

インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との 相互作用の機序と呼吸器疾患重症化の病態の解明

山本樹生¹⁾, 黒田和道¹⁾

Study on the mechanism of exaggeration by both influenza virus and oral/respiratory tract bacteria and the pathogenesis of exaggeration for respiratory disease

Tatsuo YAMAMOTO¹⁾, Kazumichi KURODA¹⁾

要旨

2010年より開始された本プロジェクトも5年目の最後の年を迎えた。インフルエンザの脅威は、2009年のブタ由来新型インフルエンザによるパンデミック以降も、収まっていない。昨年に中国から報告されたH7N9鳥インフルエンザウイルスの人への感染は、一時収まるかと思われたが、再度患者の発生が見られた。今後の動向が気に掛かる。2003年からのH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの人への感染もいまだに収束していない。多くの研究者の努力にもかかわらず、次のパンデミックがどのインフルエンザウイルスにより引き起こされるかは、だれも予想できないままである。ただ、明らかながある。インフルエンザにより命を奪われる大半は高齢者であるということである。どのウイルスによる流行であろうとこのことは変わらない。このような状況下での本プロジェクト研究の重要性は明確であり、着実な成果を上げつつある。ここにこれまで得られた成果の概要をまとめた。

1. 研究プロジェクトの概要

インフルエンザは、高齢罹患患者において重症化率・致死率が著しく高まることが知られている。また、他の呼吸器疾患においても高齢は大きな危険因子である。高齢化社会を迎えている日本では、インフルエンザなどの呼吸器疾患に対する有効な対策の確立は喫緊の課題と考えられる。そこで、インフルエンザを中心に呼吸器疾患の病態悪化の機構を解明し、有効な対策を提案することが本プロジェクトの目的である。平成22年のプロジェクト開始から、既に4年が経過し、着実な成果が得られてきている。これまでの中心課題であった、インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌および体液中ウイルス感染阻害因子との相互作用の解明に加え、インフルエンザの危険因子としての妊娠の問題を解明するために、マウスをモデルとした研究が進められている。インフルエンザの流行を考えると、日本国内のみの流行動態だけでなく海外の状況にも注目する必要がある。

そのためには、海外とのネットワークの構築が必要であるが、海外で収集した臨床材料を用いた解析が進行中である。また、インフルエンザウイルスの感染機構をより詳細に理解するために、宿主因子とインフルエンザウイルス遺伝子産物との相互作用に注目した研究が成果を結びつつある。以下に、本プロジェクトにおいて現在進行中の研究の概要を報告する。

2. 研究プロジェクト遂行の概要・進捗状況

(a) インフルエンザと口腔細菌

本プロジェクト前半期における最重要課題は口腔・気道の細菌や体液中阻害因子がインフルエンザウイルス感染にどのような影響を与えるかを明らかにすることであった。既にその成果の一端は、まとめられ報告された(Nishikawa T, et al. (2012). Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor. PLoS

1) 日本大学医学部
山本樹生: yamamoto.tatsuo@nihon-u.ac.jp

One. 7 (9), e45371.)。この報告では、口腔細菌の産生するシアリダーゼが抗インフルエンザ薬（抗NA薬）の働きを阻害する可能性を示した。この成果を基に、細菌シアリダーゼがインフルエンザウイルス増殖に与える影響を検討した。種々の口腔細菌培養上清中のシアリダーゼ活性を測定したところ、歯垢中に検出される細菌である *Streptococcus ovaris* と *Streptococcus mitis* とに高い活性を示す株を見出した。これらの菌株培養上清をインフルエンザウイルス感染細胞に添加したところ、感染細胞上清中のウイルス量が増大することを見出した。さらに、インフルエンザウイルス感染巣の拡大が観察された。細菌が産生するシアリダーゼがインフルエンザウイルス感染を促進することが示された。この結果は、口腔ケアを行うことで、口腔内のシアリダーゼ産生細菌を減少させ、インフルエンザ発症を予防できる可能性を示している。口腔ケアが高齢者の肺炎の発生を抑制することが知られており、インフルエンザにおいても同様な効果が期待される。インフルエンザ重症化予防対策を考える上で示唆に富む結果である。

(b) 妊娠とインフルエンザ

2009年の新型H1N1インフルエンザウイルスによるパンデミックにおいて、妊娠がインフルエンザ重症化の危険因子として注目された。妊娠が危険因子となり得ることは、2009年パンデミック以前から指摘されてきたことであるが、このパンデミックの初期における米国での死亡例において、妊婦が多く含まれたことから特に注目された。実際、2009年パンデミックにおいて、インフルエンザによる妊婦の死亡率の上昇、未熟児や出生時低体重の発生率の上昇など、インフルエンザが妊婦に与える悪影響が報告されている (Memoli et al. (2013) *Influenza in pregnancy. Influenza and Other Respiratory Viruses* 7 (6), 1033-1039.)。少子化に直面する日本においては、妊婦の危険因子を減少させることは必須の課題であり、インフルエンザが妊婦に与える影響の詳細な解析が望まれる。妊娠がインフルエンザ重症化の危険因子であるとの報告はあるものの、それをもたらす機構の詳細については不明な点が多い。そこで本プロジェクトでは、妊娠マウスを用いたインフルエンザウイルス感染モデル系を確立し、インフルエ

