

論文内容の要旨

論文題目 The role of cytokines in influenza pathogenesis

インフルエンザの病原性におけるサイトカインの役割

指導教員 河岡義裕 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

坂部 沙織

A 型インフルエンザウイルスは、その表面糖蛋白質である HA と NA の抗原性に基づき、H1~H16、N1~N9 の亜型に分類される。A 型インフルエンザウイルスはヒトを含む様々な動物に感染するが、全ての HA と NA 亜型のウイルスが水禽から分離されており、インフルエンザウイルスの自然宿主はカモなどの水禽である。水禽で受け継がれているウイルスが、家禽やブタ、ヒトに感染・伝播し、それぞれの動物に病気を引き起こす。ヒトにはこれまで、季節性ウイルスの H1N1（ソ連型）や H3N2（香港型）亜型の他に、H2N2、H5N1、H9N2、H7N3 および H7N7 などの亜型のウイルスが感染したことが報告されている。なかでも、1997 年以降、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染死亡例が増え続けている。H5N1 ウイルスは、ヒトに対して強い病原性を示し、その致死率は 60%にも上る。また、2009 年春、豚由来の H1N1 亜型のウイルスによるパンデミックが発生した。2009 パンデミック（2009pdm）ウイルスに感染したヒトの多くは、季節性インフルエンザと同程度の症状を示し、その病状

は比較的軽度であったが、若者や子供たちを中心に肺炎が重篤化し、入院や死亡する患者が多数認められた。パンデミックウイルスに罹患し重症化した患者や、H5N1 ウイルスに感染した患者は、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)や多臓器不全を示し、ひどい場合には死に至る。これらの患者の血中や肺中には、高濃度のサイトカインが検出されており、過剰量のサイトカイン放出が、ARDS や多臓器不全の原因と考えられている。

本研究では、*in vitro* の実験として、ヒトの末梢血由来マクロファージを用いて、また、*in vivo* ではモデル動物としてマウスを用いて、H5N1 ウイルスやパンデミック H1N1 ウイルスの増殖性やサイトカイン誘導能を検討した。さらに、これらのインフルエンザウイルス感染症に対する治療法の一つとして、抗体療法の有効性を検討した。

第1章 H5N1 および 2009pdmH1N1 インフルエンザウイルスのヒト末梢血由来マクロファージにおけるサイトカイン誘導と増殖性

ヒトが H5N1 ウイルスに感染した時の過剰なサイトカイン応答には、肺胞マクロファージが大きな役割を担っていると考えられている。本研究では、H5N1 ウイルスおよび 2009pdmH1N1 ウイルスのヒトマクロファージにおける増殖能とサイトカイン誘導能を明らかにする目的で、ヒト末梢血中に含まれる単球からマクロファージを誘導し、誘導したマクロファージにウイルスを感染させた。

レクチンを用いた細胞表面の糖鎖解析から、ヒト末梢血由来マクロファージには、鳥類で主に発現が認められる鳥型レセプターと、ヒトの呼吸器で主に発現が認められるヒト型レセプターのどちらも発現していることが明らかになった。さらに、実験に用いた全てのインフルエンザウイルスが、ヒト末梢血

での増殖能を有していることが明らかになった。また、培養上清中に放出された48種類のサイトカイン量を測定した結果、実験に用いた5株のH5N1ウイルスのうち、3株は季節性ウイルスよりも高いサイトカイン誘導能を示したが、残りの2株のサイトカイン誘導能は季節性のウイルスとほとんど変わらなかった。H5N1ウイルスの、ヒトマクロファージにおけるサイトカイン誘導能とウイルス株が分離された患者の臨床症状には、相関が認められなかった。さらに、血液提供者によって、サイトカイン誘導能に大きな差が認められたことから、インフルエンザウイルスに対する、個人の感受性の差が示唆された。一方、2009pdmH1N1ウイルスは、季節性のウイルスよりも、IL-6など数種類のサイトカインを多量に誘導することがわかった。

本研究において、インフルエンザウイルスの増殖能とサイトカイン誘導量には、明確な相関は認められなかったが、不活化ウイルスはサイトカインを誘導しなかったことから、サイトカインが放出されるには、ウイルスの増殖が必要であるとわかった。

これまで、H5N1ウイルスは、サイトカインを過剰に誘導し、そのためヒトで重篤な症状を引き起こすと信じられてきた。本研究は、必ずしもすべてのH5N1ウイルスが高い誘導能を有しているわけではなく、これまで考えられてきた病原性発現メカニズムとは別のメカニズムの存在を示唆している。

