

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05197

研究課題名(和文)パラミクソウイルス感染における自然免疫の誘導、回避、病原性発現の統合的理解の構築

研究課題名(英文)Elucidation of interactions between paramyxoviral infection and host innate immunity

研究代表者

入江 崇 (Irie, Takashi)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号：70419498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫は、病原微生物感染初期の生体防御の要であり、微生物固有の因子を認識して発動する。本研究では、ウイルスと宿主自然免疫の関係を主としたウイルス-宿主間相互作用について、一本鎖マイナス鎖RNAウイルスの代表としてセンダイウイルス(SeV)をモデルに解析を行い、以下の成果を得た。1. 自然免疫抑制を含む様々なウイルス機能に關与するSeV C及びV蛋白質についての詳細なウイルスレベルでの機能マッピング、2. SeV感染と細胞死(アポトーシス及びネクローシス)の關係の解明、3. ウイルス由来自然免疫誘導因子とその発現機序の解明、4. 新規SeVベクター及びワクチンアジュバント開発への応用など。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、ウイルスが宿主の自然免疫系を回避し病原性を発揮するメカニズムに新たな知見が加えられただけでなく、より詳細な研究を進めるために有用なツール(特異な性質を持ったウイルスクローンや様々な組換えウイルスを得ることができ、さらなる研究の進展、ワクチン開発などへの応用が期待される。また本研究の過程において、細胞死への關与など新しいウイルス機能が明らかとなっただけでなく、さらに新規相互作用を示唆する成果が得られており、今後、より詳細なウイルスと宿主の關係の解明に繋がることを期待される。さらに、本研究で新規に構築した組換えウイルス作製系は、新たなウイルスベクター開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Host innate immune system is one of the primal host defense mechanism against invading pathogens, which is activated by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In this study, we tried to elucidate virus-host interactions, including interactions between virus and host innate immunity, by using Sendai virus, a prototype of mononegaviruses. We demonstrated 1. detailed functional maps of SeV C and V proteins in the context of real viral infection, 2. relationship between SeV infection and cell death events, such as apoptosis and necroptosis, 3. virus-derived molecules which strongly induce host innate immune responses and a possible mechanism of their production, 4. possible applications of our novel findings for developments of improved SeV vectors and highly effective vaccine adjuvants.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RNAウイルス 自然免疫 不完全ウイルス粒子 感染症 細胞死 ワクチン ウイルスベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの RNA ウイルス感染では、宿主の RNA ヘリカーゼである RIG-I や MDA5 等のセンサー分子 (RIG-I-like receptors: RLRs) が細胞質内でウイルス由来 RNA 分子を認識し、下流の転写因子 IRF3 が活性化され、インターフェロン (IFN) - 産生が誘導される。産生、分泌された IFN- は IFN レセプターを介して Jak/STAT 経路を活性化し、様々な IFN 誘導遺伝子 (ISGs) が発現する。これにより抗ウイルス状態が誘導され、ウイルス増殖が抑制、排除される。様々な RNA ウイルスが、この一連の経路に対して阻害的な作用を發揮し、自然免疫を回避することが明らかとなってきた。また最近、実際のウイルス感染で RIG-I や MDA5 のリガンドとして機能するウイルス由来 RNA 分子が解析されるとともに、RLRs によるこれらの RNA 認識の場として細胞質内にストレス顆粒様構造が形成されることなどが明らかにされたが、ウイルス RNA の修飾や上記構造物の形成阻害による認識回避メカニズムの存在も報告されている。

マイナス鎖 RNA ウイルス (NSV) は、インフルエンザ、エボラ、狂犬病、麻疹、牛痘など、ヒト及び動物の重要な感染症の原因ウイルスを数多く含むウイルス群である。その中でパラミクソウイルス科センドライウイルス (SeV) は、培養細胞系での増殖性の良さやヒトに病原性を持たない安全性、齧歯類の呼吸器病ウイルスでありマウスを用いた個体レベルでの解析が容易であるなどの理由から、NSV のプロトタイプとして重要な研究対象とされ、多くの成果に繋がってきた。

パラミクソウイルスの多くは、ウイルスの構造蛋白質の一つである P 蛋白質をコードする P 遺伝子から、P とは異なる ORF を使用したり、転写時のエディティングにより C や V と呼ばれる非構造蛋白質を産生する。これらの蛋白質はウイルス増殖に必須では無く、「アクセサリ蛋白質」と呼ばれているが、自然免疫関連分子との阻害的相互作用や分解の促進などにより、共通して自然免疫抵抗作用を發揮する事が明らかにされており、これらの蛋白質を欠損したウイルスの感染個体での病原性は著しく減弱するしかし近年の我々を含む多くのグループの研究から、アクセサリ蛋白質がウイルス RNA 合成や粒子形成、出芽など、ウイルスの生活環における様々な場面で重要な役割を果たしていることが明らかにされるとともに、自然免疫回避における様々な新しい役割が明らかとなってきた。一方これと同時に、既存の概念の様々な矛盾点、疑問点が発生してきている。

