

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860296

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染に対する新たな治療戦略樹立を目指したメカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of new therapeutic target against influenza virus infection

研究代表者

伊藤 利洋 (ITO, TOSHIHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00595712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス感染症は二次感染を併発すると死亡率は飛躍的に上昇する。そこで二次性細菌性肺炎の感受性を規程する因子を明らかにする事を目指して研究を行った。インフルエンザウイルスによりH3K9のメチル化(転写抑制)を誘導する酵素の一つであるSET domain, bifurcated 2 (SETDB2)の有意な上昇を認めた。SETDB2はTNFのシグナル伝達におけるTRAF2ならびに、気道上皮から産生され肺の修復や恒常性の維持に重要なAmphiregulinを制御することが示唆された。今後インフルエンザウイルス感染症に対する分子基盤解明に基づく新規予防・治療法開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus causes acute respiratory infections that induce annual epidemics and occasional pandemics. Especially, the main cause of death in influenza viral infection is secondary bacterial pneumonia. Both bronchial epithelial cells and macrophages upregulated SET domain, bifurcated 2 (SETDB2) expression following influenza virus H1N1 infection. SETDB2 is a histone methyltransferase that methylates Lys-9 of histone H3 (H3K9), which is correlated with repression of transcription. SETDB2 expression is dependent on RIG-I induced type-I IFN pathway. Moreover, SETDB2 regulates TRAF2, an adaptor molecule of TNF signaling, and amphiregulin, which plays a critical role for promoting the restoration of airway epithelial integrity and lung tissue homeostasis. These findings indicate that SETDB2 regulation might be one of the critical therapeutic target for influenza virus infection and secondary bacterial pneumonia.

研究分野：感染免疫

キーワード：エピジェネティクス インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザウイルス感染症は、毎年継続して感染流行を起こし、社会活動にも大きな影響を与えている。さらに数年から数十年ごとに新型のヒトインフルエンザの出現とその新型ウイルスのパンデミックが起こっており、2009 年にも新型インフルエンザ (H1N1) が発生し、世界中で猛威を振ったのは我々の記憶に新しい。インフルエンザウイルス感染単独による死亡率は低いが、インフルエンザウイルス感染症は細菌性肺炎などの二次感染の危険性を高め、二次感染を併発すると死亡率は飛躍的に上昇する。

(2) ウィルスおよび細菌感染時に初期生体防御に重要な役割を果たすのは、気道上皮細胞ならびに自然免疫を担うマクロファージである。気道上皮細胞やマクロファージはウィルス感染に対して自ら Type I Interferon (IFN-I) を産生し、オートクリンに自らを刺激し抗ウィルス作用を発揮することが知られている。申請者の平成 23-24 年度の当該研究助成において、マイクロアレイシステムを用いた解析にて、IFN-I またはインフルエンザウイルスの刺激を受けた気道上皮細胞ならびにマクロファージは H3K9 のメチル化 (転写抑制) を誘導する酵素の一つである SET domain, bifurcated 2 (SETDB2) の有意な上昇を見出した (図 1)。そこで申請者は、インフルエンザウイルス感染時に必要な気道上皮細胞やマクロファージがヒストン化学修飾を受け、細菌感染時に生体防御に必要なサイトカインの産生やクリアランスに関わる因子の転写制御が抑制されるのではないか、という着想するに至った。

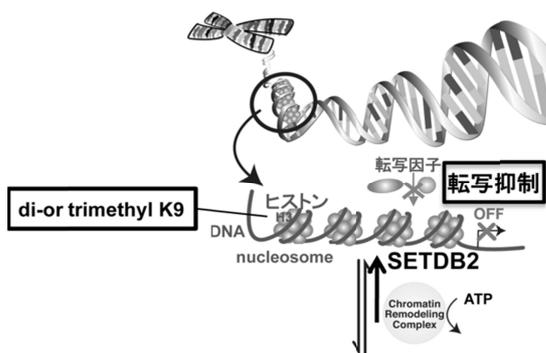


図 1 : SETDB2 によるヒストン化学修飾

インフルエンザウイルス刺激により H3K9 のメチル化 (転写抑制) に寄与する SETDB2 の有意な上昇を認めた。このことは SETDB2 がインフルエンザ感染後の二次感染に対して起こるべき免疫発動が抑制されていることを示唆する。

2. 研究の目的

エピジェネティクスは、細胞のアイデンティティ維持に関する仕組みとして、その異常はがん化に深く関与することから、世界的にもがん領域では活発に研究が行われてきて

いる。さらには従来エピジェネティクスの関与があまり考えられていなかった免疫の分野でもエピジェネティクスが関与することが明らかになってきた。そこで本研究はエピジェネティクスの観点から二次性細菌性肺炎の感受性を規程する因子を明らかにする事を目的とし、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス感染に伴うヒストン化学修飾による気道上皮細胞・マクロファージの生体機能ならびに SETDB2 の発現機構を解析した。

