

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460568

研究課題名(和文) インフルエンザ肺炎の重症化メカニズムの解明～その治療を目指して～

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of severe pneumonia by influenza virus infection

研究代表者

福士 雅也 (Fukushi, Masaya)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：50313515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性鳥インフルエンザウイルスなどの新型インフルエンザでは重症肺炎(急性呼吸促進症候群(ARDS))を起こして死亡するが、治療法は確立していない。研究代表者らは、これまでに、インフルエンザ感染マウスが、ヒトと同様にARDSで死亡すること、肺サーファクタント(肺胞腔内に分泌される宿主因子)を人工的に投与すると死亡率が低下すること、を明らかにしてきた。

本研究では、このメカニズムの解明と、全く新しい人工調製肺サーファクタントを検討した。その結果、研究期間内に新規人工調製肺サーファクタントの有効性を示すことは出来なかったが、その調整方法に改善の余地があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Infection with new influenza viruses, for example avian H5N1 virus, is known to have a high mortality rate. The main cause of death among these patients is acute respiratory distress syndrome (ARDS)/diffuse alveolar damage (DAD). However, no effective treatment for ARDS/DAD has been established. We previously reported that i) mouse-adapted influenza virus infection induced ARDS/DAD in the mouse lungs, ii) administration of artificial surfactant had a beneficial effect on mice infected with influenza virus.

In this study, we tried to reveal the mechanism of beneficial effect of the artificial surfactant to influenza virus-infected mice. In addition, the effect of the new type of artificial surfactant was examined.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス感染 重症肺炎 肺サーファクタント 治療

1. 研究開始当初の背景

高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)をはじめ、2013年中国で流行したH7N9インフルエンザウイルスなど、新規に発生したインフルエンザウイルス(いわゆる「新型インフルエンザ」)による感染では致死率が高い。また、2009年に世界的流行したインフルエンザA(H1N1)pdm09(当時の新型インフルエンザウイルス)感染でも多くの人々が亡くなった。これら新型インフルエンザウイルス感染による死亡者の全員が重症肺炎を起こしていることが判っている。しかし、治療法は確立しておらず、治療・治療薬の開発が急務であった。

研究代表者らは、これまでに、マウス感染モデルを用いて、ヒトから分離されたインフルエンザウイルスの接種が引き起こすマウスの肺炎は、ヒトにおけるウイルス性肺炎と同様の病理組織像をもつこと、さらに、これが進行した重症肺炎では、ヒトにおける急性呼吸促迫症候群(Acute respiratory distress syndrome [ARDS])と同じ肺病理組織像(びまん性肺胞障害 Diffuse alveolar damage [DAD])を呈することを明らかにした(図1)。

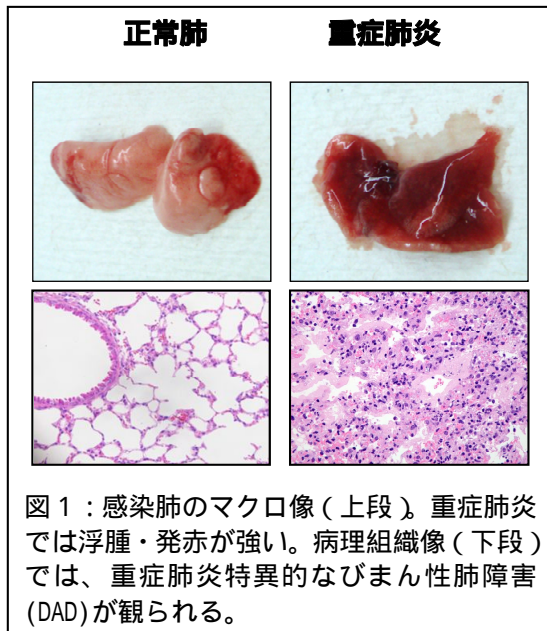


図1：感染肺のマクロ像(上段)。重症肺炎では浮腫・発赤が強い。病理組織像(下段)では、重症肺炎特異的なびまん性肺障害(DAD)が観られる。

これらの事から、インフルエンザウイルスマウス感染モデルがヒトインフルエンザ重症肺炎のモデルとなる事を報告した(Fukushi et. al., PLoS ONE 2011)。

