

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591394

研究課題名（和文）

マウスモデルを用いた臨床分離株解析による RSV 病原性発現の新たな機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of new mechanisms of RSV infection by clinical isolate analysis using a mouse model.

研究代表者：橋本 浩一

(HASHIMOTO KOICHI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50322342

研究成果の概要（和文）：RSV 感染後の Th2 免疫誘導に関して臨床研究、基礎研究ともに結論は得られていない。Th2 誘導 RSV 株（RSV-Line 19 株）と RSV-A2 株および RSV-Long 株の比較で F 遺伝子内の 5 か所にアミノ酸変化を伴う遺伝子変異が報告されている。49 株の臨床分離株について F 遺伝子を解析し、既報の遺伝子変異を解析した。5 株に既報の塩基変異が認められたが、塩基変異は何れも 1 あるいは 2 か所であった。

研究成果の概要（英文）：There has not been conclusion about Th2 induction after RSV infection both in clinical researches and basic researches. Five gene mutations with amino acids alteration are reported in F gene by comparison among Th2 derivation RSV strain (RSV-Line 19), RSV-A2 strain and RSV - Long strain. We analyzed an F gene about 49 RSV clinical isolates and analyzed a gene mutation reported previously. Gene mutation of previous report was found in five isolates, but mutation was 1 or two places.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科学系・小児科学

キーワード：小児感染症学、RSV、臨床分離株、マウスモデル、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) は冬季に流行する乳幼児の細気管支炎の病因の 1 つである。WHO の 2003 年の死亡率の推計

では、全世界における RSV 感染による死亡は、感染症においてヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス/C 型肝炎ウイルス、麻疹ウイ

ルスに次ぐ4番目である。3歳までに殆どの幼児が感染し、乳幼児全体の約2~10%が重症RSV感染症にて入院し、入院児の約20%が人工呼吸器の装着などの集中治療が必要となる。

一方、多くのコホート研究においてRSVによる重症下気道炎はその後約10年間の喘息、反復性喘鳴の独立した危険因子であることが示されている。

RSV下気道炎の感染病理はRSV感染により気道組織が破壊され、種々の炎症細胞からサイトカイン、メディエーターが産生されることによると考えられている。これらにより肺の水分量増加、肺胞での水分クリアランスの低下、気道壁の浮腫と閉塞が引き起こされ、幼弱で未発達な乳幼児の気道を強く障害する。またRSVのG蛋白がTh2優位な免疫環境を誘導し、宿主のTh1/Th2の不均衡な反応を引き起こす。さらに遺伝子多型など宿主側要因やウイルス側要因が複合的に関係し気道過敏性が形成されると考えられている。ヒトでのRSV感染時のサイトカイン・ケモカインの変化ではTh1、Th2サイトカインのレベルの変化と重症RSV感染症との関連が論じられ、重症RSV感染症の宿主側因子として遺伝子多型との関連が示唆されている。一方、RSV感染症の重症度とウイルス側要因との関連は、ウイルスの血清型によるサブタイプ、G蛋白の遺伝型、ウイルス量などに関連していると報告されている。

しかし、直接Th1とTh2の免疫誘導に関しては検討されていない。近年、マウスモデルを用いRSV感染実験においてウイルス株による免疫誘導の違いについて報告がある。American Type Culture Collection(ATCC)由来のウイルス株RSV-A2株(サブグループA)とミシガン大学のLukacsらのRSV-Line 19株(サブグループA)の2種類の実験室株を

マウスでの感染実験において同時に動施設で検討したところ、RSV-A2株はTh1を、RSV-Line 19株はTh2を誘導した。また、Th1誘導株(RSV-A2株)にTh2誘導株(RSV-Line 19株)のF蛋白をコードする遺伝子を入れ替えたキメラウイルスはTh2誘導株になることを報告している。RSV-Line 19株とRSV-A2株およびRSV-Long株の比較でF遺伝子内にアミノ酸変化をきたす塩基の変異が6か所見られている。これらの知見は株間における免疫反応の違いが、ヒトでのRSV感染症の重症度や将来の喘息発症に深く関与していると推測される。

2. 研究の目的

臨床分離株約50種類に関して、既報のF遺伝子の変異について解析する。一方、マウスモデルを用いて感染実験をし、気道における粘液産生について病理組織学的検討、肺におけるTh1あるいはTh2サイトカインの産生を検討し、臨床分離株の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

