

(小佐井 康介) 論文内容の要旨

主 論 文

Two-dimensional gel electrophoresis analysis
in simultaneous influenza pneumonia and bacterial infection in mice

インフルエンザウイルスと肺炎球菌の重複感染マウスモデルを用いた
2次元電気泳動による解析

Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y,
Izumikawa K, Takeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S.

Clinical and experimental immunology
152巻2号 364-371頁 2008年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：河野 茂 教授)

緒 言

インフルエンザウイルス感染症は、主要な呼吸器感染症であり、通常は発熱を中心とした全身症状が主である。その多くは自然に軽快するが、細菌感染が合併した場合などに重篤な肺炎や急性肺傷害を引き起こすことがあり、インフルエンザウイルス関連細菌性肺炎として重要な合併症の一つとされている^{#1}。

インフルエンザウイルスが気道上皮に感染する際、ヘムアグルチニンの開裂にプロテアーゼを必要とするが、黄色ブドウ球菌がこれらのプロテアーゼを産生する^{#2}。他、クララ細胞など宿主の細胞からも分泌され^{#3}、プロテアーゼがインフルエンザウイルス関連細菌性肺炎の重症化に関与していると考えられる。また、さまざまな免疫学的機序やインフルエンザウイルスと細菌の相乗効果も報告されている。例えばインフルエンザウイルス感染後に肺炎球菌を感染させたマウスの検討では、非常に強い免疫応答が見られ、種々のサイトカインやケモカインの放出が確認されている^{#4}。また、緑膿菌の慢性気道感染マウスモデルにおいてインフルエンザウイルス感染により急性増悪を引き起こした場合、好中球の機能が低下することなどにより、致死性の肺炎球菌性肺炎が誘導される^{#5}。このように様々な免疫性因子がインフルエンザウイルスと細菌感染が重複感染した際の重症化に関与していると予想される。

本実験ではインフルエンザウイルスと肺炎球菌の重複感染マウスと、それぞれの単

独感染マウスの肺を検体とし、2次元電気泳動を用いて、蛋白の発現を比較検討した。

対象と方法

CBA/J マウス (6 週齢, 雄) にインフルエンザウイルス (A/PR8/34: H1N1, 1×10^4 plaque forming units/ml) $50 \mu\text{l}$ を経鼻的に感染させ, 48 時間後にペニシリン耐性肺炎球菌 (血清型 19, 1×10^8 colony forming units/ml) $50 \mu\text{l}$ を同様に経鼻接種した. 更に 48 時間後に気管支肺胞洗浄, 肺の摘出などを行い, 検体とした. インフルエンザウイルス, 肺炎球菌それぞれの単独感染マウスからも検体を採取し, 比較対象とした. これらの検体を用いて 2 次元電気泳動, 好中球関連プロテアーゼやサイトカインの測定などを行った.

結 果

2 次元電気泳動による解析では, インフルエンザウイルスと肺炎球菌の重複感染マウスで, それぞれの単独感染マウスと比較し, 10 か所に強いシグナルを認めた. その中でも特に強い発現を示した 2 か所を Peptide Mass Finger-printing (PMF) 法を用いて解析を行った. 2 か所のうち 1 か所は $\alpha 1$ アンチトリプシン (alpha-1 anti-trypsin, A1AT), もうひとつはクレアチンキナーゼ (creatine kinase, CK) であった. CK は重症肺炎に伴う肺の挫滅や細胞死を反映していると考えられた. A1AT はインフルエンザウイルスの感染に必要なトリプシンやトリプターゼクララなどのトリプシン様蛋白に対して抑制作用を持つとともに, 肺炎重症化の一因と考えられている好中球エラスターゼ (neutrophil elastase, NE) を分解し, 抑制的に作用する. また, A1AT は好中球より分泌されるミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase, MPO), リゾチームなどとも密接に関連し, 重症肺炎, 急性肺傷害の改善過程において重要な因子であるとの報告もあり^{#6-10}, 更に解析を進めた.

まず, 組織から RT-PCR を行い, mRNA のレベルにおいても A1AT が重複感染群で単独感染群よりも強く発現していることを確認した. 気管支肺胞洗浄液中の NE, MPO は, ともに重複感染群で非常に高い活性を示し, 肺炎球菌単独感染群では中等度上昇, インフルエンザウイルス単独感染群, 非感染群では低値を示した. リゾチームも重複感染群では単独感染群に比べ蛋白レベルでの強い発現が見られた. ヒトの interleukin (IL)-8 と類似した作用を持ち, 好中球の活性, 遊走などに関与する macrophage inflammatory protein (MIP)-2 も重複感染群では単独感染群と比較し著名な高値を示した.

考 察

2 次元電気泳動は様々な検体から迅速に蛋白を同定するのに有用な手法である. しかし, これまでインフルエンザ関連肺炎の蛋白の発現についての検討は報告されていない. 本実験では肺炎におけるプロテオームが, その重症度によって変化することに着目し, インフルエンザウイルスと肺炎球菌の重複感染マウスとそれぞれの単独感染マ

ウスの肺を用いてプロテオミクスを行った。2次元電気泳動で非常に強いシグナルを認めた蛋白は、PMF法によりそれぞれA1AT, CKと同定された。A1ATはNEと複合体を形成、抑制することにより、重症肺炎の修復過程に関与する。本実験ではNEと同様に好中球から分泌されるMPO, ライソザイムや、好中球の活性化に関連するMIP-2も重複感染群では単独感染群と比較し著明に増加していた。好中球関連プロテアーゼは過剰に分泌されると組織傷害的に作用するため、これらの強い発現は、肺炎重症化の一要因になりうるとともに、好中球関連プロテアーゼに抑制的に働くA1ATは炎症の調節因子として重要な役割を果たしていると考えられた。今回の検討で、好中球の活性化が重症化を考える上で重要であり、好中球やその関連因子が重症重複感染の治療の標的になりうると思われた。

- #1. ATS (米国呼吸器学会)ガイドライン
- #2. Tashiro MCP. *et al.* Nature 1987
- #3. Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K *et al.* J Biol Chem 1992
- #4. Seki M. *et al.* Eur Resp J 2004.
- #5. Seki M. *et al.* Clin Exp Immunol 2004.
- #6. Korkmaz B. *et al.* Am J Respir Cell Mol Biol 2005
- #7. Spencer LT. *et al.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004
- #8. Greene C. *et al.* J Infect Dis 2003
- #9. Brantly M. *et al.* Am J Respir Cell Mol Biol 2002
- #10. Cantin AM. *et al.* Am J Respir Cell Mol Biol 2002