

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²⁾

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 KURODA²⁾

要旨

インフルエンザ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った。平成22年のプロジェクト開始から5年が経過し、平成27年3月をもって本プロジェクトは終了した。本プロジェクトの最重要課題は、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が、この目的はほぼ達成された。インフルエンザ重症化のメカニズムに関しても重要な知見が蓄積された。例えば、マウスをモデルとした、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の研究の成果が挙げられる。また、インフルエンザ感染重症化に係わる基礎疾患としてよく知られる、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、気管支喘息および間質性肺炎についての研究の進展も重要な成果である。さらに、インフルエンザ重症化の機構を理解するためには、インフルエンザウイルス感染機構の詳細な理解が不可欠であるが、これに関連し、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大きな成果をあげた。また、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を行った。

はじめに

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おり、高齢化社会を迎えている日本では、インフルエンザに対する有効な対策の確立は喫緊の課題と考えられる。特に、インフルエンザ重症化の機構の解明は、高齢患者の救命率の上昇につながることを期待される。そこで、インフルエンザ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った。そこで、インフルエンザ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った。平成22年にプロジェクトは開始され、平成27年3月をもってプロジェクトの終了を迎えた。この間プロジェクト参加

者各位の協力により着実な成果を蓄積できたと考えている。ここにその成果の一端を紹介したい。

1. 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解明

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) はウイルスのHAが認識して吸着する細胞上のレセプターを破壊する酵素活性を持つ。これにより子孫ウイルスは感染細胞から遊離し、感染を新しい細胞に広げることができる。また、体液中に含まれるレセプター様物質を破壊することにより、これらの物質によるインフルエンザウイルス感染抑制効果を減弱する役割も担っている。現在広く処方されている抗インフルエンザ薬であるタミフルやリレン

1) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野

2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

山本樹生 : yamamoto.tatsuo@nihon-u.ac.jp

ザなどはインフルエンザNAの特異的な阻害薬であり、これらの働きを抑えることにより抗ウイルス効果を発揮する。インフルエンザウイルスと細菌の相互作用を考える時の注目すべき点として、一部の細菌が、インフルエンザNAと酵素学的に同様なノイラミニダーゼ活性を持つタンパク質を、分泌することが挙げられる。この細菌ノイラミニダーゼのインフルエンザウイルス感染での役割を解明する目的で、まず、細菌由来ノイラミニダーゼがNA阻害薬存在下でウイルスの増殖を回復することができるかどうかを培養細胞の感染系で検討した。

i) ノイラミニダーゼ分泌口腔・気道細菌の同定

ヒト口腔および上気道に存在する13菌種34菌株の培養上清のノイラミニダーゼ活性を測定し、6菌種9菌株で活性を検出した。肺炎球菌では特に高く、インフルエンザウイルス感染細胞上清と同レベルを示した。さらに、口腔細菌に関して詳細な検討を行ったところ、歯垢中に検出される細菌である *Streptococcus ovaris* と *Streptococcus mitis* とに属する細菌株の中に、その培養上清中に高いノイラミニダーゼ活性を示すものを見出した。インフルエンザNA阻害薬ザナミビルはインフルエンザウイルスNAに非常に特異性が高く、IC50は、ウイルスNAに対しては1 nM前後であったが、細菌ノイラミニダーゼに対してはその百万倍の1 mM前後であった。

ii) 細菌由来ノイラミニダーゼによるインフルエンザウイルスNAの代役

ザナミビルは、感染細胞からの増殖ウイルスの放出に働くウイルスNA活性を阻害し、細胞から細胞へのウイルス感染の伝播を抑制する。その結果、ウイルス産生は抑制される。ここにザナミビルで阻害されない肺炎球菌由来NAを添加すると感染の伝播やウイルス産生が回復した。細菌NAがウイルスNAの代わりにウイルス放出に働くことが示された。

