

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791131

研究課題名(和文) 喘息のインフルエンザウイルス感染による急性呼吸不全における自然免疫細胞の関与

研究課題名(英文) Role of Innate immunity on the exacerbation of bronchial asthma via influenza virus infection

研究代表者

青柳 哲史 (Aoyagi, Tetsuji)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50581609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス感染で、気管支喘息が増悪し重症化する。喘息マウスを用いてインフルエンザウイルス感染による重症化について評価を行ったが、喘息マウスと正常マウスを比較して死亡率、Th1/Th2 サイトカイン産生、炎症細胞の集積に差を認めなかった。次にマウスに非致死量のインフルエンザウイルスを感染させ、感染21-35日目には病理学的検討で気道の著名な拡張と気道周囲にコラーゲンの造성을認めた。また、肺内コラーゲンの上昇、TGF- β 、 α -SMAの上昇も認めた。インフルエンザウイルスによる肺の過剰炎症の後の組織修復過程のメカニズムを評価することが可能な画期的な肺傷害モデルマウスの作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Influenza virus is the reason of acute exacerbation bronchial asthma. However, it was lack of understanding for this mechanism. First, we have utilized mouse models of bronchial asthma induced by ovalbumin to experimentally examine a possible aggregation between influenza virus and asthma. We could not find any difference of clinical outcome, accumulation of inflammatory cells and Th1/Th2 related cytokines between normal and asthma mouse after influenza virus infection. We, next, examined whether tissue remodeling was observed after severe inflammation by influenza virus infection. Mice were inoculated non-lethal dose of influenza virus, histopathological analysis presented bronchiectasis and peribronchial collagen disposition and collagen level in the lung was significantly elevated compared to normal mice at the day 35 post-infection. This model could be a novel experimental tool for approaching the pathogenic mechanism of bronchial remodeling after severe inflammation.

研究分野：感染症内科

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：インフルエンザウイルス 気管支喘息 肺傷害 線維化 エラスターゼ

1. 研究開始当初の背景

本研究者はこれまでに、H5N1 鳥インフルエンザ感染症で直接死因となる急性肺傷害 (ALI/ARDS) に臨床的・病態的に類似した lipopolysaccharide (LPS) を用いた致死性 ALI/ARDS モデルマウスの作成と炎症性単球の肺傷害への関与について検討を行って来た。自然免疫リンパ球のひとつである iNKT 細胞に着目し、LPS 投与前に肺内の iNKT 細胞を α -GalCer で活性化させると、LPS 投与による肺傷害が重篤化し、72 時間以内に全例死亡し ALI/ARDS の病理所見に特徴的な硝子膜形成を有する (Aoyagi T et. al. Int Immunol. 2011;23: 97-108.)。さらに、研究代表者のグループは、インフルエンザウイルス感染症後に問題となる二次性細菌性肺炎の原因である *S. pneumoniae* 感染動物モデルを作成し、iNKT 細胞が IFN- γ を産生し生体を Th-1 に誘導することで感染防御に関与することを報告 (Eur J Immunol. 2003 ;33: 3323., Microbes Infect 2007;9: 364.) し、肺内の iNKT 細胞は種々の病原体に対する感染防御に重要であるが、一方で過剰な炎症反応を惹起させ急性肺傷害の重症化・劇症化に関与することを明らかにしてきた。このように、研究代表者はこれまで一貫して呼吸器感染症・炎症疾患における自然免疫リンパ球(特に iNKT 細胞)に注目し研究を進めてきた背景がある。

2009H1N1pdm インフルエンザウイルスをはじめ季節性インフルエンザ感染症では喘息や慢性閉塞性肺疾患など既存の肺疾患を有する症例において、既存の肺疾患の急性増悪による急性呼吸不全を合併し人工呼吸器の使用など全身管理を要することが問題となる (J Infect Chemother. 2010 Sep 9, Brit Med J. 310:1225-29, 1995)。しかし、その重症化メカニズムについては不明な点が多い。