ンザの妊娠への影響を解析することとした。インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおいて、ウイルス接種量は重要な因子である。大量に接種すれば、全てのマウスが死亡し、少なすぎれば感染そのものが成立しなくなる。検討の結果、 5×10^4 pfuをマウスに接種することで、死に至らずに、マウスの体重減少（インフルエンザウイルス感染進行の指標として用いられる）が観察された。そこで、この量を妊娠マウスに接種し、胎児への影響を検討した。非接種妊娠マウスと比較し、胎児の死亡、早期産の上昇などの異常は観察されなかった。しかしながら、胎児重量に関しては、非接種群に比べ50%程度の減少が観察された。ヒトにおいても、妊婦のインフルエンザウイルス感染が出生時の体重減少をもたらすとの報告があることから、興味深い結果である。今後、妊娠マウスのインフルエンザウイルス感染における体内サイトカインの変化等、さらなる詳細な解析を進める予定である。

(c) ベトナムにおけるインフルエンザ流行状況

インフルエンザは、パンデミック時だけでなく毎年の流行においても、世界中で患者の発生が見られる。特に、H3N2亜型の流行に関しては東南アジアでの抗原性変異株の発生とそれの世界への伝播が提唱されている。したがって、インフルエンザの流行動態を理解するためには、単に日本国内のみを対象とした解析では不十分であると考えられる。新型あるいは抗原変異株の発生を素早く捉え、効果的なワクチンを準備することが、インフルエンザ対策として最も重要なことの一つであり、これまで十分な解析が行われてこなかった東南アジアでのインフルエンザ流行動態調査は、喫緊の課題の一つと考えられる。本プロジェクトでは、ベトナムにおけるインフルエンザ流行の分子疫学的解析を行うこととした。2010-2011年にかけてベトナムで採集された吸器感染症患者の試料（鼻咽頭スワブ、1082例）について、種々のウイルス特異的PCRを行い、35例のインフルエンザウイルス感染試料を同定した。その内、14例がH1N1pdm09亜型、21例がH3N2亜型であった。これらの試料に関し、HAおよびNA遺伝子の塩基配列を決定し、これまで報告されたウイルスと比較し進化系統樹解析を行ったところ、ベトナム由来のウイルスが独自に位置にあることが示された。今後も

このような解析を行うことで、日本における流行とベトナムを含む東南アジアでの流行の間に何らかの相関、例えば、日本での流行の前駆となる流行が見出される可能性が期待される。今後の解析結果が待たれる。

(d) インフルエンザウイルスタンパク質と宿主タンパク質との相互作用

新規抗インフルエンザウイルス薬の開発など、新たなインフルエンザ対策を樹立するためには、ウイルス感染過程の詳細な理解が必須である。ウイルス感染細胞内においては、ウイルスタンパク質の産生とそれに対する宿主細胞側の応答が起こる。つまり、ウイルス因子と宿主因子が常に相互作用を行い感染過程が進行する。ウイルスタンパク質の機能を理解するためには、そのタンパク質が相互作用する宿主因子を同定し、その相互作用の帰結を解明する必要がある。本プロジェクトでは、インフルエンザウイルス M1 タンパク質に注目した解析を行ってきた。M1 タンパク質が感染後期において核内構造体 ND10 (PML ボディ) に集積することは既に報告した (Shibata T et al. (2009) Immunofluorescence imaging of the influenza virus M1 protein is dependent on the fixation method. *J Virol Methods*. 156 (1-2), 162-165.)。この集積の意義を明らかにするために、M1 タンパク質上で ND10 への集積に必要な部位を、種々の欠失変異体を作成することで明らかにすることを試みた。M1 は、大きく N 末端側と C 末端側の 2 つの領域に分けられる。この 2 つの領域のそれぞれを単独で発現させると、N 末領域のみが ND10 への集積を示した。この N 末領域に関しては立体構造が明らかになっている。図 1 に示すように、9 本の α ヘリックスが短いループで繋がれており、 α ヘリックス同士は互いに相互作用をしている構造である。 α ヘリックスを 1 本でも欠失させると全体の構造が大きく変化することが予想された。実際、そのような変異体では、発現量が大きく低下することが観察され、欠失変異体の不安定さが示唆された。そこで、ループ領域に注目した。ループの欠失も大きな構造変化をもたらすことが予想されたので、各ループのアミノ酸を Ala に置換した変異体を作成し、それらの ND10 への集積の有無を検討した (図 2)。これらの変異 M1 の中で、ループ 5 の Ala 置換体のみが

