

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460929

研究課題名(和文) 麻黄湯によるオートファジー機能強化を介したウイルス感染防御

研究課題名(英文) Defense system against viral infection by maoto through the enhancement of autophagy

研究代表者

鍋島 茂樹 (Nabeshima, Shigeki)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：50304796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、麻黄湯による宿主のオートファジー機構強化を介したインフルエンザウイルスに対する感染防御メカニズムを明らかにすることを目的とした。実験的にインフルエンザを感染させた細胞株にて、オートファジーの成熟阻害と細胞のアポトーシスが起ることがわかった。麻黄湯はオートファジー機能を正常化し、アポトーシスを阻害することがわかった。また、同時に麻黄湯は感染細胞が産生するIL-1、IL-6などの炎症性サイトカインの産生を抑制する作用があることがわかった。さらに、麻黄湯はエンドゾームの酸性化を抑え、インフルエンザの脱核を阻害することがわかった。

研究成果の概要(英文)：This study was objected to clarify the anti-virus mechanism of maoto, the Traditional Japanese herbal medicine, through autophagy. In vitro study of influenza virus infection showed that influenza caused the disfunction of autophagy and induced apoptosis. Maoto cancelled these disfunction of infected cells. Taken together, maoto strongly reduced the inflammatory cytokines, such as IL1 beta and IL-6 induced by infection through normalizing the autophagy. We also found that maoto inhibited the uncoating of influenza virus by inhibiting the acidification of endosomes, resulting in the blocking of influenza virus infection.

研究分野：感染症

キーワード：インフルエンザ 麻黄湯 オートファジー 炎症性サイトカイン アポトーシス エンドゾーム

1. 研究開始当初の背景

平成 24 年度の基盤研究 C に採択されたこれまでの研究で、*in vitro* で麻黄湯がインフルエンザウイルスの増殖を阻害すること、オートファジー成熟が阻害され、それを麻黄湯がキャンセルすることがわかっていました。

2. 研究の目的

本研究では、漢方薬の麻黄湯が細胞のオートファジーがインフルエンザ感染防御に何らかの影響を与えているかどうかを探索する。加えて、エンドゾームやアポトーシスに与える影響も解析する。

3. 研究の方法

A549 細胞培養液中にインフルエンザ・ウイルスと麻黄湯を添加し、感染性ウイルスと細胞内のウイルス RNA を PCR で定量する。アポトーシスに関しては、DNA ラダー法で、エンドゾーム酸性化やウイルス粒子 (HI) は蛍光顕微鏡により解析する。

4. 研究成果

また、インフルエンザウイルスは宿主の細胞にアポトーシスを誘導すること、このとき、麻黄湯によりオートファジーを正常化させると、細胞のアポトーシスが抑制されることがわかった (図 1)。オートファジー欠損細胞株において同様の実験を行うと、麻黄湯によるアポトーシス抑制はキャンセルされることがわかった。

非感染のマクロファージ系細胞株に麻黄湯を添加すると、TNF、IL-6、pro IL-1beta、IFN-beta が抑制されることがわかった (図 2)。麻黄湯は、抗インフルエンザ作用だけでなく、抗炎症性サイトカイン作用を有すると考えられた。

麻黄湯の抗インフルエンザ作用が、細胞にウイルスを添加した直後におこることがわかり、麻黄湯がインフルエンザウイルス生活環のごく初期に作用していることが示唆されていたが、平成 29 年度はそのメカニズムとして、エンドゾーム酸性化の抑制することにより、ウイルスが脱核できないためであることが証明された (図 3)。つまり、麻黄湯を作用させると、ウイルスが脱核できず、エンドゾーム内に長期間残っていることが蛍光顕微鏡により確かめられた (図 4)。この結果は論文化し、Evidence-based Complementary and Alternative Medicine に掲載された。

平成 29 年度はそのメカニズムとしてエンドゾーム膜内の Vacuolar-type ATPase の活性を阻害していることを考えて実験を行ったが、はっきりした結果を得ることができなかった。さらに、エンドゾーム内に残ったウイルスがその後になくなるかをということに対して解析した。最も考えられる可能性としてエンドゾームがエキソゾームとなって細胞外に排出されるかどうかを解析したが、これに関しては否定的であった。

以上のことより、麻黄湯は *in vitro* において、オートファジー機能の正常化させることにより、感染細胞のアポトーシスを抑制すること、また感染ごく早期に、エンドゾームの酸性化を抑制し、ウイルスが脱核する過程を抑制し、ウイルス感染防御をおこなうことが証明された。