iii) 唾液中インフルエンザウイルス阻害物質

ヒト唾液中にインフルエンザウイルスのHA活性および感染性を抑制する物質が存在すること、さらに、この抑制活性はノイラミニダーゼ処理感受性で

あり、ウイルスや細菌ノイラミニダーゼ活性により失活することを明らかにした。すなわち、ウイルスNA活性が抑制されるザナミビル存在下では、唾液の感染性中和活性は薬剤非存在下に比べて著しく増強された。しかし、ザナミビルにより阻害されない細菌NAを加えると感染中和活性は著しく減少した。インフルエンザの治療に広く用いられているインフルエンザNA阻害薬の効果に、ウイルス放出阻害作用に加えて、唾液中中和活性の増強作用が寄与していることが示唆された。

iv) インフルエンザNA阻害薬の効果に対する細菌由来ノイラミニダーゼの影響

インフルエンザNA阻害薬存在下で細菌由来ノイラミニダーゼがウイルスNAの役割を果たし、ウイルスの増殖を助けることが明らかになった。従ってNA阻害薬の効果は細菌由来ノイラミニダーゼ存在下では著しく減弱することになり、薬剤投与時の口腔管理による細菌対策の重要性が示唆された。

v) 鼻粘液の抗インフルエンザウイルス活性

鼻粘液中にインフルエンザウイルスに対する赤血球凝集抑制活性および感染中和活性があることを明らかにした。これらは唾液中のものより約10倍活性が高く、NA処理感受性で熱安定性であった。電気泳動により4種類のウイルス結合性タンパク質が検出された。

vi) 細菌由来ノイラミニダーゼによるインフルエンザウイルス感染促進

高いノイラミニダーゼ活性を示した *Streptococcus ovaris* および *Streptococcus mitis* に属する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增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。このことは、細菌が産生するノイラミニダーゼがインフルエンザウイルス感染を促進することを示している。インフルエンザウイルスNA阻害薬の存在下だけでなく、通常の感染においても細菌ノイラミニダーゼがインフルエンザ重症化に関与する可能性を示唆する結果であり、今後のインフルエンザ対策を考える上で考慮すべき結果である。

vii) NA および HA 遺伝子上の連動変異による機能的新型インフルエンザウイルスの出現

一人のインフルエンザ感染患者の中で、通常 HA に担われているレセプター結合活性が NA に担われている全く新しい型のウイルスが出現したことを明らかにした。NA は D151N 変異によりレセプター結合能を獲得した。これに連動して HA に L221P 変異が起こり、HA はレセプター結合能を喪失し、同時に粘液中のウイルス阻害物質に対する抵抗性を獲得した。このようなウイルス進化の原動力は細菌由来のノイラミニダーゼと粘液中のインフルエンザウイルス阻害物質であることが考えられた。

2. インフルエンザ重症化の病態解明

i) NS1 遺伝子点突然変異による弱毒性インフルエンザウイルスの強毒化

インフルエンザウイルスを感染させた重度免疫不全 NOG マウスではウイルス増殖が長期間持続し、最終的に肺での増殖性を増大した変異ウイルスが出現し、マウスは致死に至ることが明らかとなった。この時いずれのマウス個体でもウイルス変異は NS1 遺伝子上に見出された。これらの変異は、宿主 mRNA 前駆体ポリ A 部位切断反応の抑制に係わる NS1 の CPSF30 結合ドメインに生じていた。このことはウイルスの増殖性や病原性が NS1 により制御されていることを強く示唆している。

ii) 強毒インフルエンザウイルスによるサイトカイン産生の高進

重度免疫不全 NOG マウスのインフルエンザウイルス感染において、強毒変異ウイルスの出現に伴ってサイトカイン産生の亢進が見られた。特に LIF と IL-12 では顕著であった。強毒変異は宿主細胞の遺伝子の発現を抑制するウイルス NS1 の機能喪失変異であることが示唆された。

iii) 選択的スプライシングの誘導

インフルエンザウイルスの NS1 がポリ A 部位切断反応を阻害することで選択的スプライシングを引き起こし、下流の遺伝子の発現を誘導することを見出した。この現象によりプリオン遺伝子の約 20 kbp 下流に位置するドッセル遺伝子の発現がインフルエンザウイルス感染により異常に高進することが

