフルエンザウイルス感染によるサイトカインカスケード

インフルエンザウイルス感染初期における宿主免疫防御反応を明らかにするため、インフルエンザウイルス経鼻感染マウスを用いて、感染局所 (肺) において感染後誘導されるサイトカインの分泌様相を検討した。

経鼻感染後、肺におけるインフルエンザウイルスの増殖は、感染後 2 日目、3 日目でピークとなりその後減少した。この時、インフルエンザウイルス感染により誘導される生体防御因子である IFN- $\alpha$ 、 $\beta$  や炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、および、細胞性免疫誘導に重要な役割得を演じる IFN- $\gamma$ 、IL-18 量

は、感染後2日目から有意に上昇した。しかし、IL-12量だけがこれらのサイトカイン分泌に先立って感染1日目から有意に上昇した。

これまで感染初期のIL-12の産生が、インフルエンザウイルス感染による症状緩和と密接に関係していることが示されているため、IL-12はインフルエンザ症状と関係する他のサイトカイン誘導に重要な役割をもつといると考えられた。

### (2) 感染局所におけるIL-12産生細胞

インフルエンザウイルス感染マウス肺で、IL-12がどの細胞から誘導されているかを明らかにするために、種々のサイトカイン抗体を用いて免疫組織学的に感染後のサイトカインの産生分布を検討した。

感染後、1日目でウイルス抗原は気管支(Br)上皮(Ep)近辺やその近辺の平滑筋(Sm)近辺に存在するマクロファージに検出できた。この時、IL-12は、マクロファージ様細胞に検出された(Fig. 1)。しかし、他のサイトカインは検出できなかった。感染2日目には、IL-12は上皮(Ep)と平滑筋(Sm)近辺に広く分布していた。また、感染1日目には、

#### IL-12, 1day

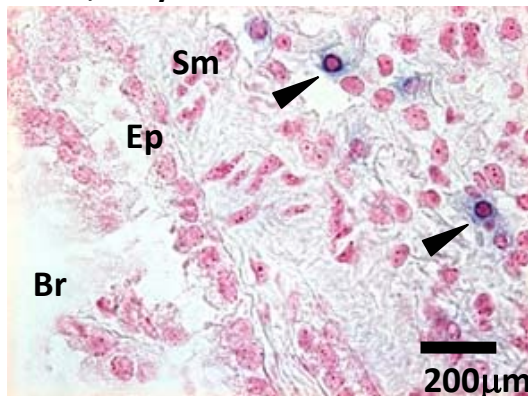


Fig. 1. 感染1日目のマウス肺におけるIL-12の分布。矢印：IL-12産生細胞

#### IL-12, 2day

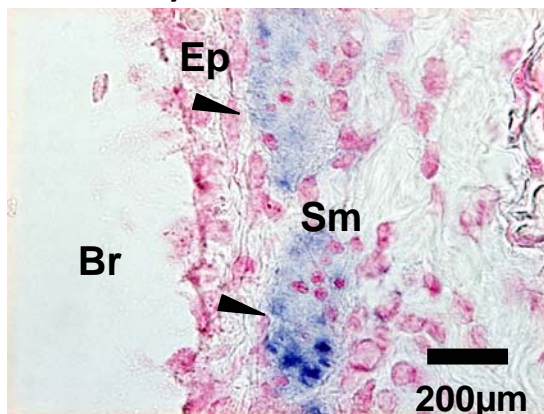


Fig. 2. 感染2日目のマウス肺におけるIL-12の分布。矢印：IL-12検出部位

マクロファージ様細胞でIL-12mRNAの発現が、in situハイブリダイゼーション法により確認できた。

これらの結果、インフルエンザウイルス感染肺において、感染後、他のサイトカインに先立って、気管支上皮近辺に浸潤したマクロファージからIL-12が産生され、その産生がインフルエンザ病態に関係した感染初期の免疫防御反応に影響していると考えられた。

### (3) 7HCによるマクロファージから炎症性サイトカイン産生の抑制

多くの植物性伝統医薬物に含まれている7HCが、インフルエンザウイルス感染マクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制するか否かを、マクロファージ様細胞P388D1細胞を用いて検討した。その結果、インフルエンザウイルス感染によるP388D1細胞からの炎症性サイトカイン(IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6)産生は、7HCにより濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。また、この抑制効果は、細胞からのこれらのサイトカインの分泌抑制ではなく、細胞内産生量の抑制にもとづいていた。