例えば、パラミクソウイルスの V 蛋白質は共通して MDA5 と阻害的に相互作用し、IFN 産生誘導を抑制することが多数報告されている。しかし一方で、ノックアウトマウスを用いた研究などから、パラミクソウイルス感染認識の主要センサー分子は MDA5 ではなく RIG-I である事が明らかにされており、この矛盾に対する明快な答えは得られていない。我々はこの解の一つとして、SeV を含む幾つかのパラミクソウイルス V 蛋白質が下流の転写因子 IRF3 と阻害的に相互作用し、上流のセンサー分子に依らずに効率よく IFN 産生を抑制するメカニズムを明らかにした。また、SeV V 蛋白質が RIG-I とも相互作用すること、MDA5 と既知ものとは異なる様式でも相互作用できることなどを見出した。

一方、SeV C 蛋白質は IFN 応答経路である Jak/STAT 経路の主要因子 STAT1 と阻害的に相互作用するが、N 末端の変化によって細胞質や核内に局在を変化させ、それぞれの場所で IFN 応答による抗ウイルス状態の誘導を抑制すること、平衡状態にある STAT1 構造を安定化させ、シグナル伝達を阻害すること、Jak/STAT 経路だけでなく IFN- 誘導経路に対しても阻害的作用を持つことなどを見出した。

さらに、自然免疫対抗作用を喪失した C 変異 SeV や、IFN- 誘導性の異なる SeV クローンなどの解析から、IFN- 誘導性の高い SeV では、RIG-I リガンドとして最近報告されているコピーバック型欠損干渉 (cbDI) ゲノムの産生や未同定二本鎖 (ds) RNA などの異常なウイルス由来 RNA 分子の産生が見られること、通常の SeV 感染ではこれらの異常な RNA 分子の産生は抑制され、自然免疫系に感知されにくい状態になっていること、宿主がこれらの異常な RNA 分子をその性質によって選択的に異なる細胞質内構造中に封入する機構が存在することなどを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、自然免疫を誘導するウイルス因子や自然免疫に抵抗する様々なメカニズムが報告されている一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスのプロトタイプの一つで、齧歯類の呼吸器病ウイルスであるセンドライウイルスをモデルに、我々の最新の知見を加えた *in vitro* 及び *in vivo* の解析から、ウイルス感染認識とその回避、病原性発現との関係について、統合的理解の構築を目指す。

具体的には、C 及び V 蛋白質の様々な宿主因子及びウイルス因子との相互作用の詳細を明らかにし、異常な IFN 誘導性ウイルス RNA 分子の産生を誘導する変異を同定することで、

各自然免疫抑制能や IFN- 誘導性 RNA 産生能を選択的に欠失または付加した組換えウイルスを作出することで、SeV 感染における各自然免疫誘導及び抑制要因の意義を *in vitro* 及び *in vivo* の解析により解明すること、また宿主が IFN 誘導性ウイルス RNA 分子を選択的に特定の細胞質内構造中に蓄積し、IFN 産性を誘導する機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

主に SeV C 及び V 蛋白質と自然免疫関連因子の抑制的相互作用様式を結晶構造解析やその他

の分子生物学的手法により解明して、各相互作用を喪失させる1~2アミノ酸置換を同定し、各相互作用の選択的欠失による機能的変化を *in vitro* で解析する。また、ヒト2万蛋白質を網羅したプロテインアレイ解析などにより、新規相互作用因子を同定し、同様の機能解析を行う。

また、IFN誘導性の異常なRNA分子産生を生じさせる変異を同定するとともに、これらのRNA分子を認識して細胞質内構造物中に選択的に蓄積する宿主メカニズムを探る。また、上記の結果を元に特定の自然免疫抑制能やIFN誘導性RNA産生能を欠失又は付与した組換えSeVを作製し、培養細胞や様々な自然免疫関連因子ノックアウトマウスを用いた個体での自然免疫応答、病原性の変化などについて詳細を検討する。

