

## 110. エピジェネティクスによる二次性細菌性肺炎の病態解明

伊藤 利洋

Key words: インフルエンザウイルス,  
二次性細菌性肺炎, エピジェネティクス

\*岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科  
免疫病理学講座

### 緒言

インフルエンザウイルス感染症は、毎年継続して感染流行を起こし、社会活動にも大きな影響を与えている。さらに数年から数十年ごとに新型のヒトインフルエンザの出現とその新型ウイルスのパンデミックが起こっており、2009年にも新型インフルエンザ (H1N1) が発生し、世界中で猛威を振るったのは我々の記憶に新しい。インフルエンザウイルス感染単独による死亡率は低いですが、インフルエンザウイルス感染症は細菌性肺炎などの二次感染の危険性を高め、二次感染を併発すると死亡率は飛躍的に上昇する。インフルエンザウイルス感染症による死亡原因に関する疫学調査では1918年のスペイン風邪では死者の80%以上、2009年の新型インフルエンザでも死者の50%以上が二次性細菌性肺炎で死亡していることが報告されている。

近年エピジェネティクスは、細胞のアイデンティティ維持に関する仕組みとして、その異常はがん化に深く関与することから、世界的にもがん領域では活発に研究が行われてきている。さらには従来エピジェネティクスの関与があまり考えられていなかった免疫の分野でもエピジェネティクスが関与することが明らかになってきた。本研究はエピジェネティクスの観点から二次性細菌性肺炎の感受性を規程する因子を明らかにする事を目的とし検討を行った。

### 方法、結果および考察

まず特に肺においてウイルスおよび細菌感染時に初期生体防御に重要な役割を果たすのは、気道上皮細胞ならびに自然免疫を担うマクロファージであることから、気道上皮細胞株 (MLE-12) ならびにマクロファージ株 (RAW264.7) をインフルエンザウイルスで刺激し、Superarray system を用いてエピジェネティックマーカーの発現解析を網羅的行ったところ、気道上皮細胞ならびにマクロファージの両者で、H3K9のメチル化 (転写抑制) を誘導する酵素 SET domain, bifurcated 2 (*Setdb2*) (図1) の有意な上昇を認めた。

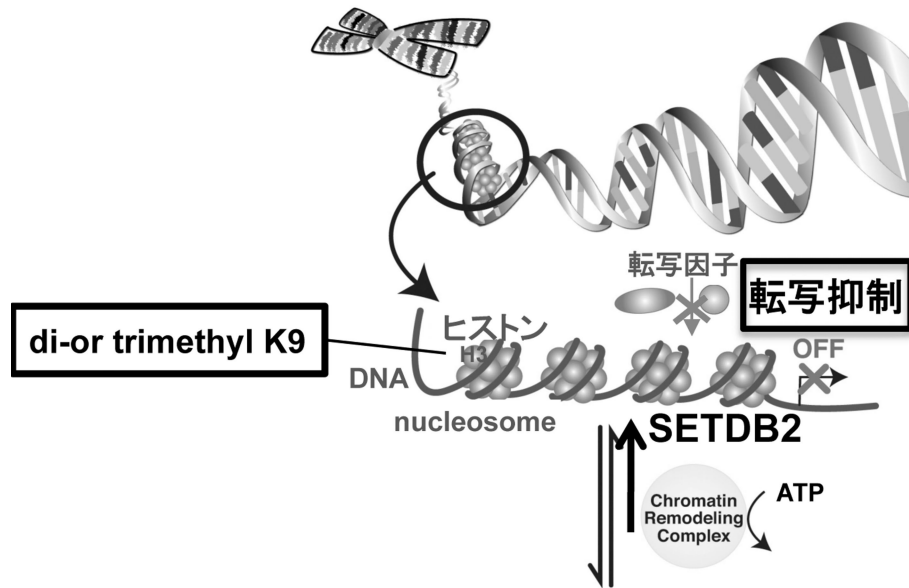


図1. SETDB2によるヒストン化学修飾.

