

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860058

研究課題名(和文) ウイルス性肺炎の発症メカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of lung inflammation induced by viral infection

研究代表者

宮内 浩典 (Miyuchi, Kosuke)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50619856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎はインフルエンザウイルス感染症における主要な死因の一つである。しかしインフルエンザウイルス肺炎の成立機序については不明な部分が多い。我々は通常アレルギー反応を引き起こす肥満細胞が、インフルエンザウイルス肺炎においても重要な役割を演じることを明らかとした。肥満細胞はインフルエンザウイルスの生体への侵入を検知し、呼吸器で分化、増殖する。肥満細胞は肺胞マクロファージの活性化を引き起こす。また、肥満細胞ではインフルエンザウイルスの感染性を上げるタンパク質が発現しており、肥満細胞が呼吸器で増加することでウイルス増殖が高進し、マクロファージの活性化と相まって肺炎を増悪していることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pneumonia is a one of the major cause of death in influenza virus infectious disease. However, how influenza virus infection cause lung inflammation is largely unclear. We revealed mast cells that are usually cause allergic reaction, are also involved in lung inflammation by influenza virus infection. Mast cells sense the virus invasion and migrate into respiratory tract. Mast cells activate lung residential macrophages during influenza virus infection. After virus infection, mast cells express virus activation proteases and produce high infectious viruses. These mast cell's behaviors exacerbate lung inflammation.

研究分野：感染免疫、ウイルス学

キーワード：ウイルス性肺炎 肥満細胞

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは有史以来もっとも多くの人々を死に至らしめたウイルスであり、その感染予防と急性感染期における症状軽減は重要な課題である。急性感染期における肺での過剰な炎症による肺機能の低下はインフルエンザウイルス感染症の主要な死因の一つである。経気道的に体内に侵入したインフルエンザウイルスは気道上皮細胞に感染する。感染細胞においてウイルス感染はTLRやRIG、Mxタンパク質などによって認識されIFN、TNF、などのサイトカインが分泌される。これらのサイトカインは近傍の細胞に作用し、多数の抗ウイルスタンパク質の発現を誘導し、インフルエンザウイルスの複製は制限される。さらにマクロファージや、ケモカインにより誘導された好中球によってウイルスは排除され、感染後期にはCTLにより感染細胞の排除が行われ感染は収束する。しかし、高病原性ウイルスに感染した場合や、ウイルス複製が著しい場合には、感染は収束せず、呼吸器官に深刻なダメージをもたらす。それは組織破壊が進行することにより過剰の炎症性サイトカインが放出され、それらのサイトカインによってさらなる炎症と組織破壊が誘発されるという負のスパイラルに陥るからであると考えられている。インフルエンザウイルス感染症において、過剰な炎症反応による呼吸器官の組織障害は、全身性のサイトカインストームと並ぶ死因のひとつである。しかし、一体どの細胞からどの程度のサイトカインが放出されれば、その病態に至るのか、どの程度の細胞が破壊されれば制御不能な炎症に陥るのか、またインフルエンザウイルス側の動態はどのように組織障害に影響するのか等、その詳細なthresholdや病態の成立メカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

肥満細胞は造血幹細胞由来の細胞でありI型アレルギー反応においては細胞表面に結合したIgE抗体の架橋によって活性化され、ヒスタミンやロイコトリエンをはじめとする種々のケミカルメディエーターを分泌することでアナフィラキシーを誘導する。近年、肥満細胞がRSV感染などの呼吸器症状を引き起こすウイルス感染においても重要な役割を担うことが明らかになってきている。我々はマウス個体から肥満細胞を除去する独自のシステムを用いて肥満細胞がインフルエンザウイルス感染時の炎症反応においても重要な役割を果たすことを突き止めた。本研究においては、インフルエンザウイルス感染による炎症反応の成立機序を解明するために、肥満細胞のウイルス急性感染期における

