

## 特 集

## 呼吸不全をきたしうるウイルス感染症

インフルエンザウイルスと呼吸不全  
—宿主核内システムを標的としたインフルエンザ治療の新たな可能性—

今井由美子

キーワード：インフルエンザウイルス，細胞核，呼吸不全

## I. はじめに

ウイルスは宿主の細胞内小器官を利用して増殖する。ウイルスが侵入した宿主細胞ではウイルスとの相互作用からさまざまなシグナル伝達系が動き出し、感染症の病態形成につながると考えられる。インフルエンザウイルスはRNAウイルスであるが、他の多くのRNAウイルスと異なり、ウイルスゲノムの転写、複製は感染した宿主細胞の核内で行われる。一方近年、インフルエンザウイルスと宿主の相互作用に関して、トランスクリプトーム、プロテオーム、あるいはRNA干渉(RNAi)法を用いたデイスラプトームなどのゲノムワイドな解析が行われている<sup>1~3)</sup>。しかしながら、DNA、RNA、タンパク質、その先で機能する代謝物、特に脂溶性代謝物に関しては、インフルエンザウイルス感染症の呼吸不全をはじめとする病態との関わりは不明であった。

最近私達は、脂肪酸代謝物のライブラリーを用いたスクリーニングと高速液体クロマトグラフィータンデムマスマスペクトロメトリー(LC-MS/MS)による脂肪酸代謝物の包括的リピドミクス解析を通して、オメガ3脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)由来の代謝物プロテクチンD1(PD1)がインフルエンザウイルスの増殖を抑えることを見出した<sup>4)</sup>。PD1はこれまで抗炎症作用を有する脂肪酸代謝物として知られていた<sup>5)</sup>。私達は、PD1は、宿主細胞の核内においてウイルスRNA

の核外輸送を抑制することによって作用することを見出した。現状の抗インフルエンザ薬は全てウイルスタンパク質を標的としたものであるが、これらの抗インフルエンザ薬は、急性呼吸促進症候群(acute respiratory distress syndrome: ARDS)を発症したような重症型のインフルエンザ感染症に関しては効果が期待できない。興味深いことに、PD1はマウス重症インフルエンザモデルでは、従来の抗インフルエンザ薬(ノイラミニダーゼ阻害薬)と併用すると、発症から48時間以降に投与を開始しても、治療効果を示した。これは、宿主核内システムを標的とした重症インフルエンザ治療の新たな可能性を示唆するものであると思われる。今回、インフルエンザウイルスと呼吸不全に関して、宿主核内システムを標的とした治療の可能性について以下に述べる。

II. 脂肪酸代謝物のライブラリーを用いた  
インフルエンザウイルスの増殖に関するスクリーニング

脂肪酸代謝物の化合物ライブラリーを用いて、インフルエンザウイルス(H1N1/PR8株)を感染させたヒト肺上皮A549細胞にライブラリー上のそれぞれの化合物を投与し、ウイルスNPタンパク質のmRNA発現量を指標に、ウイルスの増殖のスクリーニングを行った。その結果、アラキドン酸(AA)由来の12-HETE、15-HETE、ならびにDHA由来の17-HDoHE、PD1がインフルエンザウイルスの増殖を抑制することがわかった。これらの代謝物の中でPD1がH1N1/PR8株ウイ

ルスの増殖抑制効果が最も強いことがわかった。さらに、PD1 の投与で、強毒型の H5N1 ウイルス (H5N1) の M タンパク質の mRNA の発現、ウイルス価は顕著に低下し、PD1 は強毒型の H5N1 の増殖を抑制した。

### Ⅲ. インフルエンザウイルス感染における宿主 12/15-リポキシゲナーゼ代謝系の寄与

PR8 株ウイルスをマウスに経気道的に感染させると、ウイルス価は上昇し、呼吸機能は経時的に悪化する。感染 5 日後には、炎症細胞の浸潤、肺出血、肺小硝子膜の形成といったヒトの重症インフルエンザ感染症に典型的な肺病理像を示す<sup>6)</sup>。一方で、上記ケミカルライブラリーを用いたスクリーニングから浮上した脂肪酸代謝物の多くは 12/15-リポキシゲナーゼ (12/15-LOX) により内因性に生成するものであることから、次に 12/15-LOX 欠損マウスを用いた感染実験を行った。その結果、12/15-LOX 欠損マウスは野生型と比べてインフルエンザウイルス感染による病態の悪化および回復の遅延が認められた<sup>4)</sup>。さらに、この重症インフルエンザのマウスモデルの肺組織を用いて、AA、DHA、エイコサペンタエン酸 (EPA) 由来の代謝物のリピドミクス解析を行った。肺組織を経時的にサンプリングし、LC-MS/MS による質量分析法で、AA、DHA、EPA 由来の代謝物を網羅的に解析した。その結果、スクリーニングでウイルス増殖の抑制効果を示した 12/15-LOX 系の代謝物、12-HETE、15-HETE、17-HDoHE、および PD1 は、いずれも感染後全経過を通して、内因性代謝物の産生が低下していることがわかった<sup>4)</sup>。

