

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659398

研究課題名(和文) ヒト気道上皮細胞を用いたインフルエンザウイルス感染重症化判別法の開発

研究課題名(英文) Development of methods to define the pathogenic magnitude of the influenza virus infection using human airway epithelial cells

研究代表者

山谷 睦雄 (YAMAYA, Mutsuo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60261640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円、(間接経費) 540,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト気道上皮細胞を用いた研究で、患者の重症度に関するウイルス放出量や炎症惹起物質インターロイキン-6の増加が上皮細胞脱落細胞数や培養液乳酸脱水素(LDH)酵素と相関することが、4種類のウイルス感染で明らかになった。これらの指標は、患者の病態に一致し、気道上皮細胞で簡便に測定できるため、インフルエンザウイルス感染重症化の判別法として有用であると示唆された。また、温度環境と重症化の関係を検討した。インフルエンザウイルスの増殖能力は39℃でも低下の程度は軽く、逆に39℃以上で細胞機能が低下した。重症化阻止には抗インフルエンザ薬の適切な使用と解熱による身体機能の正常化が必要であると結論された。

研究成果の概要(英文)：In the present study using human airway epithelial cells infected with four strains of influenza viruses, increases in the viral release and interleukin (IL)-6, which are associated with the pathogenic magnitude of the influenza virus infection, were correlated to the number of detached cells and the concentration of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatants. Because these parameters are associated with the pathogenesis of the patients, the experimental methods to infect airway epithelial cells with influenza virus may be useful to define the pathogenic magnitude of the influenza virus. The consistent replication of influenza virus in the airway epithelial cells was also detected at 39.0 degrees C, but the increased concentrations of LDH in the supernatants were observed. Appropriate use of anti-influenza virus drugs and improvement of cell functions by normalizing body temperature with anti-inflammatory drugs are needed to prevent severe conditions by influenza virus infection.

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

キーワード：インフルエンザ 重症化阻止 気道上皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスの病原性は病状の重症化や患者死亡に関係するため、病原性の程度判定は患者管理において極めて重要である。新型インフルエンザウイルスや新種の季節性インフルエンザが流行するたびに病原性が注目される。病原性は non-structural(NS)遺伝子などの遺伝子変異が報告され(Cheung 他 Lancet 360: 1831-1837, 2002)、これらの遺伝子の有無で予想されているが、気道上皮細胞の傷害性など具体的な指標をもとにした病原性の判定が患者治療の現場で求められている。他方でインフルエンザの病原性はウイルスの増殖能力(Govorkova 他、J Virol 79: 2191-2198, 2005)や炎症性物質の産生量(Lipatov 他、J Gen Virol 86: 1121-1130, 2005)に関係することが報告されている。トリインフルエンザウイルスは気道上皮細胞内で急速に増殖し、炎症反応も強いことが報告されている(de Jong 他 Nat Med 12: 1203-1207, 2006)。このように、ウイルス増殖能や炎症性物質の測定値がインフルエンザウイルスの病原性の程度判定に関連すると予想される。ただし、本邦において、このような研究は実施されておらず、インフルエンザウイルス感染の最初の標的細胞であるヒト気道上皮細胞を用いた評価もなされていない。このため、日本で流行しているインフルエンザウイルスの病原性に関するリアルタイムの情報は得られない環境にあった。

### 2. 研究の目的

インフルエンザウイルスの病原性は病状の重症化や患者死亡に関係するため、病原性の程度判定は患者管理において極めて重要である。新型インフルエンザウイルスや新種の季節性インフルエンザが流行するたびに感染による病原性が注目される。病原性は遺伝子変異で予想されているが、気道上皮細胞の傷害性など具体的な指標をもとにした病原性の迅速な判定が患者治療の現場で求められている。本研究では、ヒト気管上皮細胞を用いて、ウイルス増殖能、細胞の剥離脱落、培養液乳酸脱水素酵素(LDH)値、炎症の指標物質などを評価し、流行株インフルエンザの肺内における病原性を迅速に評価する方法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) インフルエンザウイルスの分離増殖

インフルエンザウイルスの分離増殖は沼崎らの方法に従って行った(Numazaki Y 他、Microbiol Immunol 31: 1085-1095, 1987)。インフルエンザウイルスのストック液は以下の方法で作成した: MDCK 細胞(イヌ腎臓上皮細胞)を、培養プレートを用いて増殖する。MDCK 細胞が増殖した時点で、分離したインフルエンザウイルスをトリプシン添加 MEM 培養液に添加し、33°C 95%-air 5%-CO<sub>2</sub> で更に

1 週間培養し、ウイルスを増やす。このウイルス含有培養液をインフルエンザウイルスのストック液とした(Numazaki Y 他、Microbiol Immunol, 1987)。

