

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293189

研究課題名(和文) インフルエンザの進入部位を標的とした感染誘発気管支喘息発作の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Studies on a new treatment for influenza virus infection-induced asthma exacerbation by the inhibition of virus entry

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト気管および鼻粘膜上皮細胞がインフルエンザウイルスを活性化するプロテアーゼを発現して細胞内進入を促進し、ウイルス複製や気管支喘息発作を生じる炎症性物質の合成、気道上皮細胞傷害を生じることが明らかになった。また、プロテアーゼ阻害薬がウイルス複製や炎症性物質の合成、気道上皮細胞傷害を抑制することを明らかにした。プロテアーゼ阻害薬がインフルエンザウイルスの細胞内進入を阻止して、感染に伴う気管支喘息の新規の治療薬になる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by the proteases, including type II transmembrane serine proteases which are expressed in the airway epithelial cells, enhances viral entry into cytoplasm, resulting in the next steps of viral replication. Viral replication, the release of inflammatory cytokine and cell damage are associated with symptoms, including fever and exacerbation of bronchial asthma. Because serine protease inhibitors reduce influenza viral replication by the inhibition of entry into cytoplasm, cytokine release and cell damage, the inhibitors are new potential candidate drugs for influenza virus infection-induced asthma exacerbation.

研究分野：呼吸器内科学：呼吸器ウイルス感染による気管支喘息および慢性閉塞性肺疾患の増悪の機序および治療法の研究

キーワード：呼吸器ウイルス感染症 気管支喘息 気道上皮細胞 ウイルス感染制御 気道炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息患者において、インフルエンザウイルス感染で喘息発作を生じることが知られており、中には呼吸不全などの重症化に至る場合がある¹⁾。インフルエンザウイルスは細胞に発現するプロテアーゼでヘマグルチニンが酵素的に開裂して細胞内に進入し、増殖する²⁾。しかし、この部位を阻害する抗インフルエンザ薬は開発されていない。私たちはマクロライドや喀痰調整薬がインフルエンザウイルスの受容体発現やウイルス RNA を細胞質内に進入する部位であるの酸性エンドゾームの pH を変化させてウイルスの複製を抑制することを報告してきた¹⁾。(2) プロテアーゼ阻害薬のインフルエンザ複製抑制効果はイヌ腎臓細胞を用いて発表されている³⁾。また、アプロチニンなどの限られた阻害薬を用いてヒト扁桃腺上皮細胞におけるウイルス増殖抑制は報告されていた⁴⁾。しかし、ヒトの疾患と治療法を正確に把握するために、ヒトの気管や鼻腔粘膜上皮細胞を用いて多種類の阻害薬の効果を検討する必要があった。さらに、喘息発作の病態に関与する炎症惹起物質の合成・放出の抑制作用は明らかになっていない。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスの進入部位である、気道上皮細胞が発現するプロテアーゼによるウイルスの活性化を阻害し、インフルエンザウイルスの感染を阻止する研究を進めるため、ヒト気管上皮細胞およびヒト鼻腔・副鼻腔粘膜上皮細胞を用いて以下を検討した：(1) 細胞におけるプロテアーゼの発現、(2) プロテアーゼによるインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン蛋白開裂の確認、(3) 細胞におけるインフルエンザウイルスの複製・放出、炎症性物質の合成・放出およびウイルス感染による細胞傷害、(4) プロテアーゼ阻害薬によるウイルス複製・放出の抑制、炎症性物質の合成・放出の抑制およびウイルス感染による細胞傷害の抑制。

3. 研究の方法

(1) ヒト気管上皮細胞は剖検気管粘膜をプロテアーゼ処理して単離し、プラスチック容器に培養した。ヒト鼻腔・副鼻腔粘膜は耳鼻咽喉科で手術により切除した粘膜を同様にプロテアーゼ処理して単離し、プラスチック容器に培養した。

(2) 細胞におけるプロテアーゼの発現はヒト気道上皮細胞以外の細胞でこれまでに確認された 3 種類のプロテアーゼ【transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)、TMPRSS4、TMPRSS11D】に候補を絞って測定した。TMPRSS2 および TMPRSS11D は抗体を用いて免疫染色を行い、発現を確認した。さらに 3 種類のプロテアーゼのメッセンジャー RNA (mRNA) も測定した。

(3) プロテアーゼによるインフルエンザウ

イルス・ヘマグルチニン蛋白開裂の確認は培養液からウイルス蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法を用いて解析した。