このマウス感染モデルを用い、ウイルス性肺炎が重症肺炎に進行するメカニズムの解明を試みた。すると、肺炎進行に伴い、肺サーファクタント(肺胞腔内に存在する肺特異的因子)が減少することが判った(図2)。このため、新生児呼吸促迫症候群(RDS)の治療に用いられる人工肺サーファクタントの投与を試みた。すると、感染マウスの死亡率が低下した(図3)。この時、肺内ウイルス量はコントロール群と同じであった。一方、

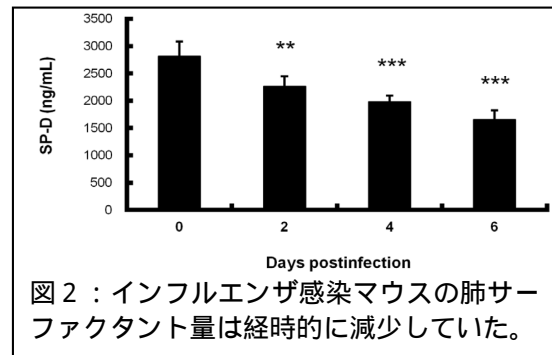


図2：インフルエンザ感染マウスの肺サーファクタント量は経時的に減少していた。

肺病理ではDADが抑えられていることが明らかとなった。また、肺含気量(肺中の空気量)も多く残っていることが判った。このことから、人工肺サーファクタント投与が肺の換気機能をより多く維持することが判った。これらの事から、インフルエンザウイルス感染によるウイルス性感染が、重症肺炎に進行していくメカニズムには、肺サーファクタントの減少が鍵となっていることが判った(Fukushi et. al., PLoS ONE 2012)。

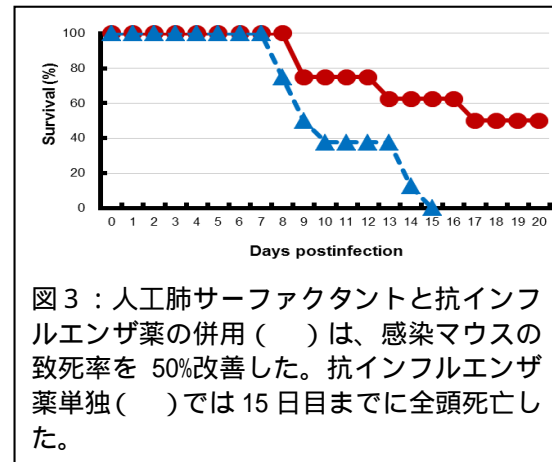


図3：人工肺サーファクタントと抗インフルエンザ薬の併用()は、感染マウスの致死率を50%改善した。抗インフルエンザ薬単独()では15日目までに全頭死亡した。

今回の実験はインフルエンザ重症肺炎の治療を念頭に置いたものである。しかし、インフルエンザ重症肺炎は、ヒトの例でも、我々が行ったマウス感染モデルにおいても、ARDS/DADである。ARDS/DADは、インフルエンザウイルス感染以外の肺への侵襲や、敗血症などの全身性の侵襲、肺以外の部位の手術など、種々の原因で発生することが判っている。我々の研究結果から、先行事象や先行疾患がARDS/DADに進行する原因として、肺サーファクタントの減少が鍵となっている可能性が示された。現在、ARDS/DADの原因は諸説ある。またその治療法も確立しているとは言いがたい。このため、我々のマウス感染モデルのさらなる検討が、インフルエンザ重症肺炎のみならず、ARDS/DADの治療法の確立にヒントを与える事ができると期待している。