今回、本研究者は喘息モデルマウスにインフルエンザウイルスを感染させることで、気道感染の重症化あるいは急性呼吸不全を呈

する実験動物を作成し、その病態における iNKT 細胞を含めた自然免疫細胞の関与について研究を行う予定であった。

2. 研究の目的

気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など既存肺疾患を有する症例におけるインフルエンザウイルス感染による急性呼吸不全のメカニズムを解析するために、本研究者は喘息モデルマウスにおけるインフルエンザウイルス感染増悪モデルマウスの作成と病態増悪因子として iNKT 細胞を含めた自然免疫細胞の関与について検討を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

使用マウス : BALB/c、C57BL/6 6~8 週齢
動物実験に関しては、東北大学動物実験施設の倫理規定を順守し施行した。

(1)喘息モデルマウスのインフルエンザウイルス感染による急性呼吸不全モデルマウスの作成

喘息マウスの作成 : BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスに OVA (100 μ g/mouse) + Aluminium を Day1, 7 に腹腔内に投与し感作させた後に、Day14-16 に OVA(50 μ g/mouse)を気管内投与し、OVA challenge 最終 Day16 に Influenza virus (PR-8)を LD₅₀ 量投与した。喘息マウス、PR-8 感染マウス、喘息+PR-8 感染マウスの 3 群で評価を行った。

(2)インフルエンザウイルス感染非致死性モデルマウスにおける肺の線維化の評価

C57BL/6 に PR-8 を単独で感染させ、1/20 ~ 1/5LD₅₀ 量を投与し、肺に過剰な炎症を惹起させるが、回復するモデルマウスの作成を行った。

-臨床症状の評価(体重減少・死亡率)

-病理組織学的検討

-肺内白血球の解析

-炎症性サイトカイン・ケモカインの測定

-肺のコラーゲン増殖に関する評価
本研究期間内において上記評価を行った。

4. 研究成果

(1)喘息モデルマウスのインフルエンザウイルス感染による急性呼吸不全モデルマウスの作成

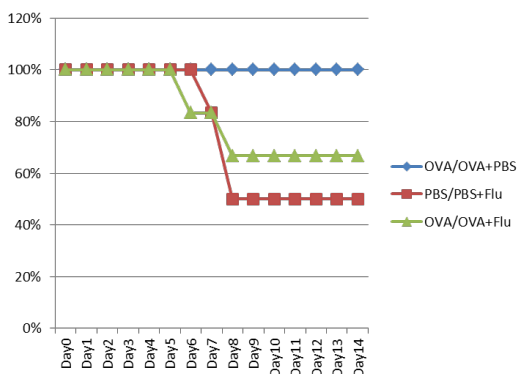


図 1.喘息マウスに PR-8 感染後の生存率

本研究において、喘息マウスのインフルエンザウイルス感染による重症化を期待していた。しかし、PR-8 の投与量、投与時期に関して検討を繰り返したが、図 1 に示すように PR-8 単独感染と喘息マウス+PR-8 感染群で死亡率に差を認めなかった。

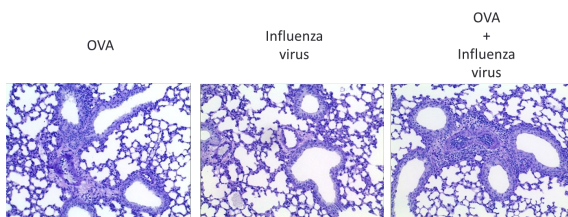


図 2. 病理組織学的検討

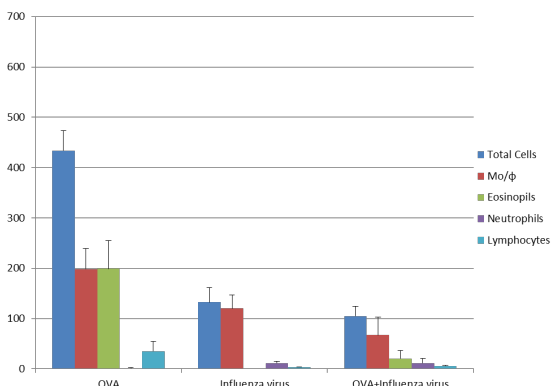


図 3. 肺内白血球の評価

病理組織学的検討では喘息マウスに PR-8 感染群では、PR-8 単独感染群と比較し、気道壁の肥厚と血管周囲への炎症細胞浸潤を認めた(図 2)。しかし、肺内白血球数および分画の検討では、PR-8 単独感染と喘息マウス+PR-8 単独感染の 2 群間で差を認めなかった。さらにこれら 2 つの群は気管支喘息マウス単独と比較し、総細胞数の抑制および好酸球の低下を認めた(図 3)。