次に、病原性の異なるウイルスを野生型のマウスに経鼻感染させ、同様のリピドミクス解析を行った。用いたウイルスは、弱毒型の 2009 年 H1N1 ウイルス (2009 H1N1)、強毒型の H5N1、ならびに H5N1 の PB2 タンパク質の 627 番目のアミノ酸に変異を入れて弱毒化したウイルス (H5N1 PB2-627E) である。PR8 株ウイルスの経気道感染モデルの結果と同様に、PD1 の産生は、強毒型の H5N1 感染肺では経過中産生の低下を認めた。一方、弱毒型の 2009 H1N1 ウイルスや H5N1 PB2-627E ウイルス感染肺では産生は亢進しており、ウイルスの病原性と PD1 の産生量に負の相関を認めることがわかった<sup>4)</sup>。

### Ⅳ. PD1 の重症インフルエンザに対する *in vivo* での効果

次に、培養細胞を用いたスクリーニングでインフルエンザウイルスの増殖の抑制が見られた脂肪酸代謝物に関して、PR8 株ウイルスによるマウス重症インフルエンザモデルを用いて、*in vivo* での効果を検討した。12-HETE、15-HETE、17-HDoHE、あるいは PD1 をそれぞれ 1  $\mu$ g/mouse、感染 12 時間前と感染直後に静脈内投与した。コントロール群は 8 日で全例が死亡したが、PD1 投与群では 8 日以降も 40% のマウスが生存し、重症インフルエンザのマウスの生存率が有意に改善した。一方、抗炎症作用を有することが報告されているが、スクリーニングでウイルス増殖の抑制効果の見られなかった代謝物、RvD1、RvD2、LXA4 に関しては、マウスの生存率を改善させることはなかった<sup>4)</sup>。また、2009 H1N1 の経気道感染モデルにおいても、PD1 は有意に生存率を改善させた。PD1 投与によって、感染肺組織の炎症性サイトカイン (IL-6、CXCL10、CXCL2) やインターフェロン (IFN  $\beta$ ) などの産生には変化がなかった一方、ウイルスの増殖は PD1 によって有意に抑制された<sup>4)</sup>。したがって、PD1 の重症インフルエンザ改善効果は、抗炎症作用によるものではない可能性が考えられた。

### Ⅴ. PD1 によるウイルス RNA の核外輸送の抑制

インフルエンザウイルスでは、ウイルスゲノム vRNA (-) の複製、転写が感染細胞の核内で行われるという特徴がある。すなわち、vRNA (-) に宿主細胞から切り取られたキャップ構造と poly-A 構造が結合して核内で mRNA の転写が行われ、mRNA は細胞質内へ核外輸送されウイルスタンパク質に翻訳される。また核内で vRNA (-) を鋳型に cRNA (+) が合成され、それを鋳型に多数の vRNA (-) が複製される。複製された vRNA (-) はリボ核酸タンパク質複合体 (vRNP) を形成して核外へ輸送される<sup>7)</sup>。そこで、ウイルスの vRNA ならびに mRNA の動態を調べるために、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いて、ウイルス mRNA と vRNA の細胞内局在の変化を経時的に観察した。mRNA および vRNA は感染後 3 時間から核内での発現が見られ、感染後 5 時間から 8 時間

にかけて細胞質での強い発現に変わっていくことがわかった。PD1を投与すると、ウイルス mRNA、vRNAとともに、感染後8時間においても核内に留まっていた、ウイルス RNAの核外輸送が顕著に抑制されていることがわかった(図1)<sup>4)</sup>。

宿主分子の mRNAの核外輸送には、NXF1タンパク質が特異的な輸送受容体として機能していることが知られている<sup>8)</sup>。私達は NXF1がウイルス RNAの核外輸送にも関与しているのではないかと考えた。NXF1をノックダウンすると、感染8時間におけるウイルス mRNAおよび vRNAの核内から細胞質への移行が抑制されることがわかった<sup>4)</sup>。さらに、NXF1のノックダウンでウイルスの増殖が抑制されることがわかった。また、in vitro RNAゲルシフトアッセイによってウイルス RNAと NXF1タンパク質が直接結合することが確認された<sup>4)</sup>。したがって、NXF1はインフルエンザウイルス RNAと直接結合して、ウイルス RNAの核外移行を促すことによって、ウイルスの増殖を促進させていることが示唆された。