示された。

iv) 合併症

インフルエンザ脳症の病態として、髄液中の IL10 や TNF α の上昇を伴わない IL6 の上昇が観察された。またインフルエンザ感染後に抗 GQ1b 抗体陽性を伴うミラー・フィッシャー症候群やオプソクローヌス・ミオクローヌス症候群の合併が新たに認められた。

v) 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、少な過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。現在、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を検討し、重症例では IL6 など炎症性サイトカインの異常高値、Treg 細胞の異常高値が認められ、重症化に対するさらなる詳細な解析を進めている。

vi) インフルエンザ重症化に係る慢性呼吸器疾患

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) と気管支喘息は、どちらも高い発症率を示す common disease である。COPDは、日本人の40歳以上での有病率が8.6%で、患者数は530万人と推定されており、世界12地域の40歳以上の有病率は10.1%と報告されている。気管支喘息は、世界で3億人の患者がいると言われており、わが国では全人口の3-6%の有病率が報告されている。これら疾患に加えて難病のひとつである間質性肺炎を加えた慢性呼吸器疾患は、インフルエンザ感染重症化に係わる基礎疾患であり、予後不良因子であることが知られる。COPD、気管支喘息は、気道の慢性炎症性疾患であるが、その発症メカニズムには気道のバリア障害が関係していることが指摘されている。PCDH1は喘息の疾患感受性遺伝子の一つであるが、この分子が気道のバリア機能障害に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。PCDH1は上皮細胞のバリア形成に伴い発現が上昇し、また、PCDH1の発現をsiRNAによって抑制するとバリア機能形成が阻害されることを見出した。さらに、喘息患者の気道上皮細胞においては、アレルギー炎症部位におけるPCDH1の発現が減弱していることも明らかとなった。よって、PCDH1の発現制御は、気管支喘息の発症や重症化に関係している可能性が示唆された。また、マウス喘息モデルにおいて、アレルギー性炎症が、繰り返される刺激によって増強されるメカニズムについて解析を行った。マウスへのハウスダスト暴露により増強される遺伝子を網羅的遺伝子解析により検討したところ、TLR4のアダプター分子であるMD2が同定された。ハウスダスト刺激によるアレルギー性炎症の形成において、TLR4シグナルが必須であることが知られており、繰り返されるアレルゲン刺激により増強されるMD2発現が、アレルギー性炎症

の増幅回路として機能している可能性が考えられ、喘息重症化に関係している可能性が示唆された。さらに、感染の重症化因子として、上皮細胞間のタイトジャンクションがTLR3/TRIF経路を介して障害を受けること、NDRG1の機能の変調がこの障害に関与することがわかった。逆にステロイドやTLR9リガンドがタイトジャンクション形成促進作用を持ち、治療に資する可能性が示唆された。

vii) 宿主応答

感染応答遺伝子UBE2L6およびIFIT1の過剰発現によるインフルエンザウイルス増殖の抑制が示された。ウイルス感染で起こる小胞体ストレスに対する応答としてIntegrated stress responseがあるが、その活性分子候補としてZCCHC12を同定した。5FU, LPSなどによるバイオストレス存在下において骨髄と脾臓の肥満細胞造血が異なる反応を示し、ストローマ細胞による調節機構の違いが示唆された。