(4) インフルエンザウイルスはインフルエンザに罹患した鼻汁あるいは咽頭ぬぐい液から分離し、気管上皮細胞に感染して増殖して用いた。2009 年に新型インフルエンザとして流行した株(A/H1N1 pdm 2009)および季節性インフルエンザウイルス株(A/H3N2 New York)を用いた。

(5) 上皮細胞から放出されたウイルスの量は培養上清を希釈してイヌ腎臓細胞に接種し、細胞の形態が変化する最大の希釈倍率を求めて測定した。また、細胞内のウイルス複製は細胞から抽出したインフルエンザウイルス RNA を定量化して求めた。

(6) 気管支喘息発作の病態に係る炎症性物質は、培養上清を用いてインターロイキン(IL)-6 および腫瘍壊死因子(TNF: tumor necrosis factor)を酵素結合免疫吸着検定法(ELISA 法)で定量化した。

(7) インフルエンザウイルス感染による細胞傷害は培養上清中に剥離・脱落する遊離細胞数を測定して求めた。

4. 研究成果

(1) 免疫染色において、ヒト気管上皮細胞は 2 種類のプロテアーゼ、TMPRSS2 (下図 1 A) および TMPRSS11D (下図 1 B) を発現することが明らかになった。また、3 種類のプロテアーゼの mRNA をヒト気管上皮細胞が発現すること(下図 1 C) および使用した阻害薬のカモスタット(下図 1 C)を作用させた場合でもプロテアーゼの発現が変わらなかったことが明らかになった。すなわち、阻害薬は酵素の作用部位の拮抗作用を示すことがわかった。

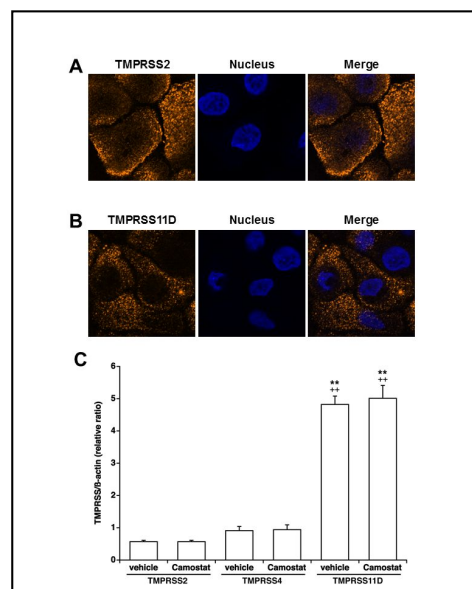


図 1: ヒト気管上皮細胞におけるプロテアーゼの発現: 免疫染色 (A および B)、遺伝子レベル (C) で確認した。

阻害薬であるナファモスタットも発現に影響を与えない傾向を認めている。同様に、ヒト鼻腔・副鼻腔粘膜上皮細胞も3種類のプロテアーゼ (TMPRSS2、TMPRSS4、およびTMPRSS11D) mRNA を発現し、ナファモスタットは発現に影響を与えなかった。

(2) プロテアーゼによるインフルエンザウイルス・ヘマグルチニン蛋白の開裂を確認した。細胞から放出されたウイルスではヘマグルチニンは開裂していた。これに対し、プロテアーゼ阻害薬は開裂を阻害した。2009年流行のインフルエンザを感染させ、気管上皮細胞ではカモスタットを(図2)、鼻腔粘膜上皮細胞ではナファモスタットを作用させて開裂の阻害を明らかにした。

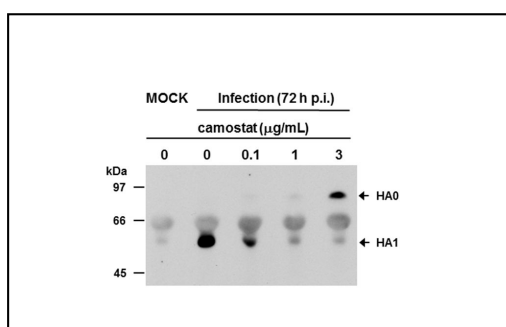


図2 . カモスタット (camostat) によるヘマグルチニン開裂阻害: 開裂されていないウイルス(HA0)が増加している。

(3) 2009年流行のインフルエンザウイルスおよび季節性インフルエンザともにヒト気管上皮細胞に感染し、培養液中への放出が認められた(図3、図4)。また、プロテアーゼ阻害薬を5種類試したところ、カモスタット(図3)とナファモスタットによる放出抑制が強く表れた。アプロチニンによる抑制が次に強く、ガベキサート、シベレスタットも弱い抑制効果を認めた。