インフルエンザウイルス刺激により H3K9 のメチル化（転写抑制）に寄与する *Setdb2* の有意な上昇が見られ、転写抑制が抑制されることをイラストしたものである。

この SETDB2 はヒストン修飾に関わる酵素の中では H1N1 感染により唯一有意な発現上昇を認める酵素であった。次にインフルエンザウイルス肺炎死亡例の剖検肺組織における *Setdb2* の遺伝子発現を検討したところ、健常肺と比較し SETDB2 の有意な上昇を認めた（図2）。また免疫組織化学染色では、健常肺と比較してインフルエンザウイルス肺炎死亡例の剖検肺組織における気道上皮細胞やマクロファージに SETDB2 ならびに H3K9 のメチル化の亢進が見られた。

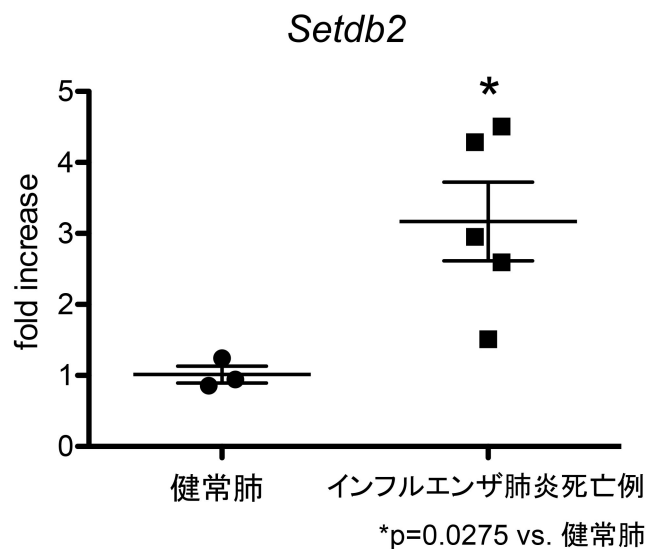


図2. ヒト剖検肺における SETDB2 の発現.

健常肺 (Normal Lung) とインフルエンザ肺炎死亡例 (H1N1 Lung) におけるパラフィン切片から RNA を抽出し、*Setdb2* の発現を Normal Lung の平均値を 1 とした時の H1N1 Lung における発現を数値化したものである。Error bar: SEM. Asterisk:  $P < 0.05$  (Student's t-test) .

次に SETDB2 の発現機構を様々な刺激により解析したところ、気道上皮細胞株 (MLE-12) ならびにマクロファージ株 (RAW264.7) ではインフルエンザ刺激によって産生される Type-I interferon (IFN-I) 濃度依存性に SETDB2 の発現が誘導され、インフルエンザ感染モデルマウスにおいてもインフルエンザウイルス感染により SETDB2 の遺伝子発現が亢進される一方、IFN-I のレセプター欠損マウス (*IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup>*) やインフルエンザウイルス感染において IFN-I 産生に必須な役割を果たす RIG-I like receptor の中枢を担う IPS-1 (interferon-beta promoter stimulator 1) 欠損マウス (*IPS-1<sup>-/-</sup>*) では SETDB2 の誘導が見られず、*Setdb2* の発現上昇は RIG-I like receptor による IFN-I 依存性である事が証明された (図 3)。

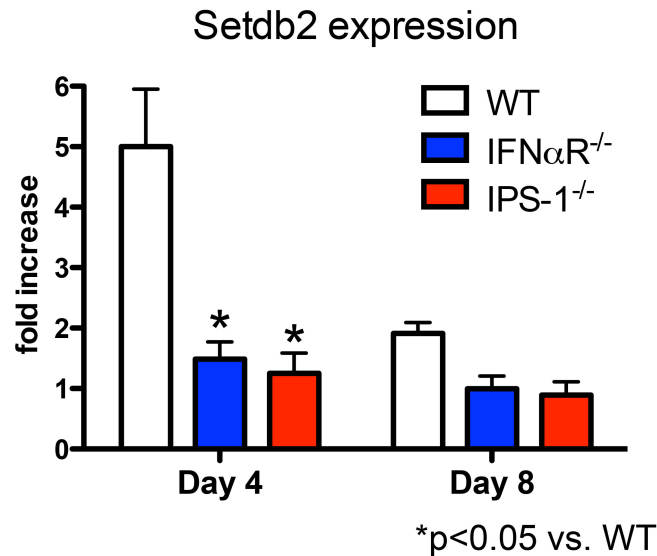


図 3. インフルエンザ肺炎モデルマウスにおける SETDB2 の発現機構。

インフルエンザウイルスを経鼻感染させ、4日目ならびに8日目の肺における SETDB2 の発現を解析したところ、*Setdb2* の発現は RIG-I like receptor による Type-I IFN 依存性であることが明らかになった。Error bar: SEM. Asterisk: P < 0.05 (Student's t-test)。