絨毛系細胞において抗 β 2-GPI抗体に対するTLRによる過剰な応答を認め、流産や胎児発育不全などとの関連が示唆された。この際に、STAT系、NF- κ Bなどの関与が示唆された。TLR4を介した子宮内膜症・PGE2による免疫抑制・骨盤腔感染症の悪循環経路が浮かび上がった。妊娠高血圧腎症(PE)において胎盤におけるplacenta growth factor, sFlt-1の変化とPE患者血清因子および低酸素応答因子の関連が明らかになった。PE患者におけるsoluble endoglin高値とheme oxygenase 1活性低下、eNOS活性低下の関与、さらにPE患者血清IgG分画、とくにAT1-AAが関与することが示唆された。

viii) 遺伝子発現変化

マイクロアレイ解析から、喫煙において酸化ストレス応答・炎症・サーカディアンリズムに関連する遺伝子の変動が見られ、インフルエンザ重症化との関連が示唆された。VDRとI κ B α 発現などの関連が見られ、炎症性反応への関与が示唆された。

3. 口腔管理 (口腔ケア) のインフルエンザ対策としての有効性の検証

口腔管理の有効性を検証するために、インフルエンザ罹患者の咽頭ぬぐい液中のインフルエンザウイルスと細菌の解析を行った。ウイルス分離と細菌の

総数および菌種のあいだに特定の相関は見出せなかった。一方、口腔ケアにより口腔内細菌数が顕著に減少し、細菌数の減少とインフルエンザ罹患率の減少の相関性が特別養護ホームにおける連携疫学調査（日本歯科医師会日本歯科総合研究機構）で示された。

4. その他の関連研究

i) カリン中ポリフェノール画分による新型インフルエンザウイルスの感染抑制効果

カリンに含まれるポリフェノールが2009年に出現したブタ由来新型インフルエンザウイルスの感染抑制活性を持つことを明らかにした。

ii) センダン植物の抗インフルエンザウイルス活性

センダン葉の抽出液が高い抗インフルエンザウイルス活性を持つことを明らかにした。抽出液処理によりウイルス粒子表面のHAとNAからなるスパイクが欠落することを電子顕微鏡観察により示した。

iii) サークルプラズマによるインフルエンザウイルスの不活化効果

RT-PCR法とプラークアッセイ法により、空中浮遊インフルエンザウイルスのサークルプラズマ装置による不活化性能の評価を行った。この装置により効率よく空中ウイルスを不活化できることが示された。

iv) インフルエンザウイルスの動物種特異性

HA タンパク質の B-loop の 88 番目のアミノ酸残基が種トロピズムに関与することを明らかにした。

v) ウイルス宿主相互作用

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。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。これらの変異 M1 の中で、ループ 5 の Ala 置換体のみが ND10 への集積能を欠失した。さらに、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検討したところ、D89A 変異体において ND10 への集積能の欠失が観察された。一アミノ酸置換により、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。その様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。

C型肝炎ウイルス (HCV) 非構造タンパク質 4B (NS4B) が N 及び C 両末端領域の両親媒性ヘリックスを介して脂肪滴膜へ結合し、ウイルス粒子産生に重要な役割を果たすことが明らかになった。HCV ゲノムマイナス鎖がタンパク質発現制御に関連する可能性が示唆された。また細胞膜セリンプロテアーゼ TMPRSS2 が HCV 感染の制御に関与していることを明らかにした。HCV 感染肝におけるウイルス量や

発癌の指標遺伝子の候補として胆管増生などに関連するタンパク質群が同定された。HCV感染における鉄・亜鉛などの微量元素の影響を臨床的に検討するとともに、*in vitro* 実験系においてメカニズムを検討した。

vi) 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、非常に重要な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の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。

おわりに

本プロジェクトは平成22年度から26年度の5年に亘って日本大学医学部総合医学研究所において実施されたものである。その成果の一端を上記したが、細菌とインフルエンザウイルスとの相互作用、そしてインフルエンザ重症化機構について多くの新しい知見が得られたと自負している。これらの成果は、実際にプロジェクトに参加した研究者だけでなく、文部科学省および本学並びに医学部、さらに関係共同機関の方々の長期に亘るプロジェクトに対する支援の賜物である。これを基盤にさらなる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が進むことを期待する。最後に御支援いただいた皆様に心よりお礼申し上げたい。