PD1は NXF1を介したインフルエンザウイルス RNAの核外輸送を抑制することによって、ウイルスの増殖を抑えているのではないかと考え、ウイルス RNA(mRNA、vRNA)と NXF1の結合を、NXF1抗体を用いた RNA免疫沈降法を用いて検討した。PR8株ウイルスを感染させ、PD1を非投与あるいは投与した A549細胞を用いて、NXF1抗体による RNA免疫沈降を行った。NXF1抗体と結合している RNAを抽出し、ウイルス mRNAならびに vRNAの発現量を定量的 RT-polymerase chain reaction(PCR)法で測定したところ、PD1の投与で NXF1と結合するウイルス RNA量が抑えられることがわかった<sup>4)</sup>。さらに、NXF1抗体と結合している RNAを用いて、大規模シーケンス解析を行ったところ、PD1の投与で、NXF1抗体と結合するウイルス RNAの減少を認めた(図2)<sup>4)</sup>。ところで、NXF1は宿主の mRNAの核外輸送に関与していることが知られている。そこで、PD1は宿主の mRNAの核外輸送を抑制するかを検討した。まず、Poly(A)mRNAの FISH解析を行ったところ、PD1の投与でも Poly(A)mRNAの核外輸送は影響を受けなかった<sup>4)</sup>。したがって、PD1は NXF1を介したウイルス RNAの核外輸送を特異的に抑制することによって、インフルエンザウイルスの増殖を抑えていることが示唆された。

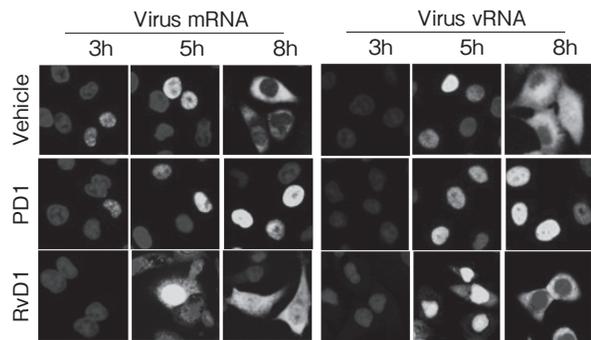


図1 PD1および RvD1のウイルス RNAの核外輸送に及ぼす影響

H1N1/PR8株ウイルスに感染した A549細胞に vehicle(コントロール)、PD1あるいは RvD1を投与した。vehicleではウイルス mRNAおよび vRNAともに5時間では核内に留まっていた、8時間では核外に移行した。一方 PD1を投与すると、8時間でもウイルス RNAが核内に留まっていた、ウイルス RNAの核外移行が阻害されていることがわかった。RvD1を投与してもそのようなウイルス RNAの核外移行の阻害は認められなかった。

## VI. PD1とノイラミニダーゼ阻害薬と併用による重症インフルエンザマウスの救命効果

重症インフルエンザの治療の問題点の1つは、現在使われているノイラミニダーゼ阻害薬が、感染から48時間以内に投与すると効果があるものの、それを過ぎて投与した場合には、効果がないという点である<sup>9)</sup>。PD1はウイルスの増殖抑制に関して、ノイラミニダーゼ阻害薬とメカニズムを異にすることがわかったので、作用点の異なる両者を併用することによって、感染から48時間が経った重症インフルエンザマウスを救命できないかと考えた。重症インフルエンザモデルでは、静注用ノイラミニダーゼ阻害薬ペラミビルを単独で感染48時間後に投与すると65%のマウスが死亡したが、PD1とペラミビルを併用すると感染48時間後に投与しても生存率を有意に改善することができた<sup>4)</sup>。これらのことから、PD1は、予防的に投与しても、また感染後に治療的に投与しても、重症インフルエンザに対して有効である可能性が示唆された。

## VII. おわりに

LC-MS/MSを用いたりピドミクスと化合物ライブラリーを用いたケミカルスクリーニングを組み合わせたことで、インフルエンザウイルス感染に対して宿主側の脂肪酸代謝系が防御的に機能するという予想外の事実が明らかになった。このようなメタボロミクスとケ