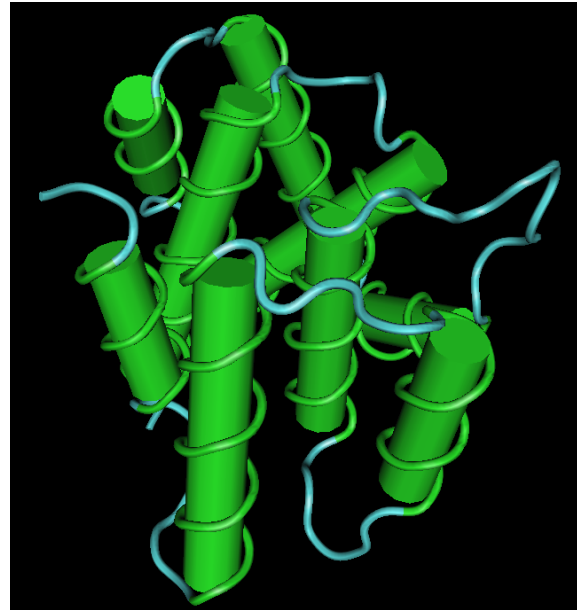


図 1 インフルエンザウイルス M1 タンパク質の立体構造

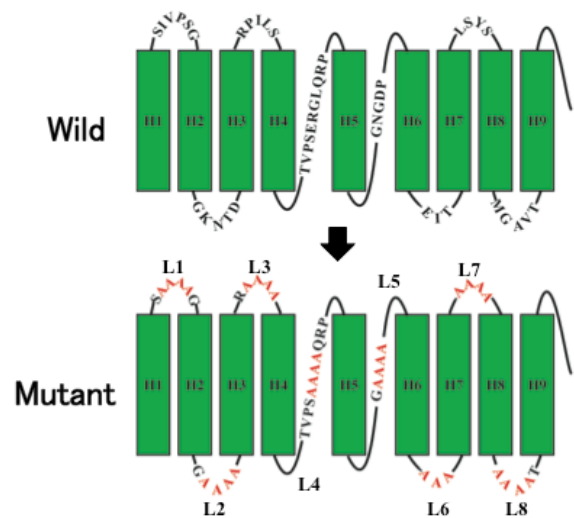


図 2 M1 タンパク質のループ領域に導入した Ala 置換変位

ND10 への集積能を欠失した。今後、ループ 5 の各アミノ酸を個々に Ala に置換した変異体についても解析する予定である。極僅かな点変異により、M1 タンパク質が ND10 への集積能を欠失することが明らかとなった。そこで、この変異を導入したインフルエンザウイルスの作出を現在試みている。そのようなウイルスが得られれば、M1 タンパク質の ND10 への集積のウイルス感染過程における意義について

有益な情報を得ることが期待できる。今後の結果に期待したい。

(e) その他の関連研究

これまでの研究により、唾液中にインフルエンザウイルスのレセプターへの吸着を阻害する物質が存在することが明らかとなった。この阻害物質の実体を明らかにするために、ウイルス粒子に結合する唾液中のタンパク質を同定する研究が現在進行中である。複数の候補タンパク質が質量分析解析により見出されており、さらなる解析を行っているところである。

核内受容体リガンドを細胞に添加することにより、特定の遺伝子の発現を誘導することができる。このことを利用し、インフルエンザウイルス感染過程に関与する宿主遺伝子の発現を誘導することで、感染過程の進行を制御する可能性を現在検討中である。

以上述べたように多くの成果が既に得られ、さらに新たな進展に繋がる研究も現在進行中である。

3. 今後の展望

本プロジェクトにおける研究の中から、ウイルス、細菌、宿主細胞の3者がお互いに影響を与えな

がら、インフルエンザの病態が決定されている様が見えてきた。本年は、本プロジェクトの最終年であり、現在進行中の研究を完成させ、感染症重症化の原因解明とその制御を目指したプロジェクトの目標を達成することを期したい。

4. これまでの研究発表

(論文)

Sawai-Kuroda R, Kikuchi S, Shimizu YK, Sasaki Y, Kuroda K, Tanaka T, Yamamoto T, Sakurai K, and Shimizu K: A polyphenol-rich extract from *Chaenomeles sinensis* (Chinese quince) inhibits influenza A virus infection by preventing primary transcription in vitro. *J. Ethnopharmacology* 146(3), 866-872, 2013.

全83件

(学会発表)

神尾 宜昌, 今井 健一, 田村 宗明, Marni Cueno, 清水 一史, 落合 邦康: 口腔細菌のインフルエンザウイルス感染促進と重症化に及ぼす影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸国際会議場, 神戸, 2013年11月10-12日

他 全168件