4. 研究成果

SeV C 及び V 蛋白質と既知宿主因子との相互作用及び機能を喪失するアラニン置換変異の解析

SeV C 蛋白質及び V 蛋白質に一連のアラニン置換を導入し、既知の宿主因子との相互作用 (C-STAT1, C-Alix, V-RIG-I, V-MDA5, V-IRF3) を喪失する変異をマッピングした。

また、このアラニン置換変異体を用いて、レポーターアッセイなどにより既知の機能と導入したアラニン変異の関係を培養細胞での蛋白質発現系レベルで網羅的に解析し、相互作用解析の結果と合わせて詳細な機能マップを作製した。

SeV C 蛋白質と相互作用する新規宿主因子の探索

SeV C 蛋白質と相互作用する新規宿主因子について、ヒト2万遺伝子を網羅したプロテインアレイを用いた結合解析による網羅的解析を行った。

他のウイルス蛋白質についても同様の解析を行い、相互作用強度の強かった候補100遺伝子をピックアップし、ウイルス増殖や自然免疫誘導性などに影響を与える因子について siRNA によるノックダウン系や、免疫沈降法による相互作用解析などにより、検討を進めている。

SeV C 及び V 蛋白質に任意の変異を導入可能な組換えウイルス作製系の構築

SeV C 及び V 蛋白質遺伝子は、P 遺伝子上にコードされ、コーディング領域がオーバーラップしている。このため、これらのうち1つの蛋白質に、他のアミノ酸配列に影響を与えないように任意の変異を導入した組換えウイルスを作製することは不可能である。

この制限を克服し、C 及び V 蛋白質に任意の変異を導入可能な組換えウイルス作製系の構築を目的とし、P 遺伝子上ではなく、ゲノム上に単独の遺伝子として C または V 遺伝子をコードし発現する組換えセンダイウイルス系を構築した (図1)。

C 及び V 蛋白質に一連のアラニン置換を導入した組換え SeV の作製とウイルスレベルでの機能解析

上記組換えウイルス作製系を利用し、C 蛋白質及び V 蛋白質に と同様に一連のアラニン置換を導入した組換えウイルスを作製し、培養細胞系でウイルスレベルでの種々の解析を行い、詳細な機能マップの作製に成功した (図2)。

で得られた結果と合わせることで、蛋白質レベルでの解析に比べ、実際のウイルス感染では各蛋白質のより幅広い領域が様々な機能に影響することが明らかとなっただけでなく、様々な機能間の繋がりを示唆する結果が得られた。

外来遺伝子の発現レベルを簡便に調節できる組換えセンダイウイルス系の作製

センダイウイルスでは、各遺伝子間は3塩基で区切られた状態でウイルスゲノム上にコードされている。本研究から派生して、上記組換えウイルスを利用して外来遺伝子 (蛍光蛋白質) を発現する組換えウイルスを作製し、その上流の HN 遺伝子との間の3塩基配列に一連の変異を導入し、各ウイルスの増殖、蛍光蛋白質の発現量を比較することで、遺伝子間3塩基配列が下流の遺伝子発現に及ぼす影響を詳細に検討した。この結果により、各遺伝子の発現量が遺伝子間配列の違いにより調節されていることを明らかにすると共に、外来遺伝子発現レベルを自在に調節した組換えセンダイウイルスの作製が可能となった (図3)。