次にインフルエンザウイルス感染後5日後に肺炎球菌を経気道感染させることにより作製した二次性細菌性肺炎モデルにおいて、SETDB2 が誘導されない *IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup>* マウスでは、野生型 (Wild-type: WT) マウスと比較して生存率の有意な改善が見られた (図 4 a)。WT マウスと *IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup>* マウスの病態を解析すると、*IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup>* マウスでは WT マウスと比較して炎症を中心とした組織ダメージの軽減や、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-12p40) ・ケモカイン (CXCL1, CCL2) の有意な低下が見られた。また *IFN $\alpha$ R<sup>-/-</sup>* マウスでは、上皮成長因子の一種であり気道感染時の肺において保護的な役割を有する Amphiregulin の有意な上昇を認めた (図 4 b)。

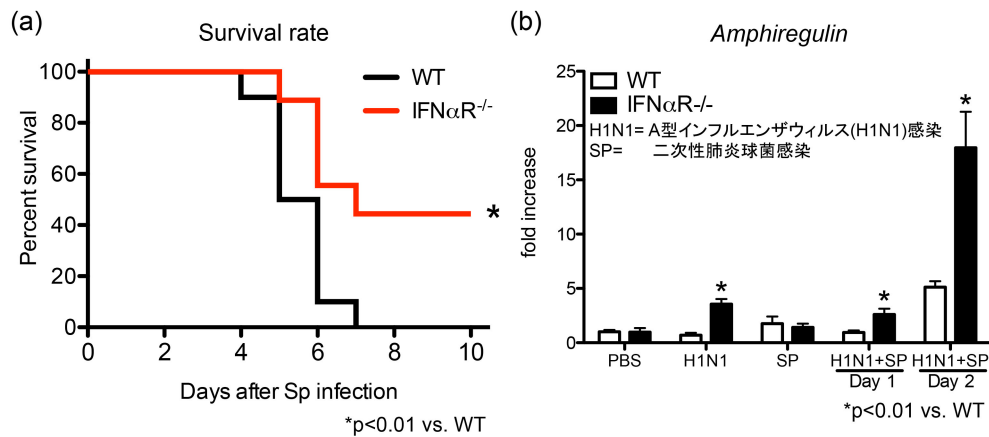


図4. SETDB2が誘導されない  $IFN\alpha R^{-/-}$ マウスは二次性細菌性肺炎モデルに抵抗性である。

インフルエンザウイルス感染5日後に肺炎球菌を経気管感染させた。a) WTマウスと  $IFN\alpha R^{-/-}$ マウスにおける肺炎球菌感染 (Day 0) 後からの生存率を比較した。Asterisk:  $P < 0.01$ 。b) WTマウスと  $IFN\alpha R^{-/-}$ マウスにおける *Amphyregulin* の発現を比較検討した。Error bar: SEM. Asterisk:  $P < 0.01$ . (Student's t-test)。

さらに気道上皮細胞株 (MLE-12) に *Setdb2* を siRNA でノックダウンを行い、インフルエンザウイルス (H1N1) や type-I IFN で刺激すると、*Setdb2* をノックダウンすることにより *Amphyregulin* の発現上昇が見られ、*Setdb2* が *Amphyregulin* の発現を制御している事が示唆され、*Amphyregulin* 遺伝子のプロモーター領域の H3K9 のメチル化につき、クロマチン免疫沈降 (ChIP: chromatin immunoprecipitation) 法により検討中である。

本研究は、H1N1 感染での SETDB2 の発現上昇は二次性細菌性肺炎に対する感受性を規程する因子となりうることが示唆され、本研究の成果はインフルエンザウイルス感染症ならびに併発する二次性細菌性肺炎に対する分子基盤解明に基づく新規予防・治療法開発への貢献が期待される。*Setdb2* flox マウスの提供を受け、Cre-loxP システム (Adenovirus-Cre, LysM-Cre) により気道上皮細胞ならびにマクロファージに特異的な *Setdb2* 欠損マウスの作製を現在行っている。今後はインフルエンザウイルス肺炎ならびに二次性細菌性肺炎を誘導し、病理学的検討ならびに防御機能の検討を行っていく予定である。

### 共同研究者

本研究の研究協力者は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病理学 (免疫病理学) の松川昭博およびミシガン大学病理学の Steven L. Kunkel である。

### 文献

- 1) Xu, Y., Ito, T., Fushimi, S., Takahashi, S., Itakura, J., Kimura, R., Sato, M., Mino, M., Yoshimura, A. & Matsukawa, A. : Spred-2 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in mice. *PLoS One*, **9** : e108914, 2014.
- 2) Liu, T., Yu, H., Ullenbruch, M., Jin, H., Ito, T., Wu, Z., Liu, J. & Phan, S. H. : The *in vivo* fibrotic role of FIZZ1 in pulmonary fibrosis. *PLoS One*, **9** : e88362, 2014.