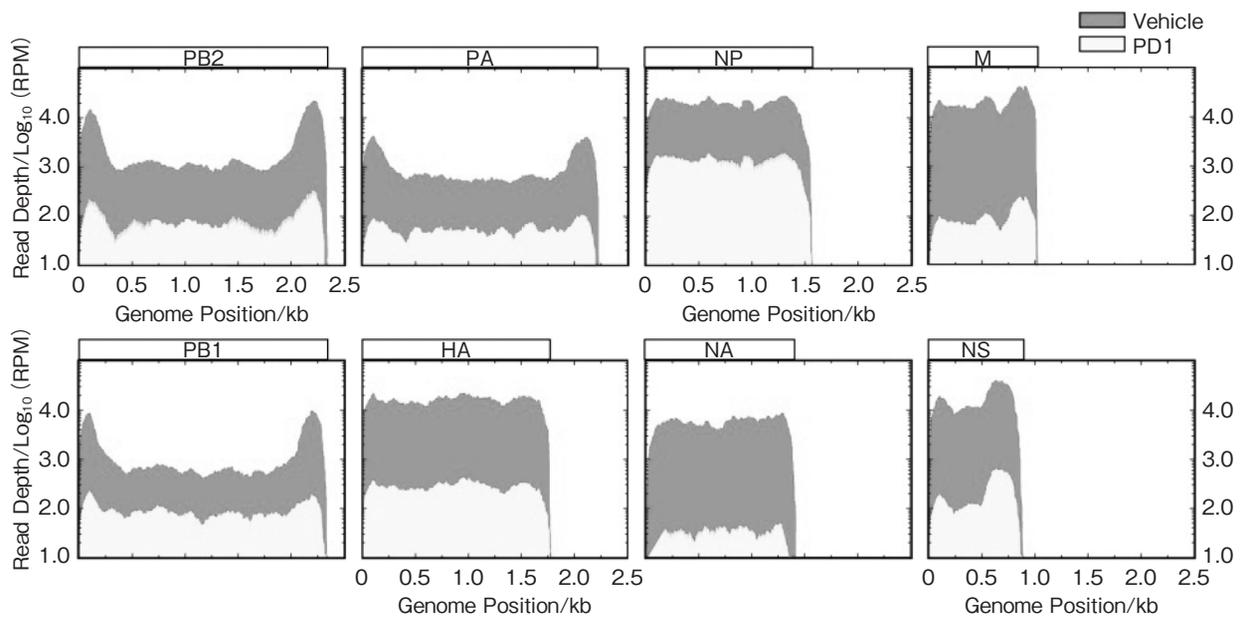


図2 PD1投与がウイルスRNAとNXF1タンパク質との結合に及ぼす影響

H1N1/PR8株ウイルスに感染したA549細胞にvehicle(コントロール)あるいはPD1を投与し、細胞溶解液を用いてNXF1抗体による免疫沈降を行った。沈降してきたRNAを用いて大規模シーケンス解析を行い、ウイルスRNAをそれぞれのセグメント毎にマッピングした結果を示す。PD1の投与でNXF1タンパク質と結合するウイルスRNA量が全てのセグメントのRNAに関して抑制されていることがわかった。

ミカルバイオロジーを組み合わせたアプローチは、今後、感染症以外にもさまざまな疾患の病態解明や治療戦略にも適用されるだろう。また、新しい創薬標的としてもPD1の強い抗ウイルス作用は大変興味深い。PD1はこれまで抗炎症作用を持つことが知られていたが<sup>5)</sup>、今回私達は、PD1にウイルス増殖の抑制効果のあることを見出した<sup>4)</sup>。そのメカニズムとしてPD1はNXF1を介したウイルスRNAの核外輸送を抑制することによって、ウイルスの増殖を抑えていることがわかった。PD1がウイルスRNAの核外輸送を抑制するメカニズムの詳細に関しても今後の解明が待たれる。さらに、PD1に特異的な受容体は未だ同定されておらず、PD1の作用点やRNAの核外輸送に関わるシグナル伝達経路に関しても今後の重要な課題であると思われる。今回の検討では、感染から48時間が経過した重症インフルエンザマウスを、従来の抗インフルエンザ薬と併用することで、生存率を改善させることができた<sup>4)</sup>。このことから、PD1はこれまで救命の難しかった感染から48時間以上経過した重症インフルエンザにも効果のある可能性が考えられ、重症インフルエンザの治療薬として有用ではないかと考えられる。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

#### 参考文献

- 1) Karlas A, Machuy N, Shin Y, et al : Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*. 2010 ; 463 : 818-22.
- 2) König R, Stertz S, Zhou Y, et al : Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 2010 ; 463 : 813-7.
- 3) Shapira SD, Gat-Viks I, Shum BO, et al : A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell*. 2009 ; 139 : 1255-67.
- 4) Morita M, Kuba K, Ichikawa A, et al : The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell*. 2013 ; 153 : 112-25.
- 5) Serhan CN : Resolution phase of inflammation : novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*. 2007 ; 25 : 101-37.
- 6) Ichikawa A, Kuba K, Morita M, et al : CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 ; 187 : 65-77.
- 7) Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, et al : Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004 ; 283 : 121-43.
- 8) Katahira J, Strässer K, Podtelejnikov A, et al : The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J*. 1999 ; 18 : 2593-609.
- 9) Kumar A : Early versus late oseltamivir treatment in severely ill patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1): speed is life. *J Antimicrob Chemother*. 2011 ; 66 : 959-63.