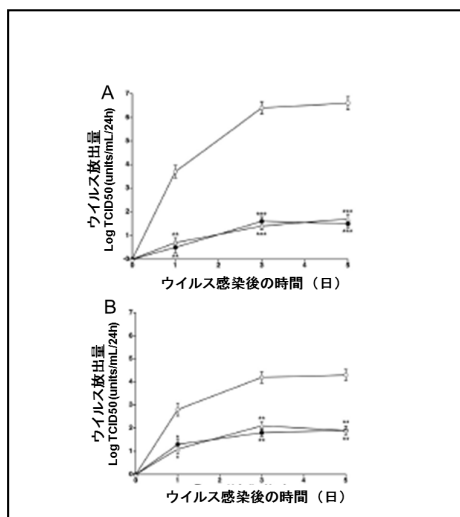


図3 . カモスタットによる新型(A)および季節性(B)インフルエンザの放出抑制。

ヒト鼻腔・副鼻腔粘膜上皮細胞においても同様に培養液ウイルス放出がプロテアーゼ阻害薬で減少した。カモスタットとナファモスタットが強い抑制効果を示し(図4)、アプロチニンによる抑制が次に強く、ガベキサート、シベレスタットも弱い抑制効果を認めた。

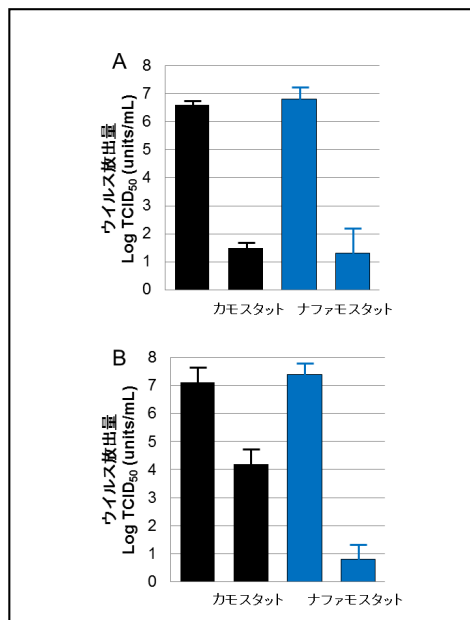


図4 . ヒト気管(A)および鼻腔・副鼻腔(B)粘膜上皮細胞における、カモスタットおよびナファモスタットの2009年新型インフルエンザウイルス放出抑制。

また、ウイルス放出とともに、ウイルスRNAの細胞内複製もプロテアーゼ阻害薬で減少した。カモスタットとナファモスタットが強い抑制効果を示し、アプロチニンによる抑制が次に強く、ガベキサート、シベレスタットも弱い抑制効果を認めた。

(4) 2009年流行のインフルエンザウイルスおよび季節性インフルエンザともに気管上皮細胞に感染させ、培養液中の炎症性物質を測定した。その結果、いずれのウイルスもIL-6および腫瘍壊死因子(TNF-α)が増加した。また、プロテアーゼ阻害薬のカモスタットおよびナファモスタットはこれらの放出量を減少した(図5)。

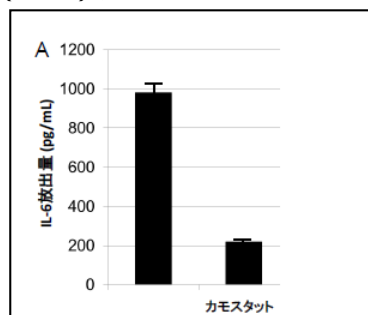


図5 A . インフルエンザウイルス感染によるヒト気管上皮細胞におけるIL-6放出、およびカモスタットによる抑制。

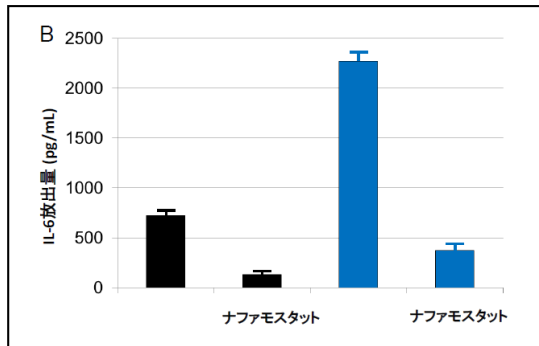


図5 B . インフルエンザウイルス感染によるヒト気管上皮細胞 (左2本バー) および鼻腔副鼻腔粘膜上皮細胞 (右2本バー) におけるIL-6 放出、ナファモスタットによる抑制。