平成 24 年度の研究で用いたウイルスは、2009 年に流行した新型インフルエンザ、2008 年~2009 年に流行した A ソ連型季節性インフルエンザ、2008 年以前に流行した A ソ連型季節性インフルエンザ、A 香港型季節性インフルエンザ、の 4 種類である。

平成 25 年度の研究では 2009 年に流行した新型インフルエンザおよび A 香港型季節性インフルエンザを用いた。

#### (2) ヒト気管上皮細胞培養法およびインフルエンザウイルス感染法

ヒト気管上皮細胞の培養は山谷が開発した方法で行った(Yamaya M 他、Am J Physiol 262: L713-L724, 1992)。剖検から採取されたヒト気管から粘膜上皮を剥離し、上皮細胞を単離する。その後、上皮細胞を培養プレート(24-well plate)の well に入れて培養する。これによって、ヒト気管上皮細胞は培養プレートの底面に付着・増殖する。Well により、感染するインフルエンザウイルスの分離株の種類を変えた。また、温度環境による病原性の変化を検討する場合は感染後の培養温度を 37°C ~ 40°C に変えた。

#### (3) ウイルス増殖能および細胞傷害性の指標

培養液ウイルス量・細胞内ウイルス RNA 量、ウイルス感染後に浮遊している細胞数、および固着している細胞数、LDH およびインターロイキン(IL)-6 を測定した。

#### (4) ウイルス放出量、ウイルス RNA 複製量の測定

培養液ウイルス量測定は培養液を感染感受性の高い継代細胞に感染させて測定した(山谷他; J Pharmacol Exp Ther 333: 81-90, 2010)。測定するウイルスを含んだ培養液を 10 倍希釈し、MDCK 細胞に接種し、顕微鏡下でウイルスに特有な細胞の形態変化(細胞変性効果)を 7 日間観察した。培養細胞の 50% が変化を起こす希釈倍率(TCID<sub>50</sub> 単位/ml)を求め、ウイルス量とする。RNA 複製量は Real time RT-PCR 法により定量した。ウイルス感染後 1 日、3 日、5 日あるいは 5 日後に RNA 抽出液(RNA Bee®)を用いてインフルエンザウイルス感染細胞から RNA を抽出して TaqMan 法で測定した(Yamaya M 他、J Pharmacol Exp Ther 333: 81-90, 2010)。

#### (5) 炎症性物質(IL-6)放出量の測定

炎症性物質であるサイトカインはウイルス感染に伴う気道炎症、炎症性細胞の集積、および気道平滑筋収縮に関与する。炎症性サイトカインの気道上皮細胞からの放出の指標として、培養液中のインターロイキン(IL)-6

濃度を enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA 法)にて測定した(Yamaya M 他、Eur J Pharmacol 650: 431- 444, 2011)。

( 6 ) IL-6 を含む炎症性サイトカインの合成に関与する核内転写(NF-κB: p50 および p65) は ELISA 法にて測定した

#### 4 . 研究成果

( 1 ) 平成 24 年度は、「分離インフルエンザウイルス種間のヒト気道細胞傷害性の相違の比較」研究を実施した。培養液に浮遊する細胞数はインフルエンザウイルス種で違いを認めた。季節性 A 香港型が最も少なく、2008 年以前に流行した季節性 A ソ連型(2008 年以前 A ソ連型)が 2 番目に少なく、2008 ~2009 年季節性 A ソ連型と新型インフルエンザは同等であった。すなわち、新型インフルエンザ=2008 ~ 2009 年季節性 A ソ連型 > 2008 年以前 A ソ連型 > A 香港型であった。培養液ウイルス量は浮遊細胞数に相関した。すなわち、ウイルス量も新型インフルエンザ=2008 ~ 2009 年季節性 A ソ連型 > 2008 年以前 A ソ連型 > A 香港型の順番であった。感染 3 日後で細胞の脱落が少ない時期に測定したウイルス RNA 量は新型インフルエンザ=2008 ~ 2009 年季節性 A ソ連型 > 2008 年以前 A ソ連型 > A 香港型の順番であった。また、新型インフルエンザおよび 2008 ~ 2009 年季節性 A ソ連型は感染 5 日目において固着細胞数の減少を認めた。培養液 LDH 値は浮遊細胞数の多い新型インフルエンザおよび 2008 ~ 2009 年季節性 A ソ連型で増加を認めた。培養液 IL-6 量は新型インフルエンザ=2008 ~ 2009 年季節性 A ソ連型 > 2008 年以前 A ソ連型 > A 香港型の順番であった。インフルエンザウイルス感染後に転写因子の活性化を認めた。さらに、p65 の活性化は IL-6 量の増加と関連した。すなわち、新型インフルエンザ=2008 ~ 2009 年季節性 A ソ連型 > 2008 年以前 A ソ連型 > A 香港型の順番であった。この結果、インフルエンザウイルスの細胞傷害性はウイルス種で異なった。ウイルス増殖能が高いほど細胞傷害性および炎症惹起能が高い結果となった。