(2) インフルエンザウイルス肺炎死亡例の剖検肺組織でのヒストン化学修飾解析を行った。

(3) インフルエンザウイルス感染に併発する二次感染モデルの病態を明らかにし、予防ならびに治療の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) SETDB2 の発現機構解析

気道上皮細胞株 (MLE-12) ならびにマクロファージ株 (RAW264.7) ではインフルエンザ刺激によって産生される Type-I interferon (IFN-I) 濃度依存性に SETDB2 の発現が誘導され、インフルエンザ感染モデルマウスにおいてもインフルエンザウイルス感染により SETDB2 の遺伝子発現が亢進される一方、IFN-I のレセプター欠損マウス (IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup>) やインフルエンザウイルス感染において IFN-I 産生に必要な役割を果たす RIG-I like receptor の中枢を担う IPS-1 (interferon-beta promoter stimulator 1) 欠損マウス (IPS-1<sup>-/-</sup>) では SETDB2 の誘導が見られず、SETDB2 の発現は RIG-I like receptor を介して産生される IFN-I 依存性である事が証明された。さらに MLE-12 細胞を用いて、siRNA システムにより SETDB2 をノックダウンすると、TNF レセプターの中枢を担う TRAF2 の発現が有意に亢進しており、インフルエンザウイルス単独感染モデルにおいても TNF- $\alpha$  の投与により致死率が上昇することから、SETDB2 はインフルエンザウイルス単独感染においては、TNF- $\alpha$  を介したシグナル伝達を制御する可能性が示唆された。

(2) インフルエンザウイルス肺炎死亡例の剖検肺組織での SETDB2 の発現解析

インフルエンザウイルス肺炎死亡例の剖検肺組織における SETDB2 の遺伝子発現を検討したところ、健常肺と比較し SETDB2 の有意な上昇を認めた (図 2)。また免疫組織化学染色では、健常肺と比較してインフルエンザウイルス肺炎死亡例の剖検肺組織における気道上皮細胞やマクロファージに SETDB2 ならびに H3K9me の発現亢進が見られた。

### (3) 二次性細菌性肺炎モデルマウスにおける解析

インフルエンザウイルス感染後5日後に肺炎球菌を経気道感染させることにより作成した二次性細菌性肺炎モデルにおいて、SETDB2が誘導されないIFN $\alpha$ R-KOマウスでは野生型(Wild-type; WT)マウスと比較して生存率の有意な改善が見られることを報告していたが、WTマウスとIFN $\alpha$ R-KOマウスの病態の更なる解析を行うと、IFN $\alpha$ R-KOマウスではWTマウスと比較して炎症細胞浸潤を伴った組織ダメージの軽減や、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-12p40)・ケモカイン(CXCL1, CCL2)の有意な低下が見られた。またIFN $\alpha$ R-KOマウスでは、上皮成長因子の一種であり、気道感染時に保護的な役割を有するAmphiregulin (Nature Immunology Vol.12, p1045, 2011 参照)の有意な上昇を認めた(図2)。

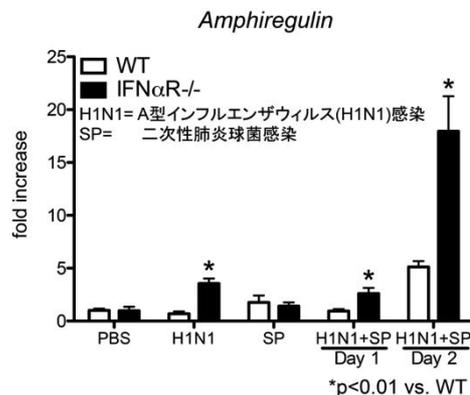


図2: 二次性細菌性肺炎モデルにおけるAmphiregulinの発現

IFN- $\alpha$ R KOマウスでは、二次性細菌性肺炎モデルにおいて、野生型マウス(WT)と比較して有意な生存率の改善を認め、気道感染時に保護的な役割を有するAmphiregulinの有意な上昇を認めた。

さらに再度、気道上皮細胞株(MLE-12)にSETDB2をsiRNAでノックダウンを行い、インフルエンザウイルス(H1N1)やtype-I IFNで刺激すると、SETDB2をノックダウンすることによりTRAF2だけではなく、Amphiregulinの有意な発現上昇が見られ、SETDB2がAmphiregulinの発現を制御している事が示唆され、AmphiregulinやTRAF2遺伝子のプロモーター領域のH3K9のメチル化の関与につき、クロマチン免疫沈降法により検討中である。

本研究にて、インフルエンザウイルス感染によるSETDB2が気道感染において保護的な役割を担うAmphiregulinを制御することにより、二次性細菌性肺炎に対する感受性を規程する因子となりうる事が示唆され、本研究の成果は、インフルエンザウイルス感染症ならびに併発する二次性細菌性肺炎に対する分子基盤解明に基づく新規予防・治療法開

発への貢献が期待される。

### 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)

[雑誌論文](計11件)