サイトカイン産生についての評価を行ったが、いずれの群においても IL-4、IFN- γ 、IL-17 など、いずれの群においても差を認めることはなかった。本研究は、喘息マウスのインフルエンザウイルス感染による重症化メカニズムの解析を検討することが主目的であったが、主要評価項目に喘息の有無で期待した差を見出すことが不可能であると判断した。

気道感染においてリモデリングとは、組織が障害され壊されたことに対して起こる組織の再構築である。一方、肺の過剰な炎症(急性肺傷害)の後に、炎症の修復過程において肺に線維化を引き起こすことも知られている。そこで、Influenza virus (PR-8)単独感染による組織の炎症と、その結果生じる組織修復過程における線維化について評価を加えた。

(2)PR-8 感染非致死性モデルマウスにおける肺の線維化の評価

まず、初めに肺に著明に炎症を来たすが、それでも生存可能な PR-8 投与量の検討を行った。1/10LD₅₀ 投与量し、PR-8 感染 11 日目に著名な体重減少(-25%)を認めたが、その後体重は回復し感染後 35 日目まで観察を行ったが、観察期間中に死亡マウスを認めなかった。

病理組織学的所見について肺傷害スコアを用いて検討を行ったところ、感染 11 日目に肺傷害のピークを認め、以降肺の炎症修復過程においてスコアの低下を認めた。一方、肺内インフルエンザウイルスコピー数は感

染 4-7 日をピークに以降漸減していることが判明した(図 4)。このことから、ウイルスの増殖過程と肺の炎症のピークに時間的な差異を認めることが判明した。また、感染 14 日目には病理組織学的に、気道周囲に II 型肺胞上皮の過形成と考えられる新たな腺構造の出現、さらに感染 21-35 日目には、著名な気管支拡張の所見に加え、Elastica-Masson 染色で気道周囲にコラーゲンの増生を認めた(図 5)。さらに、感染 21 日目、35 日目の肺線維化スコアを検討したところ、非感染群と比較して、優位に線維化スコアが高値であった。

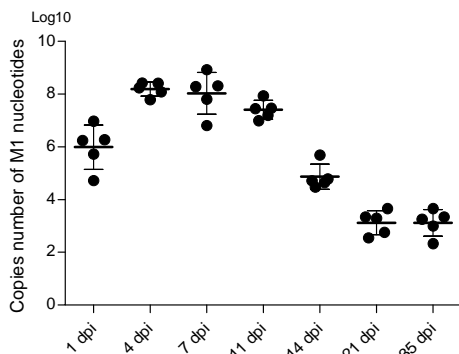


図 4 . PR-8 感染後のウイルスコピー数

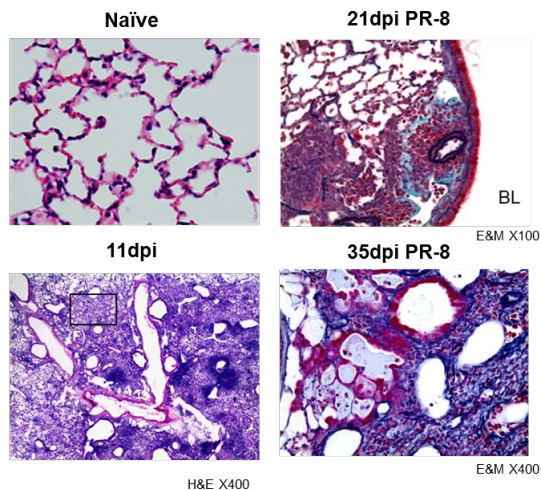


図 5 . PR-8 感染後の病理組織学的所見

経時的に肺気管支洗浄液(BAL)を回収し、BAL 中の白血球数および分画の検討を行ったところ、感染 11 日目に総細胞数のピークを認め、以降漸減傾向にあった。細胞分画は、PR-8 感染初期(感染後 1-7 日目)は好中球有