( 2 ) 平成 25 年度は「細胞培養の温度環境の違いによるウイルス増殖能の違いおよび細胞傷害性の違い」の研究を実施した。インフルエンザ感染前の中枢気道、肺胞の温度環境およびインフルエンザ感染時の温度環境に相当する 33 、 37 、 39 および 40 、 42 におけるインフルエンザウイルスの放出量は 37 が最も多く、33 と 39 が次いで多く、40 で減少し、42 ではウイルスは検出できなかった。細胞傷害性を示す培養液 LDH 濃度は 40 以上でウイルス感染前に上昇し、細胞傷害を認めた。酸性エンドゾームは細胞のイオン輸送を反映するため、細胞の生理機能として測定した。その結果、39 以

上から酸性エンドゾームが減少し、細胞機能の障害が示唆された。気道炎症の指標である、IL-6 も 40 でウイルス感染前に上昇し、すでに気道炎症を生じていることが示唆された。脱落細胞数は温度による違いを認めなかった。この結果、ヒト気管上皮細胞においてインフルエンザウイルスの増殖能力は 37 が最大で、39 では低下の程度は軽く、40 以上で明らかに低下した。逆に 39 以上で細胞機能が低下し、40 以上では細胞傷害および炎症惹起物質の増加が認められた。

#### 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 15 件 )

1. Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R. Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Respir Invest* (in press) 2014  
DOI.org/10.1016/j.resinv.2014.03.004 査読有
2. Yamaya M, Nishimura H, Kubo H, Nagatomi R. Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells. *J Med Virol* (in press) 2014  
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1096-9071](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1096-9071) 査読有
3. Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R. Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Physiol Reports* 1: e00041, 2013. DOI: 10.1002/phy2.41 査読有
4. Azuma A, Yamaya M, Kadota J, Mikasa K, Kudoh S of the Influenza Practical Treatment Workshop on New Targets of Macrolides. The use of macrolides in the 2009 H1N1 virus infection outbreak: A survey of general practice in Japan. *Respir Invest* 51: 257-259, 2013. DOI.org/10.1016/j.resinv.2013.04.002 査読有
5. Fujino N, Kubo H, Ota C, Suzuki T, Takahashi T, Yamada M, Suzuki S, Kondo T, Nagatomi R, Tando Y, Yamaya M. Increased severity of H1N1 pandemic influenza virus infection in alveolar type II cells from patients with pulmonary fibrosis. *J Infect Dis* 207: 692-693, 2013. DOI: 10.1093/infdis/jis739 査読有
6. 山谷睦雄 . 「危険因子」 COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン 第 4 版 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第 4 版作成委員会編集 . メディカルレビュー社 . 9-12, 2013. (分担

- 執筆) 査読有
7. 山谷睦雄。「薬物療法 マクロライド；安定期の管理、治療と管理」COPD（慢性閉塞性肺疾患）診断と治療のためのガイドライン 第4版 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第4版作成委員会編集。メディカルレビュー社。71, 2013.(分担執筆) 査読有
  8. 山谷睦雄。「増悪の予防；増悪期の管理、治療と管理」COPD（慢性閉塞性肺疾患）診断と治療のためのガイドライン 第4版 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第4版作成委員会編集。メディカルレビュー社。113-114, 2013.(分担執筆) 査読有
  9. 山谷睦雄。「ライノウイルスなどに対する易感染性と気管支喘息の難治化」アレルギー・免疫 20: 532-537, 2013. 査読無
  10. 山谷睦雄。「COPD 急性増悪の予防戦略」呼吸器内科 23: 436-442, 2013. 査読無
  11. 山谷睦雄。「マイコプラズマ肺炎」別冊医学のあゆみ 呼吸器疾患 ver. 6 state of arts 154-156, 2013. 査読無
  12. Yamaya M, Nishimura H, Hatachi Y, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, Mizuta K, Kubo H, Nagatomi R. Levofloxacin inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother 56: 4052-4061, 2012. DOI: 10.1128/AAC.00259-12 査読有
  13. Yamaya M, Nishimura H, Hatachi Y, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, Kubo H, Nagatomi R. Inhibitory effects of tiotropium on rhinovirus infection in human airway epithelial cells. Eur Respir J 40: 122-132, 2012. DOI: 10.1183/09031936.00065111 査読有
  14. Yamaya M. Virus Infection-induced bronchial asthma exacerbation. Pulmonary Medicine 2012: Article ID 834826, 14 pages, 2012. DOI:10.1155/2012/834826 査読有
  15. Yamaya M, Azuma A, Takizawa H, Kadota J, Tamaoki J, Kudoh S. Macrolide effects on the prevention of COPD exacerbations. Eur Respir J 40: 485-494, 2012. DOI: 10.1183/09031936.00208011 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 山谷睦雄：「特別講演：呼吸器感染症による COPD の増悪」Scientific Exchange Meeting 2013 年 10 月 17 日, 京都
2. 山谷睦雄：シンポジウム「COPD ガイドラインをいかに日常診療に生かすか」 - 疾患認知度 UP から診断率向上へ - COPD シンポジウム 2013 2013 年 10 月 5 日, 仙台
3. 山谷睦雄：「招待講演：呼吸器感染症と COPD・気管支喘息～病態と管理法～」呼吸器感染症学術講演会 2013 年 9 月 9 日 福島県いわき市
4. 山谷睦雄：「話題提供：呼吸器感染症と気