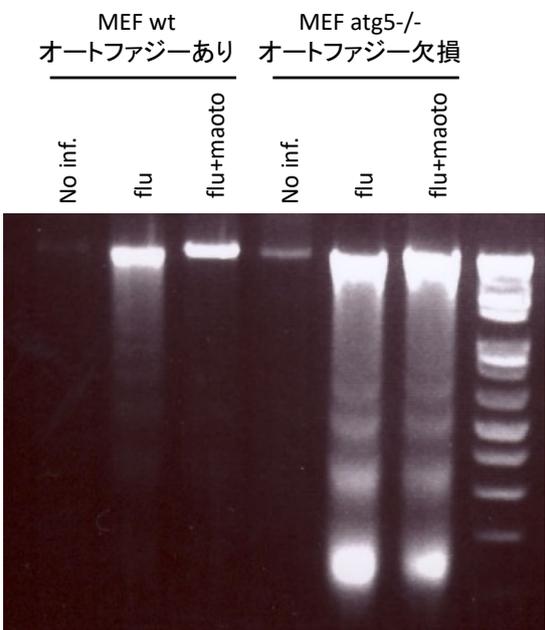


図 1 麻黄湯による、インフルエンザ誘導性アポトーシスの阻害。

MEF: 細胞株
Flu: インフルエンザ
maoto: 麻黄湯
細胞のアポトーシスを DNA ラダーにて解析した。

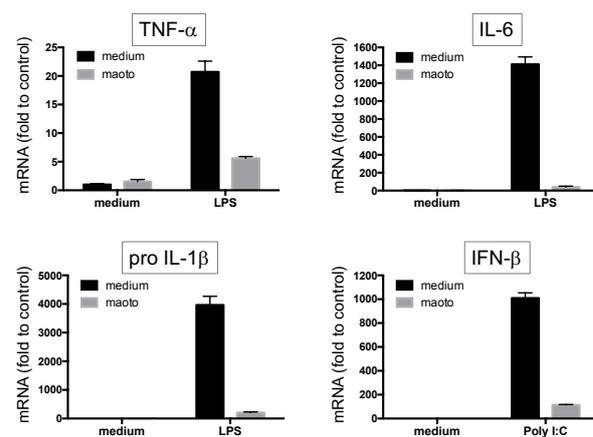


図 2 麻黄湯による炎症性サイトカインの抑制
マクロファージ系細胞株において、LPS または Poly I:C を添加して炎症性サイトカインの mRNA を測定した。

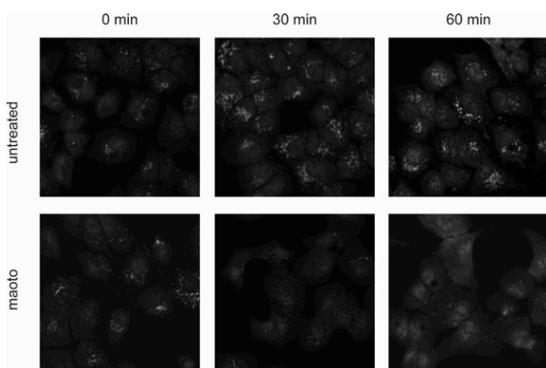


図3
麻黄湯によるエンドゾームの酸性化抑制
上段は麻黄湯なし、下段は麻黄湯あり。左から感染0分、30分、60分。白いドットが酸性化したエンドゾームやライソゾームを示す。

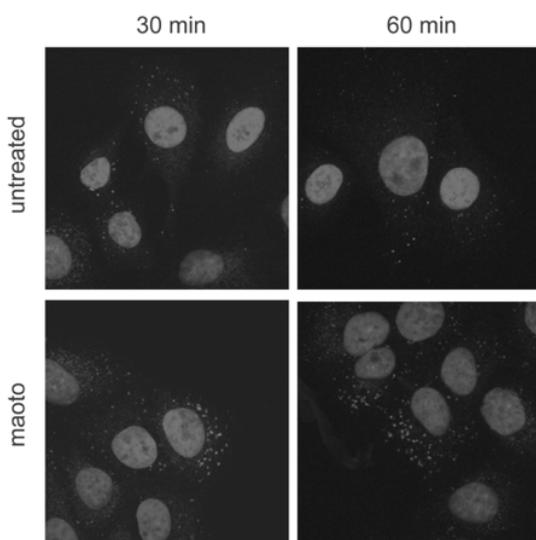


図4 麻黄湯（下段）の作用により、エンドゾーム内に残存しているウイルス分子（細胞質内の白いドット（HI 蛋白））。

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1件)

1. Masui S, Nabeshima S, Ajisaka K, Yamauchi K, Itoh R, Ishii K, Soejima T, Hiromatsu, K. Maoto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, inhibits Uncoating of Influenza Virus.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017 ID 1062065; 1-12.

〔学会発表〕(計6件)

- 鍋島茂樹. 漢方医学とサイエンス. 日本耳鼻咽喉科学会福岡県地方部会 (2017-12-2 福岡)
- 増井信太、鰐坂和彦、鍋島茂樹. 麻黄湯によるインフルエンザウイルス脱核阻害作用. 第34回日本和漢医薬学会 (2017-8-26 福岡)
- 鍋島茂樹. 感染症と漢方. 第68回日本東洋医学会総会シンポジウム (2017-6-3 名古屋)
- 鍋島茂樹. インフルエンザと麻黄湯. 第67回日本東洋医学会総会シンポジウム (2016-6-4 高松)
- 増井信太、鰐坂和彦、鍋島茂樹. 麻黄湯によるインフルエンザ感染防御機構の解析. 第90回日本感染症学会総会 (2016-4-15 仙台)
- 鍋島茂樹、増井信太、山内佳. 麻黄湯による Endocytic pathway を介したインフルエンザ感染防御. 第62回日本ウイルス学会 (2014-11-12 横浜)

〔図書〕(計6件)

- インフルエンザ診療ガイド 2016-17 (分担)
- プライマリケアのためのインフルエンザ診療 2016-2017 (分担)
- インフルエンザ診療ガイド 2015-16 (分担)
- プライマリケアのためのインフルエンザ診療 2015-2016 (分担)
- インフルエンザ診療ガイド 2014-15 (分担)
- プライマリケアのためのインフルエンザ診療 2014-2015 (分担)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
福岡大学・医学部・教授
鍋島 茂樹 (NABESHIMA, Shigeki)
研究者番号：50304796

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし

[その他]
ホームページ等
なし