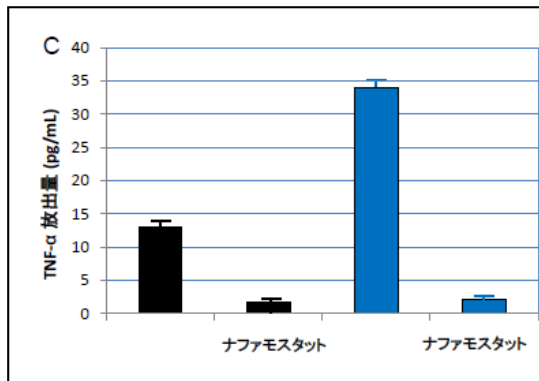


図5 C . インフルエンザウイルス感染によるヒト気管上皮細胞 (左2本バー) および鼻腔副鼻腔粘膜上皮細胞 (右2本バー) におけるTNF-α 放出、ナファモスタットによる抑制。

(5) 新型インフルエンザウイルス感染によるヒト気管上皮培養細胞の剥離・脱落は、脱落細胞数がプロテアーゼ阻害薬であるナファモスタットの添加により減少した。

(6) 鼻腔・副鼻腔疾患に気管支喘息を合併する症例から得られた鼻腔・副鼻腔粘膜上皮細胞を用いて、以下の所見が得られた：2009年新型インフルエンザウイルスが鼻腔・副鼻腔粘膜上皮細胞に感染し、培養上清中にウイルスが放出された、プロテアーゼ阻害薬のナファモスタットの添加によって、培養上清中に放出されるウイルス量が減少した、インフルエンザウイルス感染後、培養上清中に放出される炎症性物質 (IL-6 および TNF-α) が増加した、プロテアーゼ阻害薬のナファモスタットの添加によって、培養上清中に放出される IL-6 および TNF-α が減少した。

<引用文献>

Yamaya M、 Virus infection-induced bronchial asthma exacerbation, *Pulm Med*, 2012: 834826, 2012 DOI: 10.1155/2012/834826

Nagai Y、 Protease-dependent virus tropism and pathogenicity, *Trends Microbiol*, 1 巻、1993、 81-87

Hosoya M, Matsuyama S, Baba M, Suzuki H, Shigeta S, Effects of protease inhibitors on replication of various myxoviruses、 *Antimicrob Agents Chemother*, 36 巻、1992、 1432-1436

Zhirnov OP, Ikizler MR, Wright P、 Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases、 *J Virol*, 76 巻、2002、 8682-8689

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12件)

Yamaya M, Shimotai Y, Hatachi Y, Homma M, Nishimura H、 Serine proteases and their inhibitors in human airway epithelial cells: effects on influenza virus replication and airway inflammation、 *Clin Microbiol*, 査読有、 2016、 (印刷中) DOI: org/10.4172/2327-5073.1000238

Yamaya M, Nomura K, Arakawa K, Nishimura H, Lusamba Kalonji N, Kubo H, Nagatomi R, Kawase T, Increased rhinovirus replication in nasal mucosa cells in allergic subjects is associated with increased ICAM-1 levels and endosomal acidification and is inhibited by L-carbocysteine、 *Immunity, Inflammation and Disease*, 査読有、2016、(印刷中) DOI: 10.1002/iid3.102

山谷睦雄, 篠智幸政、下平義隆、本間守男、西村秀一、気道上皮プロテアーゼによるインフルエンザウイルスの活性化：治療への応用の可能性、査読有、日本呼吸器学会誌、2016、(印刷中) URL: https://www.jrs.or.jp

Yamaya M, Shimotai Y, Hatachi Y, Lusamba Kalonji N, Tando Y, Kitajima Y, Matsuo K, Kubo K, Nagatomi R, Hongo S, Homma M, Nishimura H、 The serine protease inhibitor camostat inhibits influenza virus replication and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells、 *Pulm Pharmacol Ther*, 査読有、 33 巻、2015、 66-74 DOI: 10.1016/j.pupt.2015.07.001