- 道クリーニング」第 11 回インフルエンザ夏季セミナー 2013 年 7 月 20 日, 東京
5. Yamaya M, Hatachi Y, Kubo H, Nadine LK, Nishimura H. Serine protease inhibitors suppress influenza virus infection in human airway epithelial cells. (Poster presentation) American Thoracic Society International Conference, 2013/5/17-22, Philadelphia, USA
  6. 山谷睦雄：「呼吸器感染症における新たな治療戦略 - 気道クリーニングと呼吸器感染症 - 」第 116 回日本小児科学会学術集会教育セミナー9 (ES9) 2013 年 4 月 19 日, 広島
  7. 山谷睦雄：「目で見る感染症：ウイルス：呼吸器ウイルスの感染メカニズムとその制御」イブニングセミナー 第 60 回日本化学療法学会西日本支部総会 第 55 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同学会 2012 年 11 月 6 日, 福岡
  8. 山谷睦雄：「マクロライド療法の慢性閉塞性肺疾患(COPD)増悪抑制作用」シンポジウム 第 61 回日本感染症学会東北地方会学術集会 第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 2012 年 10 月 12 日, 東京
  9. 山谷睦雄：「招待講演：ウイルス感染と気道炎症の特徴と対策について」特別講演 呼吸器疾患病診連携の会 第 9 回学術講演会 2012 年 9 月 20 日, 山形
  10. Yamaya M, Hatachi Y, Kubo H, Nishimura H. Clarithromycin inhibits pandemic A/H1N1/2009 influenza virus infection in human airway epithelial cells. (P4364, Session 448) (Poster discussion) European Respiratory Society Annual Congress. 2012/9/4, Vienna, Austria
  11. Yamaya M, Y. Hatachi Y, Kubo H, Nishimura H. Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in human airway epithelia cells. (Poster presentation) American Thoracic Society 2012 International Conference. 2012/5/18-23, San Francisco, USA
  12. Yamaya M, Hatachi Y, Kubo H, Nishimura H. Formoterol and budesonide inhibits rhinovirus infection in human airway epithelial cells. (Poster presentation) American Thoracic Society 2012 International Conference. 2012/5/18-23, San Francisco, USA
  13. Yamaya M, Hatachi Y, Kubo H, Nishimura H. L-Carbocysteine inhibits respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. (Poster presentation) American Thoracic Society 2012 International Conference. 2012/5/18-23, San Francisco, USA
  14. 山谷睦雄：「COPD 増悪と抗菌薬治療：抗菌薬治療のエビデンスと必要性」教育講演 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2012/4/20, 神戸

〔図書〕(計 3 件)

1. 山谷睦雄 . 「急性気管支炎」(共同執筆)  
(p751-752) 内科学第 10 版 朝倉書店.  
2013.
2. 山谷睦雄 . 「13 慢性閉塞性肺疾患」抗菌薬の選択と使い方 . 呼吸器科領域 . 藤田次郎 編 医薬ジャーナル社 . 146-156, 2012.
3. 山谷睦雄 . 「慢性閉塞性肺疾患」決して安心できない! 慢性疾患の急性増悪とその対応 . Nursing Mook 74, pp. 8-13, 学研メディカル秀潤社、東京、2012.

〔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

東北大学大学院医学系研究科先進感染症予防学寄附講座ホームページ

<http://www.apmid.med.tohoku.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山谷 睦雄 (YAMAYA, Mutsuo)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 60261640

(2)研究分担者

西村 秀一 (NISHIMURA, Hidekazu)  
独立行政法人国立病院機構 (仙台医療センター臨床研究部)・病因研究室・病因研究室長  
研究者番号 : 50172698

(3)連携研究者 なし