第2章 H5N1および2009pdmH1N1インフルエンザウイルスに感染したマウスにおけるサイトカイン応答

本研究では、生体内でのインフルエンザウイルスに対する宿主免疫応答とウイルスの病原性との関連性を明らかにするため、インフルエンザのモデル動物であるマウスを用いて、様々なインフルエンザウイルスの病原性および増

殖性と、それに対するサイトカイン応答を調べた。

始めに、H5N1、2009pdmH1N1 および季節性のインフルエンザウイルスをマウスに感染させ、マウスに対する病原性を調べた。H5N1 ウイルスは、少量のウイルスでもマウスを殺し、強い病原性を示したが、2009pdmH1N1 ウイルスは、マウスを死に至らせるのに、多量のウイルス量を必要とした。一方、季節性のウイルスは、多量のウイルスを感染させても、マウスに対して病原性は示さなかった。また、ウイルスの増殖部位を調べた結果、H5N1 ウイルスが全身感染を引き起こしたのに対し、2009pdmH1N1 ウイルスや季節性ウイルスは、呼吸器でのみウイルスの増殖が認められた。次に、インフルエンザウイルスの増殖性と宿主免疫応答に関する知見を得るため、肺でのウイルス感染価と 32 種類のサイトカイン量を詳細に解析した。2009pdmH1N1 ウイルスは、季節性ウイルスよりも高い増殖性を示し、H5N1 ウイルスは、2009pdmH1N1 ウイルスよりも早くそして高い増殖性を示した。一方、季節性ウイルスは、マウスの肺で一過性に増殖したのち、速やかにウイルスが排除された。H5N1 ウイルスに感染したマウスでは、ウイルスの増殖と相関して、早期に多量のサイトカインの放出が認められたが、季節性のウイルスに感染したマウスでは、少量のサイトカイン応答のみ観察された。また、2009pdmH1N1 ウイルスに感染したマウスでは、H5N1 ウイルスよりも遅れてサイトカインが放出され始めたが、感染後期には、高いサイトカイン応答が観察された。マウスに対して強い病原性を示すウイルス株で、マウス肺において多量のサイトカイン誘導が認められたことから、ウイルスの病原性とサイトカイン誘導には正の相関があることが示唆された。

本研究により、インフルエンザウイルスの生体内での動態と宿主免疫応答に関する詳細な知見が得られた。これらの知見は、今後、インフルエンザウイルスの病原性発現メカニズムを解析する上で、有用な基礎データとなること

が期待される。

第3章 亜型間交差中和抗体 C179 の H5N1 高病原性鳥インフルエンザおよび 2009 年 H1N1 パンデミックウイルスに対する予防および治療効果

本研究では、H1 から H16 のうち、H1、H2、H5 および H6HA を認識する中和抗体 C179 を用いて、H5N1 ウイルスおよび 2009pdmH1N1 ウイルスに対する予防および治療効果を、マウスを用いて検討した。

モノクローナル抗体 C179 が認識するエピトープのアミノ酸配列は、H5N1 ウイルスや 2009pdmH1N1 ウイルスで、ある程度保存されていた。In vitro において、これらのウイルスに対して C179 は中和活性を有していることがわかった。さらに、マウスに、致死量の H5N1 ウイルスまたは 2009pdmH1N1 ウイルスによる攻撃前または攻撃後に、モノクローナル抗体 C179 を腹腔内投与し、防御効果を調べた結果、H5N1 ウイルスに対しては高い予防および治療効果が、2009pdmH1N1 ウイルスに対しては、予防効果が認められた。さらに、ヒトへの臨床応用が期待できる鼻腔内投与でも同様に高い防御効果が認められた。また、モノクローナル抗体 C179 を投与することにより、H5N1 ウイルスや 2009pdmH1N1 ウイルスに感染したマウスにおいて、肺や全身臓器で優位にウイルス感染価が低下していることがわかった。また、ウイルスの増殖が抑制されることにより、マウス肺中のサイトカイン量が減少することがわかった。

パンデミックの発生は、誰も予測できず、いつどのような亜型のインフルエンザウイルスが侵入してくるか分からない。一つの HA 亜型特異的ではなく、モノクローナル抗体 C179 のように、複数の HA 亜型のウイルスを中和する抗体は、抗体療法における有用性が高い。本研究は、現在インフルエンザ対策に用いられている抗ウイルス薬に代わる予防および治療法の一つとして、抗体

療法インフルエンザに対する防御効果を検討し、初めて、鼻腔内投与の有効性を示したものである。