Lusamba Kalonji N, Nomura K, Kawase T, Ota C, Kubo H, Sato T, Yanagisawa T, Sunazuka T, Ōmura S, Yamaya M, The non-antibiotic macrolide EM900 inhibits rhinovirus infection and cytokine production in human airway epithelial cells、 *Physiol Rep*, 査読有、 3 巻、 2015、 e12557 DOI: 10.14814/phy2.12557

山谷睦雄, インフルエンザウイルスと気

管支喘息、アレルギーの臨床、査読なし、
35 巻、2015、36-40 URL:
<http://www.hokuryukan-ns.co.jp>

山谷睦雄、ウイルス感染誘発気管支喘息
増悪の管理、アレルギー・免疫、査読な
し、22 巻、2015、1422-1430 URL:
<https://www.iyaku-j.com>

山谷睦雄、ウイルスによる急性気道感染
症とその病態、日本胸部臨床、査読なし、
73 巻、2014、S41-S48 URL:
www.kokuseido.co.jp

Higashi F, Kubo H, Yasuda H, Nukiwa T,
Yamaya M、Additional treatment with
clarithromycin reduces fever duration in
patients with influenza、Respir Invest、査読
有、52 巻、2014、302-309 DOI:
10.1016/j.resinv.2014.05.001

Yamaya M, Nadine LK, Ota C, Kubo H,
Makiguchi T, Nagatomi R, Nishimura H、
Magnitude of influenza virus replication and
cell damage is associated with interleukin-6
production in primary cultures of human
tracheal epithelium、Respir Physiol
Neurobiol、査読有、202 巻、2014、16-23
DOI: 10.1016/j.resp.2014.07.010

Yamaya M, Lusamba N, Kubo H, Saito K,
Saito R, Nishimura H、The effects of
neuraminidase inhibitors on the release of
oseltamivir-sensitive and
oseltamivir-resistant influenza viruses from
primary cultures of human tracheal
epithelium、J Med Virol、査読有、87 巻、
2015、25-34 DOI: 10.1002/jmv.23974

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、査読なし、20 巻、2013、
532-537 URL: <https://www.iyaku-j.com>

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① 山谷睦雄、呼吸器ウイルス感染症制御
新たなる可能性 - インフルエンザウイル
スを中心に -、第 451 回福岡地区小児
科医会(丹々会)学術講演会(招待講演)、
2015 年 11 月 25 日、福岡市、ソラリア西
鉄ホテル
- ② 山谷睦雄、呼吸器治療薬の気道炎症抑制
および閉塞性呼吸器疾患増悪抑制効果、
第 55 回日本呼吸器学会学術講演会(招待
講演)、平成 27 年 4 月 18 日、東京、東京
国際フォーラム
- ③ 山谷睦雄、慢性閉塞性肺疾患の増悪管
理：ウイルス呼吸器感染症への対応、第
62 回日本化学療法学会西日本支部総会/第
57 回日本感染症学会中日本地方会学術集
会/第 84 回日本感染症学会西日本地方会
学術集会合同開催(招待講演)、平成 26
年 10 月 24 日、岡山市、岡山コンベンシ
ョンセンター
- ④ 山谷睦雄、ウイルス感染による COPD 増
悪～病態解明と治療法・予防法開発の展

開～、第 12 回神奈川 COPD 先端治療研
究会(招待講演)、平成 27 年 2 月 19 日、横
浜市、新横浜プリンスホテル

⑤ 山谷睦雄、ウイルス感染と喘息・COPD 増
悪～メカニズムから治療まで～、Scientific
Exchange Meeting in Osaka(招待講演)、平
成 27 年 3 月 27 日、大阪市、ANA クラウ
ンプラザホテル

⑥ Yamaya M, Hatachi Y, Kubo H, Nadine LK,
Nishimura H. Serine protease inhibitors
suppress influenza virus infection in human
airway epithelial cells. American Thoracic
Society International Conference. 2013 年 5
月 17 日～2013 年 5 月 22 日、Philadelphia,
USA

⑦ 山谷睦雄、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(招待講演)、2013 年 09 月 09 日、
福島県いわき市、いわき市ワシントンホ
テル

山谷睦雄：呼吸器感染症による COPD の増
悪。Scientific Exchange Meeting(招待講演)、
2013 年 10 月 17 日、京都市、ホテルグラ
ンヴィア京都

〔図書〕(計 1 件)

山谷睦雄、内科学第 10 版、朝倉書店、
2013 年、総ページ数 2404

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

川瀬 哲明 (KAWASE, Tetsuaki)
東北大学・医工学研究科・教授
研究者番号：50169728