### (4) 7HCによるインフルエンザウイルス感染マウス病態の軽症化

7HCがインフルエンザウイルス感染病態を軽症化するか否かを検討した。その結果、7HCは、その毒性を示さない投与量で、インフルエンザウイルス感染によるマウスの体重減少を抑制し、肺炎の面積を縮小した。また、生存日数を有意に延長することが明らかとなった(Fig. 3)。

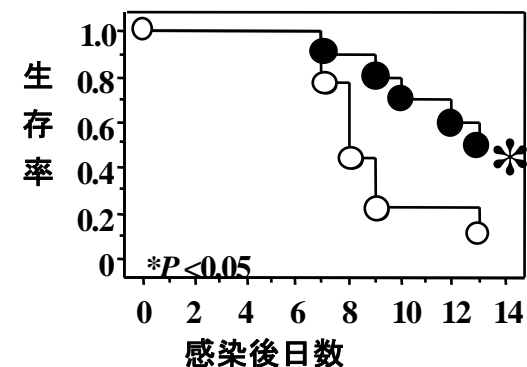


Fig. 3. 7HC経口投与によるインフルエンザウイルス感染マウスの生存日数の延長。

また、7HCはクマリン誘導体であるため7HC投与による血液凝固作用を検討したが、7HCの経口投与による血液凝固への影響は認められなかった。さらに、マウスの感染肺におけるウイルス量は、7HC投与により有意に減少していた。7HCは細胞レベルで抗インフルエンザウイルス活性を示さないことから、マウス肺におけるウイルス量の減少は、7HCの

抗ウイルス増殖抑制作用によるものではなく、感染防御免疫によりウイルス排除能が増強されたためであると考えられた。

(5)7HC による感染マウス肺におけるサイトカイン産生様相

7HC が細胞レベルでマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制したため、マウス（動物レベル）においてもインフルエンザウイルス感染マウス肺でのサイトカイン誘導が抑制されている可能性がある。この点を確認するため、感染初期肺におけるサイトカイン産生を検討した。その結果、炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-6）は、感染2日目あるいは、感染4日目で有意に減少していた。また、細胞性免疫を誘導する IFN- $\gamma$ 、IL-12 は、4 日目で有意な減少が認められた。したがって、感染初期の炎症性サイトカインの減少は、7HC 投与によると考えられ、炎症性サイトカイン量の減少により肺での炎症反応が軽症化した結果、その後の浸潤細胞（リンパ球）による細胞性免疫の促進に関与する IL-12、IFN- $\gamma$  の産生分泌が減少したと考えられた。

(6)まとめ

インフルエンザウイルス感染病態（特に肺炎）は、宿主免疫の過剰反応、すなわち、感染局所に浸潤した細胞からのサイトカインの過剰誘導、分泌により起こると考えられている。しかし、インフルエンザウイルスの排除には、生体内である程度の防御免疫が働く必要があるため、インフルエンザ病態の軽症化には、免疫（おそらく感染局所でのサイトカイン産生）の調節が重要である。したがって、7HC のように宿主免疫能を有効に保持できるレベルまで感染に伴う過剰のサイトカイン分泌を抑制できる物質があれば、インフルエンザ病態の軽症化に有効な薬となる可能性がある。本研究では、サイトカイン調節物質が、インフルエンザ感染病態の軽症化に寄与することを示した。今後、7HC のようなサイトカイン産生抑制物質の抑制機序を詳細に明らかにしたい。

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 13 件）

- ① Shimizu T, Takeshita Y, Takamori Y et al. (13 人/13 番目) Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of anti-herpetic efficacies. Evid. Based Complement Alternat Med. in press. (査読有)