SeV 感染によるネクロトーシスの誘導

上記研究の過程で、SeV C 蛋白質の小さいバリエーションである Y 蛋白質がネクロトーシスを誘導することを明らかにした。

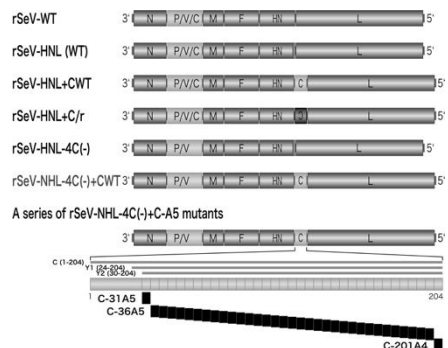


図1. C 蛋白質を単独遺伝子として発現する組換え SeV の構築と一連のアラニン置換の導入

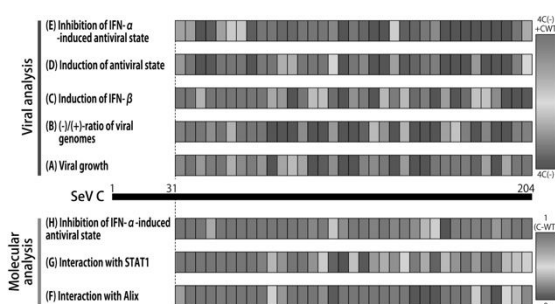


図2. SeV C 蛋白質の蛋白質レベル及びウイルスレベルでの詳細な機能マッピング

SeV V 蛋白質によるアポトーシス阻害機序の解明

SeV V 蛋白質は IRF3 と阻害的相互作用するが、この相互作用により Bax 依存的なアポトーシスの誘導が抑制されることを明らかにした。

自然免疫高誘導性ウイルス由来 RNA 分子を産生する SeV クローンの単離と解析

SeV を含むマイナス鎖 RNA ウイルスでは、コピーバック型欠損干渉ゲノムと呼ばれる小さい不全ゲノムが強力な RIG-I リガンドとなり、I 型 IFN 産生を誘導することが明らかとなってきた。このような欠損ゲノムは、通常のウイルス感染ではほとんど見られないが、実験的に高ウイルス量での継代を繰り返すことにより発生することが知られているが、その発生機序は全く分かっていない。我々は、このような不全ゲノムを恒常的に産生する SeV クローンの単離に成功し、その責任変異を同定することで、その発生機序の一端を明らかにすることに成功するとともに、このような不全ゲノムの産生がウイルスの病原性に与える影響を明らかにした。

SeV の高性能ワクチンアジュバントとしての利用

上記の不全ゲノム産生性 SeV を市販のインフルエンザワクチンに加えて接種することで、ワクチンの効果が著しく上昇することを見出した。

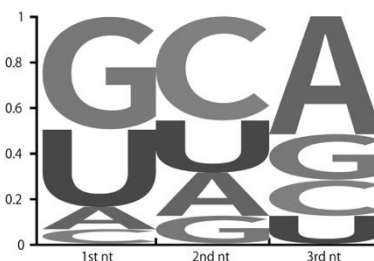


図 3. SeV 遺伝子間 3 塩基配列が下流遺伝子の発現に与える影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Irie T*, Sakai K, and Sakaguchi T
Development of New Concept Viral Vectors Exerting Both Vaccine and Adjuvant Activities.
IMPACT (Scinece Impact Ltd), 2019
2. 坂口剛正*、入江崇、小田康祐
センダイウイルスがインターフェロンに対抗する仕組み
日本ウイルス学会北海道支部会報, 50: 7-12, 2019
3. 入江崇*、酒井宏治、坂口剛正
ウイルスベクターワクチンの現状と展望
BIO Clinica, 34(2): 107-111, 2019
4. Moriyama M, Igarashi M, Koshihara T, Irie T, Takada A, and Ichinohe T*
Two Conserved Amino Acids within the NSs of SFTS Phlebovirus Are Essential for Anti-Interferon Activity.
J Virol, 92: e00706-18, 2018
5. Yoshida A, Kawabata R, Honda T, Sakai K, Ami Y, Sakaguchi T, and Irie T*
A Single Amino Acid Substitution within the Paramyxovirus Sendai Virus Nucleoprotein Is a Critical Determinant for Production of IFN- γ -Inducing Copyback-Type Defective Interfering Genomes.
J Virol, 92: e02094-17, 2018
6. Oda K, Oda T, Matoba Y, Sato M, Irie T, and Sakaguchi T*
Structural Analysis of the STAT1:STAT2 Heterodimer Revealed the Mechanism of Sendai Virus C Protein-Mediated Blockade of Type 1 Interferon Signaling.
J Biol Chem, 292: 19752-19766, 2017
7. Nomura T, Yoshimoto R, Kawabata R, Matsubara T, Narai S, Oda K, Fukushi M, Irie T, and Sakaguchi T*
Inactivation of Influenza Virus by a Supplemental Fermented Plant Product ("Manda Koso").
Hiroshima J Med Sci, 66: 97-101, 2017
8. Schock S, Chandra N, Sun Y, Irie T, Kitagawa Y, Gotoh B, Coscoy L, and Winoto A*
Induction of Necroptotic Cell Death by Viral Activation of the RIG-I or STING Pathway.
Cell Death Differ, 24: 615-625, 2017

[学会発表](計 19 件)

1. 酒井 宏治, 吉田 明日香, 川端 涼子, 坂口 剛正, 入江 崇「特異なセンダイウイルスクローンの単離とワクチンアジュバントとしての利用」第33回 インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 京都市, 京都, 2019.
2. 入江 崇「センダイウイルス～基礎ウイルス学から応用へ～」名古屋大学 第96回 創薬科学セミナー・GTRセミナー, 名古屋市, 愛知, 2019.