炎症反応への寄与とその炎症惹起メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究においてはインフルエンザウイルス感染が肥満細胞を活性化するメカニズムと肥満細胞の活性化が肺の炎症を引き起こすメカニズムの解明に焦点を絞って研究を行った。インフルエンザウイルスによる肥満細胞の活性化メカニズムとしてインフルエンザウイルスが直接肥満細胞に感染することで活性化される、または、インフルエンザウイルスが上皮細胞やマクロファージなどに感染することでサイトカインなどを放出し、それによって肥満細胞が活性化される。という2つの可能性が考えられる。前者の可能性を検討するためにまず、感染マウスにおける肥満細胞の動態を詳細に解析した。つぎに、感染マウスから肥満細胞をソーティングにより分離し、ウイルス核酸の検出を試みる。また分離した肥満細胞のトランスクリプトーム解析を行うことで、ウイルス感染によるmRNAの変化を網羅的に解析した。

また、後者の可能性を検討するためにIL-33の欠損マウスを用いる。近年の研究よりネクロシスした上皮細胞などから放出されるIL-33が免疫細胞の動員や炎症の成立に重要な役割を演じていることが明らかとなってきた。インフルエンザウイルス感染においてもウイルス感染上皮細胞からIL-33の放出が増強することが知られている。肥満細胞にはIL-33の受容体が発現しており、肥満細胞がウイルス感染上皮細胞からのIL-33によって活性化されている可能性は十分考えられる。これについて検証するため、IL-33欠損マウスにインフルエンザウイルスを感染させ肥満細胞の活性化や肺の炎症反応に与える影響を解析した。

次に、肥満細胞の活性化が肺の炎症を引き起こすメカニズムについて検討するため、肥満細胞除去マウスにインフルエンザウイルスを感染させ、肺に浸潤してくる自然免疫担当細胞や組織障害性細胞をフローサイトメーターにより解析した。つづいて、それらの細胞をソーティングにより分取し、トランスクリプトーム解析を行った。肥満細胞除去マウスと野生型マウスでのウイルス感染認識関連遺伝子や、サイトカイン、ケモカイン発現パターンを網羅的に比較解析することにより、肥満細胞が無いことによって、どの細胞のどのパスウェイにもっとも影響が出るのかを明らかとした。これらの一連の実験から、肥満細胞がインフルエンザウイルスによる肺炎の成立にどのように関わっているのか、そのメカニズムを解明した。

4. 研究成果

(1)我々は肥満細胞 (Mast cell) のインフルエンザウイルス肺炎における役割について検討するため、ジフテリアトキシン投与により肥満細胞を除去できる Mas-TRECK マウスを用いて感染実験を行った。野生型 (WT) のマウスではインフルエンザウイルス感染後に肺間質への出血を伴う炎症が認められたが、肥満細胞を除去したマウスでは肺炎が顕著に減弱していた (図1)。しかし、好塩基球を特異的に除去する Bas-TRECK マウスでは肺炎の低減は認められなかった。

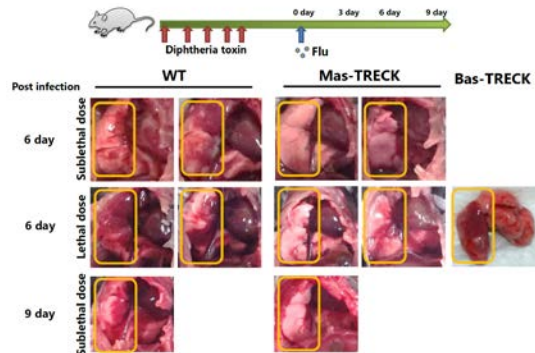


図1. 肥満細胞はインフルエンザウイルスによる肺炎症に参与する

(2)次にどのようにして肥満細胞がインフルエンザウイルスによる肺炎症を引き起こすのかを調べるため、感染マウスにおける肥満細胞の動態を調べた。その結果インフルエンザウイルスに感染したマウスでは気道 (Trachea) と肺 (Lung) での肥満細胞数の増加が認められた。