2. 研究の目的

本研究課題では「インフルエンザウイルス感染による肺炎の重症化メカニズムを明らかにし、ヒトへの治療応用を目指すこと」を

最終的なゴールとした。申請者らは、インフルエンザ肺炎の重症化に肺サーファクタント（肺胞腔内に存在する肺特異的因子）の欠乏が関わっていることを明らかにした（Fukushi et. al., PLoS ONE 2011; Fukushi et. al., PLoS ONE 2012）。この成果を発展させ、(1) 肺炎重症化につながるサーファクタント欠乏の機序、(2) 肺炎重症化とサイトカインストーム（多数のサイトカインの過剰発現）の関連、(3) サーファクタント欠乏とサイトカインストームの関連、の3つの課題について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究課題では以下の点について検討を行い、重症肺炎メカニズム解明とヒトへの治療応用を目指した。特に最終年度には、(3) の新規人工調整肺サーファクタントを用いて検討を行った。

(1) マウスを用いたインフルエンザウイルス感染によるヒト重症肺炎モデルを用い、既存の人工肺サーファクタント投与が効果を示すか否かを検討する。

(2) 肺サーファクタント構成成分のうち、どの成分が重症肺炎の緩和に影響があるのかを明らかにする。

(3) インフルエンザ重症肺炎マウスモデルを用い、既存の人工肺サーファクタントとは異なる新規の人工調整肺サーファクタントの有効性を検討した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルスを感染させるマウスモデルを立ち上げることができた。本研究のベースとなった研究は、研究代表者が前施設で行った成果である。本研究申請時、現所属の広島大学では実験系が立ちあがっていなかった。このため、ウイルス入手を含めた実験材料の入手、実験環境の整備、諸手続き等を行い実験系の立ち上げを行った。そして、インフルエンザ感染マウスが重症肺炎を起こして、死亡することの再現性の確認を行った。

(2) 当初計画では、既存人工肺サーファクタントに含まれる成分について、一つずつインフルエンザ感染マウスへ投与し、その効果を明らかにする計画であった。その後、文献的に肺サーファクタント成分の検討を行ったところ、新規に人工調製サーファクタントを作成・検討しているグループ（長崎国際大学柴田攻先生・中原広道両先生）がいることが判った。このため、このグループにご相談しあがり、申請者の研究に新規人工調製サーファクタントを提供して頂けることになった。このため、インフルエンザ感染マウスへの既存の人工肺サーファクタント投与と、新規人工調製サーファクタント投与の比較を行った。その結果、既存の人工肺サーファクタントより優位な結果を得ることは出来なかった。その理由として、新規人工調製肺サーフ

ァクタントの調製方法に改善の余地があると考えられた。

(3) インフルエンザ感染マウスに既存の人工肺サーファクタントを投与する実験を行った結果、マウスの死亡し始める時期を遅らせることが出来た。しかし、最終的な死亡率はコントロールと同程度であり、人工肺サーファクタント投与による優位性を得ることは再現が出来なかった。種々の角度から原因究明を試みた結果、可能性として最も大きい原因は、動物飼育環境の清潔さの問題と考えられた。この点の改善の為に、動物実験施設の感染実験エリアの全てをホルマリン燻蒸する必要があり、当該施設の別のユーザーとの兼ね合いから実施することは不可能と判断された。

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 13 件)

1. Oda K, Matoba Y, Irie T, Kawabata R, Fukushi M, Sugiyama M, Sakaguchi T.; Structural basis of the inhibition of STAT1 activity by Sendai virus C protein.; Journal of Virology; 査読有; 89:11487-11499; 2015

2. Yoshida A, Kawabata R, Honda T, Tomonaga K, Sakaguchi T, Irie T.; IFN- γ -inducing, unusual viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA-type-dependent manner.; Frontiers in Microbiology; 査読有; 6:804; 2015

3. Sato Y, Morimoto K, Kubo T, Sakaguchi T, Nishizono A, Hirayama M, Hori K; Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Euclima serra* through the recognition of viral hemagglutinin.; Marine Drugs; 査読有; 13:3454-3465, 2015.