3. Yoshida, A., K. Sakai, R. Kawabata, T. Sakaguchi, and T. Irie. Characterization of a Sendai virus isolate producing copyback-type defective viral RNA and its potential as an effective vaccine adjuvant. Influenza and Other Infections Symposium, 東京, 2019.
4. 川端 涼子, 吉田 明日香, 中西 真人, 坂口 剛正, 入江 崇「新規組換えウイルス系を用いたパラミクソウイルスアクセサリー蛋白質の機能解析」Negative Strand Virus-Japan Symposium 2019, 宜野湾市, 沖縄, 2019.
5. Irie, T., R. Kawabata, A. Yoshida, M. Nakanishi, and T. Sakaguchi. Detailed functional mapping of the paramyxovirus accessory proteins in viral infection. 第66回 日本ウイルス学会学術集会, 京都, 京都, 2018.
6. 入江 崇「センダイウイルス：アジュバント活性を有するワクチンベクターとしての可能性」阪大微生物病研究会 講演会, 観音寺, 香川, 2018.
7. Yoshida, A., K. Sakai, R. Kawabata, T. Sakaguchi, and T. Irie. Characterization of a Sendai virus isolate producing copyback-type defective viral RNA and its potential as a vaccine adjuvant. The 17th Awaji International Forum in Infection and Immunity, Awaji, Japan, 2018.
8. 入江 崇「ヒトに病気をおこさないウイルスを研究する～基礎ウイルス学と応用展開～」2018年度 富士フィルム和光純薬株式会社 夏季研修会, 広島, 広島, 2018.
9. Kawabata, R., A. Yoshida, T. Sakaguchi, and T. Irie. Detailed functional mapping of the paramyxovirus accessory proteins in viral infection. 16th International Conference of Negative Strand Viruses, Verona, Italy, 2018.
10. 川端 涼子, 吉田 明日香, 小田 康祐, 坂口 剛正, 入江 崇「新規組換えウイルス系を用いたパラミクソウイルスアクセサリー蛋白質の機能解析」第33回 中国四国ウイルス研究会, 岡山, 岡山, 2018.
11. 入江 崇「センダイウイルス感染における細胞死の制御」Negative Strand Virus-Japan Symposium 2018, 糸満市, 沖縄, 2018.
12. Irie, T., R. Kawabata, A. Yoshida, I. Okamoto, J. Miyake, K. Oda, and T. Sakaguchi. A novel anti-apoptotic role of Sendai virus V protein via its interaction with IRF3. 第65回 日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 大阪, 2017.
13. Kawabata, R., A. Yoshida, M. Nakanishi, H. Sho, H. Natsuhara, T. Sakaguchi, and T. Irie. A regulatory role of intergenic trinucleotides in Sendai viral gene expression. 第65回 日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 大阪, 2017.
14. 入江 崇「私的センダイウイルス研究の過去と未来」第5回 関西ウイルスクラブ, 大阪, 吹田, 2017.
15. Irie, T., R. Kawabata, A. Yoshida, I. Okamoto, and T. Sakaguchi. Sendai virus V protein plays an antiapoptotic role during infection. The 17th International Congress of Virology, Singapore, Singapore, 2017.
16. 川端 涼子, 吉田 明日香, 中西 真人, 章 博浩, 夏原 啓暉, 坂口 剛正, 入江 崇「モノネガウイルス遺伝子間塩基配列の発現制御機能」第32回 中国四国ウイルス研究会, 倉敷, 岡山, 2017.
17. 入江 崇, 坂口 剛正「センダイウイルス-宿主自然免疫相互作用の解析とその応用展開 - アジュバント+ワクチン・ハイブリッドウイルスベクターの可能性 -」平成29年度 中国四国乳酸菌研究会, 岡山, 岡山, 2017.
18. Kawabata, R., K. Oda, T. Sakaguchi, and T. IRIE. Selective manipulation of multi-functional Sendai virus C protein by single amino acid substitutions. 第64回 日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 北海道, 2016.
19. 川端 涼子, 小田 康祐, 坂口 剛正, 入江 崇「センダイウイルスアクセサリー蛋白質機能の選択的操作」第31回 中国四国ウイルス研究会, 鳥取, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<https://home.hi-roshima-u.ac.jp/isaikin/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：坂口 剛正
ローマ字氏名：SAKAGUCHI, takemasa
所属研究機関名：広島大学
部局名：大学院医歯薬保健学研究科（医）
職名：教授
研究者番号（8桁）：70196070

研究分担者氏名：本田 知之
ローマ字氏名：HONDA, tomoyuki
所属研究機関名：大阪大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：80402676

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：酒井 宏治
ローマ字氏名：SAKAI, kouji

研究協力者氏名：網 康至
ローマ字氏名：AMI, yasushi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。