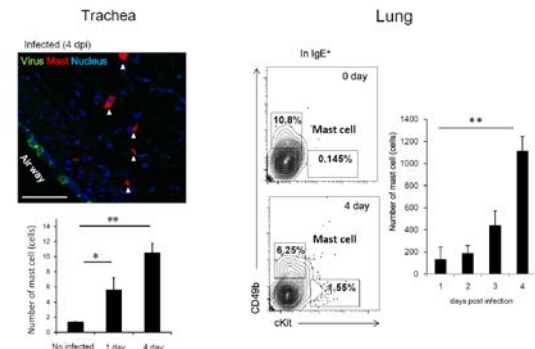


図2. インフルエンザウイルス感染マウスの呼吸器官での肥満細胞増殖

(3)インフルエンザウイルス感染に伴って肥満細胞が呼吸器官に動員されるためには、ウイルス感染を察知する何らかのシステムが必要である。IL-33 分子はさまざまな細胞から、細胞傷害時に放出され、近辺の自然免疫担当細胞上のレセプターに結合し、それらの細胞を活性化することが知られている。インフルエンザウイルス感染時においても感染の主な標的細胞の一つである上皮細胞から IL-33 が放出されることが明らかとなっている。また肥満細胞には IL-33 レセプターである ST1 分子が発現していることから、ウイルス感染によって上皮から放出された IL-33 分

子が肥満細胞を活性化し、肺炎症を引き起こすというスキームが考えられる。そこで我々は IL-33 欠損マウスを用いてインフルエンザウイルスの感染実験を行った。驚いたことに IL-33 欠損マウスではインフルエンザウイルス感染時での炎症性サイトカインの発現が野生型マウスに比較して増強し、肺炎症が増悪することにより、マウスの生存率が低下することが明らかとなった (図3)。

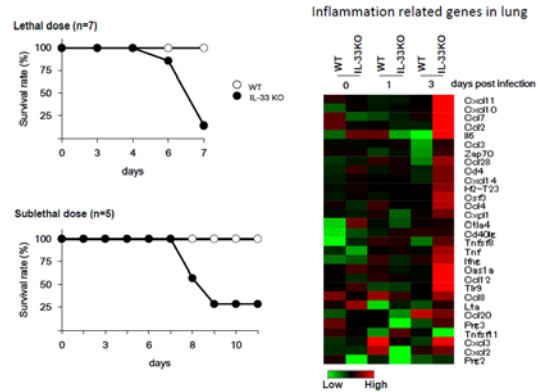


図3. IL-33 欠損マウスにおける生存率の低下

IL-33 欠損によって、肺炎症は増強されるメカニズムであるが、肺洗浄液中のサイトカイン濃度を測ったところ、好酸球を誘導するケモカインである Eotaxin と IL-5 が IL-33 欠損マウスでは著しく低下していた。実際 IL-33 欠損マウスでは肺の好酸球数が低下している。好酸球は肺において好中球とバランスをとって存在することが知られており、好酸球が減ると好中球が増加する。IL-33 欠損マウスでは肺の好中球は実際に増加している。好中球はインフルエンザウイルス感染時に活性化し肺の組織障害を引き起こすことが知られており、定常状態において好中球が多い、IL-33 欠損マウスではインフルエンザウイルス感染時に激しい肺組織の障害が起こり、死に至るものと考えられる。いずれにしろ、IL-33 により肥満細胞が活性化されて肺炎症を引き起こすというスキームは否定されたため、次に肥満細胞が直接ウイルス感染を検出している可能性について検討を行った。

(4)インフルエンザウイルス感染による肥満細胞の活性化機構を解明するため、インフルエンザウイルス感染マウスより肥満細胞をソートし、ウイルス RNA と肥満細胞の活性化マーカー遺伝子の発現を解析した。その結果、ウイルス RNA が肥満細胞においても認められた。さらに組織染色により、インフルエンザタンパク質が肺の肥満細胞において検出された (図4)。感染後、3日目において多くの肥満細胞活性化マーカー遺伝子の発現が増加していた (図4)。これらのことから、少なくとも一部の肥満細胞はインフルエンザウイルスの直接の標的となり、感染によって活性化することが明らかとなった。