意であったが、肺傷害のピーク時(感染後 11-14 日目)には、60%以上をリンパ球が占め、感染晩期(感染 21-35 日目)では好中球を観察されず、マクロファージ・単球細胞の増加を認めた。肺の炎症の修復過程における線維化について炎症性単球細胞の関与が報告されていることから、上記結果はそれを示唆すると考えられるが、どのようなメカニズムで組織修復に関与しているかは不明な点が多く、さらなる検討が必要であると考えられた。

一方、好中球から産生される好中球エラスターゼが組織傷害に関与するとの報告があるが、図 6 に示すように BAL の好中球数の増加と並行して BAL 中のエラスターゼ活性の増加を認めた。さらに感染晩期(感染後 21-35 日目)に BAL 中に好中球を観察されないにもかかわらず、非感染群と比較して優位にエラスターゼ活性の増加を認めた。近年、エラスターゼが急性期の肺傷害のみならず、その後の線維化過程においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。すでに、ヒトの敗血症・急性肺傷害の臨床現場において、好中球エラスターゼ阻害薬が使用されているが、エラスターゼ阻害薬を用いることで、過剰な肺の炎症のあとの修復過程における線維化を抑制する可能性もあり、さらなる検討を行う必要があると考えられた。

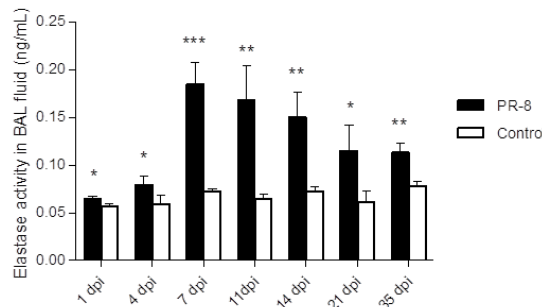


図 6 . PR-8 感染後のエラスターゼ活性

肺の線維化の程度を評価する目的で、肺のヒドロキシプロリン量、TGF-βおよびα-SMA の mRNA 量の測定を行った。図 7 に示すよう

に、感染後 35 日目で肺内のコラーゲンの増生を非感染群と比較し、有意に上昇していることを確認した。また、PR-8 感染後 21 日目には、肺の TGF- β および α -SMA の mRNA 量が非感染群と比較して有意に上昇していることも確認された。

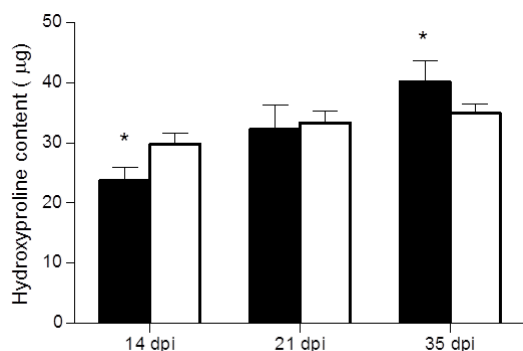


図 7 . PR-8 感染後の肺コラーゲン含有量

以上より、C57BL/6 に非致死量の PR-8 を感染させることで、著名な肺に炎症をきたし、その後、炎症の修復とともに肺（特に気道周囲）に線維化を認めるモデルマウスの作成に成功した。

当初の研究目標とは大きく異なっているが、気管支喘息の気道炎症の寛解・増悪に伴ったりモデリング過程を、本モデルマウスでは非致死量のインフルエンザウイルスを単独感染させることで、肺および気道の炎症から治癒過程における繊維化について再現可能なモデルマウスの作成に成功したと考えられる。今後も本モデルマウスを用いて、炎症修復過程におけるマクロファージ・単球細胞やエラスターゼの役割について検討を加える必要があると考えられた。

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 3 件)

1. Aoyagi T, Yamada M, Kunishima H, Tokuda K,

Yano H, Ishibashi N, Hatta M, Endo S, Arai K, Inomata S, Gu Y, Kanamori H, Kitagawa M, Hirakata Y, Kaku M., “Characteristics of infectious diseases in hospitalized patients during the early phase after the 2011 great East Japan earthquake: pneumonia as a significant reason for hospital care.” *Chest*. 2013;143(2):349-56. doi:10.1378/chest.11-3298 (査読有)

