

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16217

研究課題名（和文）試験管内喘息およびCOPDモデルを用いたインフルエンザ感染重篤化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms involved in increased severity of influenza virus infection by using in vitro models of asthma and COPD

研究代表者

仲山 美沙子（Nakayama, Misako）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00510306

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）：喘息、慢性閉塞性肺疾患ではインフルエンザウイルス感染により呼吸器症状が急に悪化することが知られるが、その機序については明らかになっていない。

喘息患者から分離された一次小気道上皮細胞では、慢性閉塞性肺疾患患者、健常人由来の細胞と比較して、鳥型インフルエンザウイルス受容体の発現を促進するシアル酸転移酵素の遺伝子発現の上昇が認められた。細胞を分化させた小気道オルガノイドモデルにH1N1およびH5N1インフルエンザウイルス、新型コロナウイルスを感染させ、網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、喘息とCOPD患者由来の小気道上皮細胞には、遺伝子発現パターンに異なる特徴があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息または慢性閉塞性肺疾患を有する患者ではインフルエンザウイルス感染によって重症化する危険性があることが知られる。本研究により、喘息と慢性肺疾患患者由来の小気道上皮では、インフルエンザウイルスに対する感受性や感染後の反応性が異なる可能性が示唆された。ウイルス感染が最初に成立するのは気道上皮であることから、気道上皮で感染を制御することにより、重症化を防ぐことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In patients with asthma or COPD, influenza virus causes a sudden worsening of clinical symptoms. However, the mechanisms of the sudden worsening of clinical symptoms are not elucidated.

In primary small airway epithelial cells isolated from patients with asthma, gene expression of a sialyltransferase that promotes the avian-type influenza virus receptor was upregulated compared to cells from COPD patients and healthy subjects. Of note, in a small airway organoid model, RNA-sequence analysis demonstrated genes differentially expressed between cells from asthma and COPD patients upon H1N1 and H5N1 influenza A viruses and SARS-CoV-2.

研究分野：実験病理学

キーワード：気道上皮 オルガノイド 喘息 慢性閉塞性肺疾患 COPD インフルエンザウイルス SARS-CoV-2 網羅的遺伝子発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは季節性に流行し、毎年全人口の 5-15%が罹患すると言われている。季節性インフルエンザウイルス感染により、世界全体で毎年 300-500 万人が重篤化し、そのうちの 29-65 万人が死亡している(WHO 2018 年)。喘息と慢性閉塞性肺疾患は、どちらもインフルエンザウイルス感染により急性増悪し、両疾患は感染重篤化のハイリスク因子として知られる(CDC 2018 年)。喘息は世界で 2 億 3500 万人が罹患しており、呼吸困難と呼気性喘鳴を伴う発作、液性免疫主体の反応で特徴付けられる。一方、慢性肺疾患の代表的疾患である慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Lung Disease: COPD)は 6500 万人が罹患しており、呼吸困難や慢性咳嗽、進行する肺機能低下で特徴付けられる。COPD 罹患患者数は 2030 年まで継続して増加し COPD 関連死が死亡原因の第三位となることが予想されている(WHO 2011 年)。両疾患とも頻度が高く、感染重篤化の因子として知られるにも関わらず、喘息および COPD がインフルエンザウイルスにより急性増悪するメカニズムは明らかになっていない。

気道上皮細胞上の糖鎖はインフルエンザウイルス受容体として機能することが知られ、ガラクトースに 2,6/ 2,3 結合する、細胞末端のシアル酸(SA 2,6/ 2,3Gal)がそれぞれヒト/トリインフルエンザウイルスの受容体(以下、ヒト型/トリ型受容体)となることが知られている。ヒト型/トリ型受容体の発現様式、ウイルスエンター後の上皮の反応性が、喘息と COPD では健常と比較して異なる可能性があり、それらの解明が急務である。さらに、急性増悪時に喘息と COPD で両者に共通のメカニズムが存在するのか、あるいは異なるメカニズムが存在するのか、明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(i) 喘息および COPD 患者由来気道上皮のヒト型/トリ型受容体の分布を明らかにし、(ii)インフルエンザウイルス感染後の反応の共通点および差異を見出すことで、両疾患がインフルエンザウイルスにより急性増悪を生じるメカニズムを解明し、有効な治療法開発につなげることである。

3. 研究の方法

(i) 喘息、COPD 患者、健常人(各 3 名)から分離された小気道上皮細胞を用いて、ヒト型/トリ型受容体の細胞表面における発現、ヒト型/トリ型受容体の発現を促進するシアル酸転移酵素 ST3Gal-I, ST3Gal-IV/ST6Gal-I の遺伝子発現を RT-qPCR で評価した。