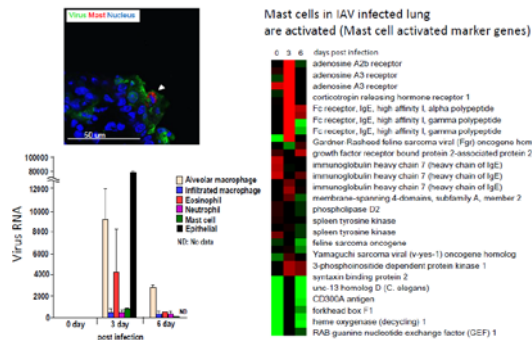


図4. インフルエンザウイルス感染による肥満細胞の活性化

(5) 次に、肺障害の成立機序についての検討を行った。インフルエンザウイルス感染症では好中球や浸潤性マクロファージ、細胞障害性T細胞などが、組織障害に関与するとされている。インフルエンザウイルス感染により動員活性化された肥満細胞がこれらの細胞を誘導することにより、肺炎を引き起こす可能性が考えられるため、肥満細胞を除去したマウスでインフルエンザウイルス肺炎時における肺への細胞浸潤を解析した。その結果、出血の結果である赤血球数は肥満細胞の除去により低下したが、マクロファージや、好酸球、好中球、CD4T細胞数には変化が認められなかった。

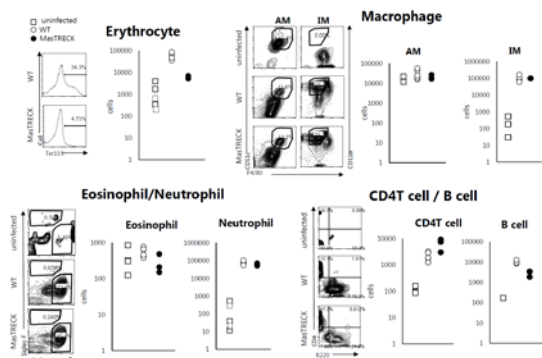


図5. 肥満細胞除去の肺への細胞浸潤における影響

(6) 肥満細胞の除去により肺炎症に関与する好中球やマクロファージの肺での細胞数に大きな変化がなかったため、つぎにこれらの細胞をソートして、その活性化状態をトランスクリプトーム解析によって調べた。ウイルス感染認識や感染応答に関連する遺伝子群に焦点を絞って解析を行い、これらの遺伝子の感染後の継時的な発現変化に従ってクラスター解析を行った。クラスター1は感染後上昇する遺伝子を、クラスター2は一度上昇してから発現が低下する遺伝子を、クラスター3は発現が感染に伴って下がっていく遺伝子を、クラスター4は一度発現が下がってから後半でまた上昇してくる遺伝子を示している。野生型マウスでは感染後3日目、および6日目において肺胞マクロファージの顕著な活性化が認められるが、肥満細胞を除

去したマウスでは6日目における肺胞マクロファージの活性化が抑制されていた(図6)。このことから肥満細胞の除去によって、とくに感染後期におけるマクロファージでのウイルス認識が低下していることが示唆された。

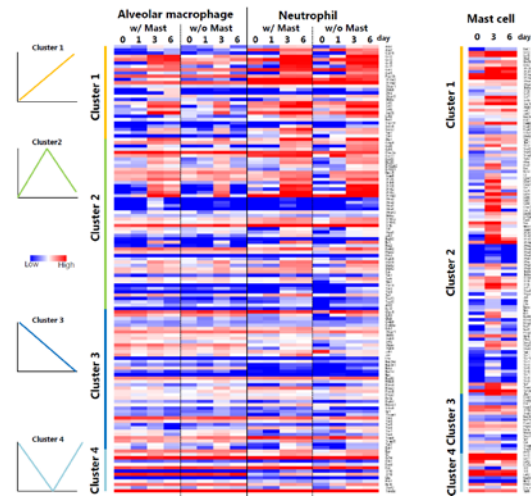


図6. 肥満細胞除去マウスを用いた肺細胞のトランスクリプトーム解析

(7) 感染後6日目において肺胞マクロファージの活性化が低下していたため、このタイミングにおけるウイルス動態に野生型マウスと肥満細胞除去マウスで変化があることを予想し、完成後6日目の肺のウイルス量を測定した。0.03 LD₅₀のインフルエンザウイルスを経鼻投与した野生型マウスの肺の感染6日目のウイルス量は約4000 TCID₅₀であったが、肥満細胞を除去したマウスの感染6日目の肺ではウイルス量は1000 TCID₅₀以下に低下していた。また肺洗浄液中のウイルスNPタンパク質の濃度も肥満細胞を除去したマウスでは低下しており、肥満細胞を除去することで感染後期の肺中のウイルス量が低下する可能性が示唆された。