2. Kudo D, Toyama M, Aoyagi T, Akahori Y, Yamamoto H, Ishii K, Kanno E, Maruyama R, Kaku M, Kushimoto S, Kawakami K., “Involvement of high mobility group box 1 and the therapeutic effect of recombinant thrombomodulin in a mouse model of severe acute respiratory distress syndrome” *Clin Exp Immunol*. 2013; 173(2): 276-87. doi: 10.1111/cei.12106. (査読有)

3. Kudo D, Uno K, Aoyagi T, Akahori Y, Ishii K, Kanno E, Maruyama R, Kushimoto S, Kaku M, Kawakami K., “Low-dose interferon- α treatment improves survival and inflammatory responses in a mouse model of fulminant acute respiratory distress syndrome.” *Inflammation*. 2013; 36(4): 812-20. doi: 10.1007/s10753-013-9607-1. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

1. Aoyagi T, Kaito C, Sekimizu K, Omae Y, Saito Y, Mao H, Inomata S, Endo S, Hatta M, Gu Y, Tokuda K, Yano H, Kitagawa M, Kaku M.: Association between psm-mec on the Mobile Genetic Element and Clinical Manifestation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. IDweek, Oct 2-6, 2013, San Francisco, USA.

2. 青柳哲史、川上和義、石井恵子、金森肇、遠藤史郎、八田益充、具 芳明、徳田浩一、矢野寿一、國島広之、北川美穂、賀来満夫：肺線維化をきたすインフルエンザウイルス感染肺障害モデルマウスの作成、第 87 回日本感染症学会学術講演会・第 61 回日本化学

療法学会合同学会、2013年6月5日-6日、横浜

3. Aoyagi T, Kawakami K, Ishii K, Endo S, Kanamori H, Gu Y, Hatta M, Tokuda K, Yano H, Kunishima H, Kaku M: Lung fibrosis after acute lung injury caused by H1N1 influenza virus infection in mice. American Thoracic Society 2013, May17-22, 2013, Philadelphia, USA.

4. Aoyagi T, Kawakami K, Ishii K, Endo S, Kanamori H, Gu Y, Hatta M, Tokuda K, Yano H, Kunishima H, Kaku M: A novel ALI/ARDS experimental animal model caused by H1N1 influenza virus. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, May 9-10, 2013, Sendai, Japan.

5. 青柳哲史、川上和義、石井恵子、山田充啓、金森肇、國島広之、賀来満夫：肺線維化を来たすインフルエンザウイルス誘発急性肺傷害モデルマウスの作成、第53回日本呼吸器学会学術講演会、2013年4月19日-21日、東京

6. Aoyagi T, Kunishima H, Kanamori H, Endo S, Hatta M, Gu Y, Yamada M, Tokuda K, Yano H, Kitagawa M, Kaku M: Candida albicans versus non-albicans Candida in general wards at the tertiary University hospital in Japan. 8th International Healthcare Infection Society (HIS) Conference and Federation of Infection Societies (FIS) annual conference. November 19-21, 2012, Liverpool, UK.

7. 青柳哲史、山田充啓、國島広之、徳田浩一、矢野寿一、石橋令臣、八田益充、遠藤史郎、新井和明、猪股真也、具芳明、金森肇、北川美穂、平瀧洋一、賀来満夫：2011年東日本大震災直後の東北大学病院における感染症症例の解析、第86回日本感染症学会総会・学術講演会、2012年4月25日-26日、長崎

8. Aoyagi T, Yamada M, Kunishima H, Tokuda K, Yano H, Ishibashi N, Hatta M, Endo S, Arai K, Kanamori H, Kitagawa M, Hirakata Y, and Kaku M: Analysis of infectious diseases in the

aftermath of the 2011 Tohoku earthquake and tsunami: the threat of pneumonia to survivors.

The 49th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October 20-23, 2011, Boston, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

青柳 哲史 (AOYAGI TETSUJI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50581609

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：