RSV感染小児の気道分泌液から分離したRSV臨床分離株について既報のF遺伝子の5種類の変異(F79I→M、F191K→R、F357T→K、F371N→Y、F557V→I)について解析し、またG遺伝子のシーケンスし各RSVのG遺伝子型を決定する。マウスを用いてRSVの感染実験を行い株による重症度の違いを呼吸生理学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 感染患者気道分泌液よりRSV分離

RSV入院患児から気道分泌液を採取し、同日、HEp-2細胞に接種した。連日CPEの有無を確認し、CPEが出現した場合は、分離株として保存。CPEが出現しないサンプルもblind passageを3回繰り返した。70件の気道分泌液から30株のRSV臨床分離株を樹立した。

(2) RSV臨床分離株のF遺伝子の解析

RSV 標準株 Long 株、米国由来臨床分離株 2 株、RSV-Line19 株、仙台医療センターで分離された 17 株、福島医大小児科で分離された 30 株、計 52 株について既報の F 遺伝子の 5 種類の変異についてダイレクトシーケンス法にて塩基配列の変異について検討した。仙台および福島で分離された 47 株の内、RSV-Line19 と同様の F 遺伝子 5 箇所の遺伝子変異を持つ株は認められなかった。しかし、F371N→Y 変異を持つ株が 1 株、F557V→I 変異を持つ株が 2 株、F371N→Y と F557V→I の両方の変異を持つ株が 1 株認められた。

(3) RSV実験室株、および臨床分離株の遺伝子系統樹解析

上記の 52 株について G 遺伝子をシーケンスし遺伝子系統樹解析を行った。BALB/Cj マウスを用いた感染系で異なる免疫反応が報告されている米国由来の臨床分離株 2 株は、気道粘液産生誘導する株は GA2 であり、気道粘液産生誘導しない株は NA2 であった。また、宮城県(2004 年-2007 年)と福島県(2008 年、2010 年)の株は 2007 年以前は NA1 株が優位であり、2008 年は NA2 株が優位となり、2010 年は再び NA1 株が優位になった。GA2 は分離されなかった。NA1 株、NA2 株は GA2 と近縁の株である。

(4) マウス感染実験

米国由来の臨床分離株 2 株である気道粘液産生誘導株(以下誘導株)と非誘導株を用いた RSV マウス感染実験では、Balb/c マウスへ感染後、誘導株は非誘導株に比べ体重減少が著明であり(図 1)、また安静時気道抵抗の上昇が遷延していた(図 2)。さらに、感染 14 日目に行ったメタコリンチャレンジでは誘導株は非誘導株より気道過敏性が亢進して