(8) 肥満細胞の除去によってウイルス量が低下することから、感染時に肥満細胞がウイルス増殖をサポートしている可能性が考えられる。そのメカニズムについて明らかにするために、インフルエンザ感染マウスより肥満細胞をソートしトランスクリプトーム解析を行った(図6)。インフルエンザウイルスのHAはウイルスの細胞侵入の際に膜融合を引き起こすウイルスタンパク質であり、ウイルス感染にとって必須である。HAタンパク質はHA1とHA2からなるが、これらはHA0と呼ばれるプレカーサーの形で合成される。HA0は細胞内で小胞体からゴルジ体に輸送される過程で、細胞のプロテアーゼによってHA1とHA2に切断され、膜融合能を有する成熟したHAタンパク質となる。近年の研究から生体内ではTMPRSSファミリーに属するTMPRSS2とTMPRSS4が、H1N1インフルエンザ

ウイルス HA0 の切断に寄与することが明らかとなつて来ている。インフルエンザウイルス感染マウスの肥満細胞では、感染後3日目において多くのウイルス感染認識に関与する遺伝子の活性化が認められた(図6)。我々はこのタイミングにおいて TMPRSS ファミリー遺伝子の発現を解析した。その結果、感染後3日目のマウスからソートした肥満細胞において TMPRSS2 と TMPRSS4 の顕著な発現上昇が認められた(図7)。一方、マクロファージや好中球などにおいては感染によるこれらのプロテアーゼの発現上昇は認められなかった(図7)。これらのことからインフルエンザウイルス HA は肥満細胞によって合成される TMPRSS2 と TMPRSS4 によって活性化されている可能性が示唆された。

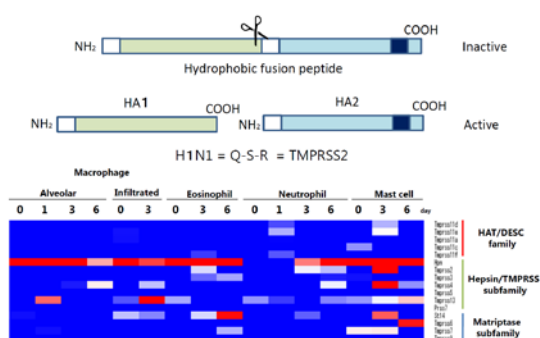


図7. インフルエンザウイルス感染マウス肺細胞における TMPRSS ファミリー遺伝子の発現解析

(9) 本研究から肥満細胞がインフルエンザウイルス感染肺における炎症の成立において重要な役割を演じることが明らかとなった。そのメカニズムの一つとして、感染初期においてはウイルスの侵入により活性化し、気道および肺で分化、増殖することであり、その後肥満細胞自身が感染し TMPRSS2 と TMPRSS4 の発現が上昇することにより、感染性の高いインフルエンザウイルスを産生することで、ウイルス性肺炎を増悪させている可能性が考えられる。

肥満細胞を除去したマウスでは、インフルエンザウイルス感染初期から後期にわたって肺炎はほとんど見られない。このことは肥満細胞が感染後期においてウイルスの増殖をサポートする以外にも、肺炎を引き起こす機構が存在することを示唆している。その一部はマクロファージなどの細胞の活性化に関連していると考えられるが、今後は、肥満細胞自身が、直接的に組織障害に関与している可能性も含めたさらなる研究が必要であると思われる。

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)

[学会発表] (計 3件)

①MIYAUCHI Kosuke, KUBO Masato

第24回KTCC学術集会

Nasal vaccine with live influenza virus specifically induce Bcl-6 independent and IFN-g-dependent IgA response in the lung
2015年5月15~16日 京都大学芝蘭会館(京都府)

②MIYAUCHI Kosuke, SUGIMOTO-ISHIGE Akiko,

YAKAHASHI Yoshimasa, HASEGAWA Hideki,

TAKEMORI Toshitada, KUBO Masato

第43回日本免疫学会学術集会

2014年12月10~12日 京都国際会議場(京都府)

③宮内浩典 第24回KTCC学術集会

The role of IFN γ producing Th cells in protective humoral immune responses against influenza virus infection

2014年5月16~17日 京都平安ホテル(京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 浩典 (MIYAUCHI, Kosuke)

理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50619856