4. Latief M A, Chikama T, Ko J-A, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A.; Inactivation of acyclovir-sensitive and -resistant strains of herpes simplex virus-type 1 *in vitro* by photodynamic antimicrobial chemotherapy.; Molecular Vision; 査読有; 21:532-537, 2015.

5. Latief M A, Chikama T, Shibasaki M, Sasaki T, Ko J-A, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A.; Antimicrobial action from a novel porphyrin derivative in photodynamic antimicrobial chemotherapy *in vitro*.; Lasers Med. Sci.; 査読有; 30:383-387, 2015

6. 坂口剛正、上田恭子、川端涼子; 柿渋でウイルス対策 柿タンニンによる強力なウ

- ウイルス不活化作用；ニューフードインダストリー；査読無；56:17-24, 2014.
7. 坂口剛正；かなり強力！柿渋のウイルス退治効果；現代農業；査読無；8月, pp. 76-79, 2014.
8. 坂口剛正；柿タンニンによるノロウイルスなどの病原ウイルス不活化；果樹試験研究推進協議会会報；査読無；第32号, pp. 8-12, 2014.
9. Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y, Sakaguchi T; Sendai virus C proteins regulate viral genome and antigenome synthesis to dictate the negative genome polarity.; Journal of Virology; 査読有；88:690-698, 2014.
10. 坂口剛正；第28回中国四国ウイルス研究会；ウイルス；査読無；63: 249-252, 2013.
11. Irie T, Yoshida A, Sakaguchi T; Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization.; PLoS One; 査読有；8:e73740, 2013.
12. Yamaki M, Shinozaki K, Sakaguchi T, Meseck M, Ebert O, Ohdan H, Woo S L; The potential of recombinant vesicular stomatitis virus-mediated virotherapy against metastatic colon cancer.; International Journal of Molecular Medicine; 査読有；31, 299-306, 2013.
13. Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, Sakaguchi T; Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses.; PLoS One 査読有；8:e55343, 2013.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 福士雅也、大澤亮介、森脇昌哉、川上秀史、坂口剛正；筋萎縮性側索硬化症(ALS)原因遺伝子オプチニューリンとインターフェロン・ベータ発現；第40回日本分子生物学会年会；平成27年12月1日～4日；神戸
2. 福士雅也、川端涼子、坂口剛正；B型肝炎ウイルスP蛋白質による全般的な蛋白質合成阻害；第62回日本ウイルス学会学術集会；平成26年11月10日～12日；横浜
3. 福士雅也、山下誠、伊東干城、秋山徹、久保淑、山本健二、坂口剛正、工藤宏一郎；人工肺サーファクタントとラニナミビルの併用療法はインフルエンザ重症肺炎の致死率を低下させる；第28回中国四国ウイルス研究会；平成25年6月22日～23日；広島

〔図書〕(計 2 件)

1. 坂口剛正 第6章3節マイナス RNA ウィルス 病原微生物学 基礎と臨床 荒川直親、神谷茂、柳雄介編 pp.186-195. 2014年12月発行，東京化学同人 ISBN: 978-4-8079-0827-1.
2. 二川浩樹、坂口剛正；新しい固定化抗菌剤の開発とその抗菌・抗ウイルス作用・効果 抗菌・抗ウイルス材料の開発・評価と加工技術 第1章抗菌・抗ウイルス効果を持つ材料設計と高機能化 第19節 pp. 109-114, 2013年10月発行，株式会社技術情報協会、東京 ISBN-13: 978-4861044984.

〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/isaikin/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福士 雅也 (FUKUSHI MASAYA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号：50313515

(2)研究分担者

坂口 剛正 (SAKAGUCHI TAKEMASA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授
研究者番号：70196070