いた(図 3)。

図 1. RSV 感染後の体重の推移

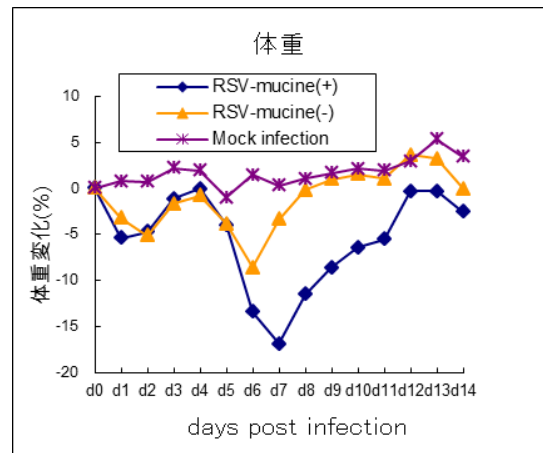


図 2. RSV 感染後の気道抵抗の変化

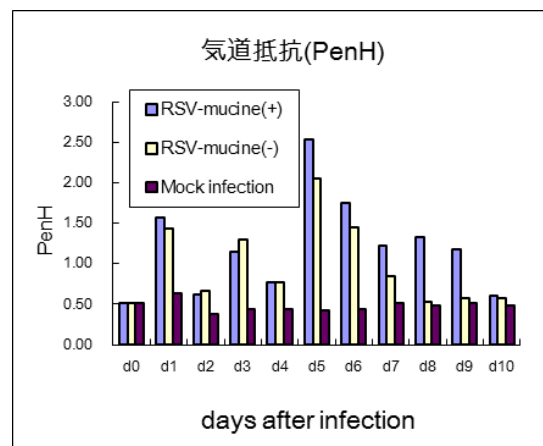
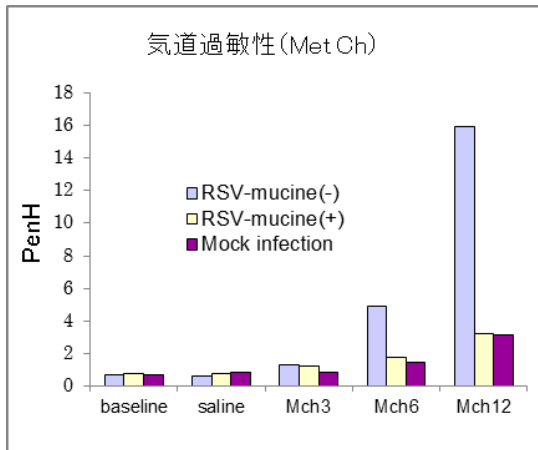


図 3. RSV 感染 14 日後の気道過敏性



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 5 件)

- ① Hashimoto K, Katayose M, Sakuma H, Kawasaki Y, Sumikoshi M, Sakata H, Sato M, Ohara S, Abe Y, Watanabe, Sato T, Ishibashi K, Suzutani T, Munakata M, Hosoya M, Uteroglobulin-related protein 1 and severity of respiratory syncytial virus infection in children admitted to hospital. J Med Virol., 査読有, 83 巻, 2011, 1086~92 頁.
- ② 橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮, RSウイルス感染と喘息発症-RSV感染とSOCS発現について-日本小児アレルギー学会誌, 依頼総説, 24 巻, 2010, 61~70 頁.
- ③ 橋本浩一, 川崎幸彦, 片寄雅彦, 佐久間弘子, 錫谷達夫, 細矢光亮, プロスタサイクリンのRSV感染症病態への関与, 福島医学雑誌, 査読有, 59 巻, 2009, 161~171 頁.
- ④ Hashimoto K, Mori S, Hashimoto Y, Kaneko H, Ishibashi K, Ishioka K, Kawasaki Y, Peebles RS Jr, Munakata M, Hosoya M, Suzutani T, DSCG reduces RSV-induced illness in RSV-infected mice, J Med Virol., 査読有, 81 巻, 2009, 354~61 頁.
- ⑤ Hashimoto K, Ishibashi K, Ishioka K, Zhao D, Sato M, Ohara S, Abe Y, Kawasaki Y, Sato Y, Yokota S, Fujii N, Peebles RS Jr, Hosoya M, Suzutani T, RSV replication is attenuated by counteracting expression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) molecules, Virology., 査読有, 391 巻, 2009, 162~70 頁.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 橋本浩一、臨床分離株解析によるRSV病原性発現の新たな機序の解明、第43回 日本小児感染症学会、平成23年10月29-30日、岡山市.
- ② 橋本浩一、Uteroglobulin-Related Protein 1 and severity of RSV infection in Hospitalized children、第7回RSV国際シンポジウム、平成22年12月1-5日、アムステルダム

[図書] (計 3 件)

- ① 細矢光亮、橋本浩一、メディカルレビュー社、Fetal & Neonatal Medicine、RSウイルス—感染のメカニズムと反復性喘鳴の発症—、3:5-6、2011.
- ② 橋本浩一、RSウイルス感染、中山書店、小児科臨床ピクシス、100-105、2011.
- ③ 橋本浩一、細矢光亮、総合医学社、小児科学レクチャー よくみる子どもの感染症Q&A、RSウイルス・ヒトメタニューモウイルス、1:322-328、2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本浩一 (HASHIMOTO KOICHI)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50322342

(2) 研究分担者

橋本優子 (HASHIMOTO YUKO)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60305357

細矢光亮 (HOSOYA MISTUAKI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80192318

錫谷達夫 (SUZUTANI TASTUO)
福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40196895

川崎 幸彦 (KAWASAKI YUKIHIKO)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00305369

西村 秀一 (NISHIMURA HIDEKAZU)
仙台医療センター・臨床研究部・室長
研究者番号：50172698