(ii) 喘息患者(3 名)、COPD 患者(4 名)、健常人(3 名)から分離された小気道上皮細胞を用いて、小気道オルガノイドモデルを作成し、H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させた。さらに、COVID-19 の世界的流行を受け、SARS-CoV-2 に対する反応性も評価する必要があると考え、SARS-CoV-2 (武漢株)も感染させた。感染前後に細胞を回収し、mRNA を抽出した。H1N1, H5N1 インフルエンザウイルスおよび SARS-CoV-2 に対する COPD および喘息由来細胞の反応性の差を、遺伝子発現に着目して網羅的に調べた。

4. 研究成果

(i)喘息患者由来の小気道上皮細胞は、COPD 患者および健常人由来の細胞と比較して、トリ型受容体の発現を促進するシアル酸転移酵素 ST3Gal-IV の発現上昇が認められた(図 1)。ST3Gal-

I の発現は喘息および COPD 患者由来の細胞で軽度上昇が認められた。ヒト型受容体の発現を促進するシアル酸転移酵素 ST6Gal-I の発現は認められなかった。

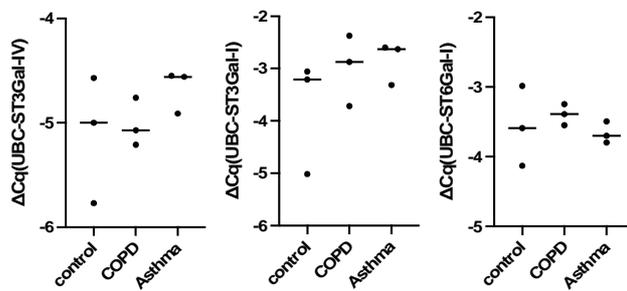


図1 喘息、COPD、健常人由来の細胞におけるインフルエンザウイルス受容体発現を促進するシアル酸転移酵素の遺伝子発現。

トリ型受容体の発現を促進するシアル酸転移酵素 ST3Gal-IV (左) は喘息患者由来の細胞で発現上昇が認められた。ST3Gal-I (真ん中) は COPD、喘息患者由来の細胞で軽度上昇が認められた。ヒト型受容体の発現を促進するシアル酸転移酵素

(ii)感染後の喘息および COPD 患者由来細胞を比較した結果、発現変動遺伝子(喘息/COPD、adjusted p value<0.05)は、H1N1 ウイルス、H5N1 ウイルス、SARS-CoV-2 感染後において各々 15、8、18 遺伝子であった。即ち、慢性呼吸器疾患由来でも、喘息と COPD 患者由来の細胞では、ウイルス感染後の反応が異なることが示唆された。

各ウイルス感染後に共通してみとめられた発現変動遺伝子(喘息/COPD、adjusted p value<0.05)は 4 遺伝子みられた。その中でも喘息と COPD 患者由来の細胞で最も顕著な差が認められたものは、細胞分化に関わる転写因子であった。COPD 患者由来の細胞では非感染細胞(mock)でもこの転写因子の発現が上昇している傾向が認められ、感染後は喘息患者由来の細胞と有意差をもって発現上昇が認められた (図 2)。

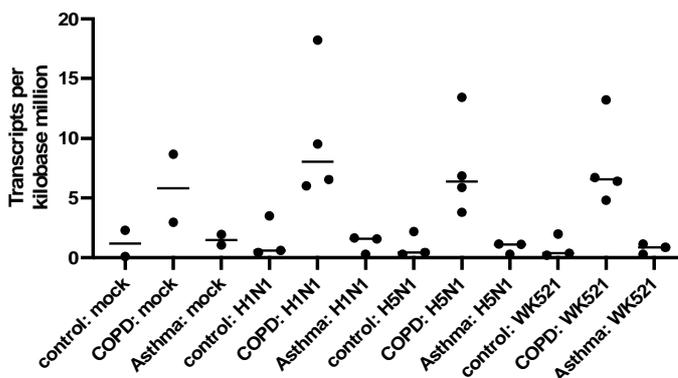


図2 喘息、COPD、健常人由来の細胞から作成した小気道オルガノイドモデルにおけるウイルス感染後の細胞分化に関わる転写因子の遺伝子発現。

H1N1 ウイルス、H5N1 ウイルス、SARS-CoV-2 感染後において、COPD 由来の細胞では細胞分化に関わる転写因子の顕著な発現上昇がみられた。

本研究により、H1N1、H5N1 インフルエンザウイルス、SARS-CoV-2 感染後に喘息と COPD 患者由来小気道上皮細胞で変動する遺伝子発現パターンに異なる特徴があることが明らかになった。今後はこれらの差がウイルス増殖性、炎症反応とどのように関連しているかを調べる予定である。

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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉備 沙羅, 仲山美沙子, 石垣宏仁, 伊藤靖
2. 発表標題 慢性呼吸器疾患由来の気道上皮におけるインフルエンザウイルスと新型コロナウイルスの受容体発現解析
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会(神戸)
4. 発表年 2022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
---------	---------