Schaller M, Ito T, Allen RM, Kroetz D, Kittan N, Ptaschinski C, Cavassani K, Carson WF, Godessart N, Grembecka J, Cierpicki T, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of IL-12 dependent T cell proliferation. Journal of Leukocyte Biology, 査読有、2015 (In press)

Xu Y, Ito T, Fushimi S, Takahashi S, Itakura J, Kimura R, Sato M, Mino M, Yoshimura A, Matsukawa A. Spred-2 deficiency exacerbates LPS-induced acute lung inflammation in mice. PLoS One, 査読有、9, 2014, e108914 DOI: 10.1371/journal.pone.0108914

Liu T, Yu H, Ullenbruch M, Jin H, Ito T, Wu Z, Liu J, Phan SH. The in vivo fibrotic role of FIZZ1 in pulmonary fibrosis. PLoS One, 査読有、9, 2014, e88362 DOI: 10.1371/journal.pone.0088362

Takeuchi M, Sato Y, Ohno K, Tanaka S, Takata K, Gion Y, Orita Y, Ito T, Tachibana T, Yoshino T. T helper 2 and regulatory T-cell cytokine production by mast cells: a key factor in the pathogenesis of IgG4-related disease. Modern Pathology, 査読有、27, 2014, 1126-1136 DOI: 10.1038/modpathol.2013.236

Hanakawa H, Orita Y, Sato Y, Takeuchi M, Ohno K, Gion Y, Tsukahara K, Tamamura R, Ito T, Nagatsuka H, Nishizaki K, Yoshino T. Regulatory T-cell infiltration in tongue squamous cell carcinoma. Acta Oto-Laryngologica, 査読有、134, 2014, 859-864 DOI: 10.3109/00016489.2014.918279

松川 昭博、伊藤 利洋、Ras-Raf-ERK 経路からみたA型インフルエンザ(H1N1)感染、NEUROINFECTION、査読無、Vol. 19、2014、pp. 40-42 <http://www.neuroinfection.jp/neuroinfection.html>

高橋索真、平岡佐規子、伏見聡一郎、伊藤利洋、板倉淳哉、木村亮二郎、揚旭、篠倉美理、中川裕貴、住居優一、竹井大介、井口俊博、半井明日香、森藤由記、秋田光洋、

原田馨太、岡田裕之、松川昭博、山本和秀、Ras/ERK系と大腸粘膜治癒 Ras/ERK系の阻害因子 Spred-2の解析を通じて、消化器と免疫、査読無、Vol. 50、2014、pp. 66-68、

Saito F, Ito T, Connett JM, Schaller MA, Carson WF 4th, Hogaboam CM, Rochford R, Kunkel SL. MHV68 Latency Modulates the Host Immune Response to Influenza A Virus. *Inflammation*, 査読有、36, 2013, 1295-1303  
DOI: 10.1007/s10753-013-9668-1

Hanakawa H, Orita Y, Sato Y, Takeuchi M, Ohno K, Iwaki N, Ito T, Nishizaki K, Yoshino T. Cutting needle biopsy combined with immunohistochemical study of myeloperoxidase for the diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Acta Oto-Laryngologica*, 査読有、133, 2013, 1328-1332  
DOI: 10.3109/00016489.2013.824112

Cavassani KA, Moreira AP, Habieli D, Ito T, Coelho AL, Allen RM, Hu B, Raphelson J, Carson WF 4th, Schaller MA, Lukacs NW, Omary MB, Hogaboam CM, Kunkel SL. Toll like receptor 3 plays a critical role in the progression and severity of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *PLoS One*, 査読有、8, 2013, e65899  
DOI: 10.1371/journal.pone.0065899

Yoshimura T, Howard OM, Ito T, Kuwabara M, Matsukawa A, Chen K, Liu Y, Liu M, Oppenheim JJ, Wang JM. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. *PLoS One*, 査読有、8, 2013, e58791  
DOI: 10.1371/journal.pone.0058791

[学会発表](計4件)

Toshihiro Ito, Steven L. Kunkel, Akihiro Matsukawa. The critical role of epigenetic regulation against secondary bacterial pneumonia following influenza virus infection. The 13<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 2014年9月23日～9月26日、奈良県新公会堂(奈良市)

伊藤 利洋、板倉 淳哉、河原 明奈、小田 晋輔、伏見 聡一郎、松川 昭博、インフルエンザウイルス(H1N1)感染症ならびに二次性細菌性肺炎のエピジェネティクス解析、第103回日本病理学会総会、2014年4月24日～26日、広島国際会議場(広島市)

Toshihiro Ito, Steven L. Kunkel, Akihiro Matsukawa. Epigenetic regulation of secondary bacterial pneumonia following influenza virus infection. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月11日～13日、幕張メッセ(千葉市)

Toshihiro Ito, Akihiko Yoshimura, Akihiro Matsukawa. Spred-2 deficiency exacerbates Influenza A Virus (H1N1)-induced Pneumonia. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2013年8月22日～27日、Milano Congressi, Milan(イタリア)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.naramed-u.ac.jp/~immuno/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 利洋 (ITO, Toshihiro)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00595712