- ② Daikoku, T, Horiba K, Miyata, K et al. (12 人/11 番目) Polyphenols including catechin from green tea with in vitro antiviral activity exhibited anti-herpes simplex virus activity but not anti-influenza virus activity in mice. J. Trad. Med. 28, in press, 2011 (査読付)
- ③ Sawamura R, Shimizu T, Sun Y. et al. (10 人/10 番目) Anti-influenza virus activity in vitro and in vivo of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum*. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 21, 33-41, 2010. (査読付)
- ④ Kurokawa M, Imakita M, Shiraki K. Cytokine-modulatory activity and therapeutic efficacy of 7-amino-4-methylcoumarin in murine collagen-induced arthritis. Open Bioactive Compounds Journal, 3, 12-17, 2010. (査読付)
- ⑤ Kurokawa M, Shimizu T, Watanabe W, Shiraki, K. Development of new antiviral agents from natural products. Open Antimicrobial Agents Journal, 2, 49-57, 2010. (査読有)
- ⑥ Watanabe W, Shimizu T, Sawamura R, Hino A, Konno K, Kurokawa M. Functional disorder of primary immunity responding to respiratory syncytial virus infection in offspring mice exposed to a flame retardant, decabrominated diphenyl ether, perinatally. J. Med. Virol. 82, 1075-1082, 2010. (査読付)
- ⑦ Watanabe W, Shimizu T, Sawamura R, Hino A, Konno K, Hirose A, Kurokawa M. Effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, on the immune response to respiratory syncytial virus infection in mice. Int. Immunopharmacol. 10, 393-397, 2010. (査読付)
- ⑧ Kurokawa M, Watanabe W, Shimizu T, Sawamura R, Shiraki K. Modulation of cytokine production by 7-hydroxycoumarin in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. Antivir. Res. 85, 373-380, 2010. (査読付)
- ⑨ Sawamura R, Sun Y, Yasukawa K, Shimizu T, Watanabe W, Kurokawa M. Antiviral activities of diarylheptanoids against influenza virus in vitro. J. Nat. Med. 64, 117-120, 2010. (査読付)
- ⑩ Hama Y, Kurokawa M, Imakita M, Yoshida Y, Shimizu T, Watanabe W, Shiraki K. Interleukin-12 is a primary cytokine responding to influenza virus infection

in the respiratory tract of mice. Acta virologica 53, 233-240, 2009. (査読付)

⑪ Watanabe W, Shimizu T, Hino A, Kurokawa M. Effects of decabrominated diphenyl ether (DBDE) on developmental immunotoxicity in offspring mice. Environmental Toxicology and Pharmacology, 26, 315-319, 2008. (査読付)

⑫ Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, Park YK, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 19, 7-13, 2008. (査読付)

⑬ Watanabe W, Shimizu T, Hino A, Kurokawa M. A new assay system for evaluation of developmental immunotoxicity of chemical compounds using respiratory syncytial virus infection to offspring mice. Environmental Toxicology and Pharmacology, 25, 69-74, 2008. (査読付)

[学会発表] (計 36 件)

① Kurokawa, M.: Anti-influenza virus activities of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum* in vitro and their efficacies in mice. BIT' s World Congress of Virus Infections 2010, 2010. 8, Busan.

② Watanabe W.: Effects of tetrabromobisphenol a (TBBPA) on the host immune response to respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice., Society of Toxicology 49<sup>th</sup> Annual Meeting, 2010. 3, Salt Lake City.

③ Watanabe W.: Effects of Decabrominated Diphenyl Ether (DBDE) on Developmental Immunotoxicity in Offspring Mice. 45<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, 2008. 10, Greece.

[図書] (計 5 件)

① 黒川昌彦 (分担): コンパス分子生物学、荒牧弘範、大戸茂弘編、南江堂、東京、139-150, 159-163, 2010.

② 黒川昌彦 (分担): 薬学領域の病原微生物学・感染症学・化学療法学, 西島正弘, 後藤直正, 増澤俊幸, 河村好章編, 第 2 版, 75-78, 83-86, 150-153, 207-209, 216-233, 353-356, 361-363, 383-385, 廣川書店, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: 免疫賦活剤ならびにこれを含む食品お

よび医薬組成物

発明者: 黒川昌彦、渡辺 渡、山崎哲郎、永友聖代、林 雅弘

権利者: 九州保健福祉大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-8159

出願年月日: 2011. 1

国内外の別: 国内

○取得状況 (計◇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

黒川 昌彦 (KUROKAWA MASAHIKO)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号: 80186527

### (2) 研究分担者

渡辺 渡 (WATANABE WATARU)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号: 50399218

清水 寛美 (SHIMIZU TOMOMI)

九州保健福祉大学・薬学部・助教

研究者番号: 80412831

吉田 裕樹 (YOSHIDA HIROKI)

九州保健福祉大学・薬学部・助教

研究者番号: 90469411

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: