

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15258

研究課題名(和文)シグナル伝達抑制による新規抗ウイルス戦略への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to novel antiviral strategy by suppressing signal transduction pathway

研究代表者

松川 昭博 (MATSUKAWA, AKIHIRO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90264283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ウイルス感染のメカニズムをRas-Raf-ERK/MAPKとその内因性抑制因子Spred2の観点から明らかにし、Spred2の補充によるERK抑制を介した抗ウイルス戦略に挑戦した。Spred2遺伝子導入により、ERK-MAPKの活性化は抑制され、ウイルス感染は抑制できた。Spred2過剰発現マウスでのウイルス感染に差はなく、生来発現するSpred2に必要な抑制系は作動していると考えられた。今回作製した膜透過性ペプチドを付加したSpred2はERK活性化を抑制できなかったが、機能性Spred2タンパクの補充は、新しい抗ウイルス薬となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により、Spred2導入によるウイルス感染制御を確認できた。Spred2過剰発現マウスの検討から、健常時は生来発現するSpred2により必要な抑制系は作動していると考えられた。本研究により、ヒトインフルエンザ感染血清や肺線維症肺での解析も実施できた。これらの疾患時に、膜透過性ペプチドを付加した機能性Spred2タンパクを補充できれば、汎用性の高い新しい抗ウイルス薬となる可能性が示唆された。これらの臨床データをもとに、新たな抗ウイルス戦略が期待できた意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the mechanism of viral infection from the viewpoint of Ras-Raf-ERK / MAPK and its endogenous suppressor Spred2, and we challenged the antiviral strategy via ERK suppression by supplementation of Spred2. Activation of ERK-MAPK and viral infection were suppressed by Spred2 gene transfer. There was no difference in virus infection in Spred2 overexpressing mice, suggesting that the endogenous Spred2 is sufficient to inhibit the infection. Cell-penetrating Spred2 created in this study failed to inhibit ERK activation, however, supplementation of functional Spred2 protein may become a new antiviral drug.

研究分野：実験病理学

キーワード：感染症 シグナル伝達抑制

1. 研究開始当初の背景

新興感染症の多くは未知のあるいは変異したウイルス感染である。これまで開発されてきた薬剤は、ウイルスの複製・増殖をターゲットとしたものが多い。しかし新興感染症には無効である場合が多く、新しい治療法の開発が求められている。最近、ウイルス感染における Ras-Raf-ERK-MAPK 経路の関与が注目されている。MDCK 細胞への H1N1/PR8 感染は ERK インヒビター-U0126 で抑制される。ERK はウイルスゲノムの入ったリボヌクレオタンパク (RNP) の核外移行にも関わる。申請者は、ERK 経路とその内因性抑制因子である Spred (Sprouty-related EVH1-domain-containing protein)-2 に焦点をあて複数の動物モデルを用いて ERK-MAPK の分子基盤を解析してきた。インフルエンザ感染モデルの解析では、Spred2 欠損マウスはインフルエンザウイルス (H1N1/PR8) 感染に脆弱で、感染肺でのウイルス量は野生型に比べて有意に高値を示した。気道上皮細胞 MLE-12 の Spred2 を siRNA で消去すると、H1N1/PR8 感染による ERK 活性は増強し、ウイルス感染は増悪した。この結果から、ERK 経路はウイルスの細胞内進入 (感染) のキープレーヤーではないか、との着想に至った。Spred2 による ERK 抑制がウイルス感染制御に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

ウイルス感染のメカニズムをシグナル伝達の観点から明らかにし、Spred2 による ERK 抑制によりウイルス感染を制御するという新たな抗ウイルス戦略に挑戦する。本研究課題では、Spred2 導入によるウイルス制御を確認後、膜透過性ペプチドを付加した機能性 Spred2 タンパクを作製し、汎用性の高い新しい抗ウイルス薬の開発に繋げる。Spred2 によるウイルス感染制御を証明することにより、シグナル伝達とウイルス感染の新しいパラダイムを形成する。本研究課題の遂行により抗ウイルス戦略に卓越した成果が期待でき、社会への波及効果は極めて大きい。

3. 研究の方法

本研究では、以下の検討によって Spred2 による ERK 経路の制御が抗ウイルス戦略に有効であることを示し、Spred2 による革新的抗ウイルス治療戦略に挑戦することとした。

- ① Spred2 過剰発現によるウイルス感染抑制
Spred2 過剰発現プラスミドを肺胞上皮細胞等に導入し、ウイルス感染への影響をみる。
- ② Spred2 過剰発現によるインフルエンザ感染抑制
独自に作製した Spred2 過剰マウスにインフルエンザ感染を誘導する。
- ③ Spred2 ペプチド導入によるウイルス感染防止への取組
常時 Spred2 を高発現する肺胞上皮細胞株を作成してウイルス感染への影響をみる。次に、膜透過性ペプチドを付加した機能性 Spred2 を作製し、ウイルス感染への影響をみる。

4. 研究成果

1) Spred2 過剰発現ベクター作成と H1N1/PR8 感染実験

His-Tag をつけた Spred2 発現ベクターを作成した。これを肺胞上皮細胞に導入し、Spred2 を過剰発現させた。Spred2 の過剰発現は、mRNA の上昇に加え、抗 His-Tag 抗体によるタンパク発現で確認した。また、新規にポリクローナル抗 Spred2 抗体を作製した。抗体の特異性確認は、Spred2 過剰発現時に抗 His-Tag 抗体と同じ位置にバンドに検出できることで確認した。同抗体は免疫染色にも有効であった。肺胞上皮細胞やマクロファージに H1N1/PR8 を感染させると ERK-MAPK の活性化が誘導されるが、Spred-2 遺伝子導入により、ERK-MAPK の活性化は抑制された。このとき、感染細胞からのウイルスタンパクは有意に減少したことから、Spred2 導入により、ウイルス感染が抑制できることを明らかにできた。次に、Spred2 導入遺伝子に修飾を加え、核内に留まるタイプ、核外に排出されるタイプを作製した。いずれも Spred2 の高発現を確認できたが、核内に留まるタイプでもっとも強い細胞遊走能抑制効果を発揮した。また、この機能をつかさどるタンパク活性部位を調べるため、異なるサイズの Spred2 発現ベクターを作製して活性部位候補の同定を行った。

2) Spred-2 過剰発現によるインフルエンザ感染抑制

遺伝子改変マウスの作出に成功し、Spred2 過剰発現マウスの繁殖を開始した。過剰発現マウスのマクロファージにおいて、刺激により Spred2 過剰発現マウスで有意な発現量の増加を確認できた。Spred-2 過剰発現マウスに H1N1/PR8 の感染実験を行ったところ、感染肺の重症度に大きな違いを見ていない。Spred2 欠損マウスでは病状の悪化を確認しているため (Crit Care Med. 2016 Jul; 44(7):e530-43)、生来発現する内因性 Spred2 で必要な抑制系は作動していると考えられる。引き続き、ウイルス感染量を増減するなどして、さらなる検討を行う必要がある。

3) Cell-penetrating peptide (CPP)-Spred2 の作成と効果検証

常時 Spred2 を高発現する肺胞上皮細胞株の作成を試みた。一過性発現は問題なく作製できたが、Spred2 の細胞毒性のため常時発現細胞の確立には至らなかった。そこで、膜透過性ペプチドを付加した機能性 Spred2 作製することとした。CPP として、HIV-1 の Tat タンパク質由来の塩基性ペプチド (TAT: GRKKRRQRRPPQ) を Raf 結合部位 (Spred2 は Raf に結合して、Raf-Ras-ERK-MAPK を抑制する) が近い C 末端側に組込んだ遺伝子組換え体 (pET21a h-spred2-TAT) を作製し、大腸菌 BL21(DE3) で大量発現させた。通常の可溶性タンパクとして抽出が困難であったため、封入体可溶化し、His-tag 精製を行い、dropping 法でリフォールディングして濃縮して TAT-spred2 タンパクを得た。得られた TAT-Spred2 を H1993 細胞 (肺癌由来細胞株) および HepG2 細胞 (肝癌由来細胞株) に添加したところ、いずれの添加細胞でも Spred2 タンパクの強発現を確認できた。しかし、ERK 活性化は抑制できず、また、Ras-Raf-ERK 活性阻害で起こるべき細胞増殖抑制も確認できなかった。FGF 刺激により、Raf-Ras-ERK-MAPK 活性化を誘導した状況でも、同様の結果であった。以上より、作製した TAT-Spred2 タンパクは細胞内には導入されるものの、その機能を発揮しないと判断した。リフォールディング時の問題でタンパク質の構造に問題が生じ、Raf に結合できない可能性、結合してもキナーゼとの作用部位に問題がある可能性が考えられた。Spred2 の結合部位、機能部位に対する最小ドメインを決定し、同部位に対する TAT 融合タンパクを発現・精製を試みている。

4) ヒトインフルエンザ感染血清を用いての検討

インフルエンザ A (pd2009H1N1) で死亡した剖検肺では、ERK-MAPK の活性化と Spred2 の発現が検出された。インフルエンザ感染時のサイトカイン産生は ERK-MAPK-Spred2 により制御される可能性がある。そこで、小児インフルエンザ肺炎患者 10 例、インフルエンザ脳症患者 10 名、非感染性患者 6 名 (= 対照群) の血清中のサイトカイン量を測定した (岡山大学倫理審査委員会承認)。より重篤な脳症患者では、肺炎患者に比べて、IFN- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10 は高い傾向を示し、MCP-1 は有意に高値であった。この結果は、上記サイトカインが脳症発生に関わる可能性を示している。

5) ヒト肺線維症肺を用いての検討

Spred2 欠損マウスにおいて、ブレオマイシン (Bleomycin) 誘導肺線維症は軽減することを見出している。このことは、本プロジェクトの目的である Spred2 補充療法が肺線維症の新たな治療につながる可能性を示唆する。そこで、実際の肺線維症患者の摘出肺での Spred2 発現量について、非線維症肺を対照として比較検討した (岡山大学倫理審査委員会承認)。その結果、肺線維症では、Spred2 発現量は有意に高値を示した。内因性 Spred2 は線維化に対して対症的に発現上昇し、その抑制に寄与するものの、発現量が不十分で線維化抑制に至らない仮説にたてば、Spred2 補充は線維化抑制につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

Imakita N, Kitabatake M, O uji-Sageshima N, Hara A, Morita-Takemura S, Kasahara K, Matsukawa A, Wanaka A, Mikasa K, Ito T. Abrogated Caveolin-1 expression via histone modification enzyme Setdb2 regulates brain edema in a mouse model of influenza-associated encephalopathy. *Sci Rep.* 2019 Jan 22;9(1):284. doi: 10.1038/s41598-018-36489-8. 査読有

Ohkura T, Yoshimura T, Fujisawa M, Ohara T, Marutani R, Usami K, Matsukawa A. Spred2 Regulates High Fat Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation, and Metabolic Abnormalities in Mice. *Front Immunol.* 2019 Jan 22;10:17. doi: 10.3389/fimmu.2019.00017. eCollection 2019. 査読有

Imakita N, Kitabatake M, O uji-Sageshima N, Hara A, Morita-Takemura S, Kasahara K, Matsukawa A, Wanaka A, Mikasa K, Ito T. Abrogated Caveolin-1 expression via histone modification enzyme Setdb2 regulates brain edema in a mouse model of influenza-associated encephalopathy. *Sci Rep.* 2019 Jan 22;9(1):284. doi: 10.1038/s41598-018-36489-8. 査読有

Okada M, Yamane M, Yamamoto S, Otani S, Miyoshi K, Sugimoto S, Matsukawa A, Toyooka S, Oto T, Miyoshi S. SPRED2 deficiency may lead to lung ischemia-reperfusion injury via ERK1/2 signaling pathway activation. *Surg Today.* 2018 Dec;48(12):1089-1095. doi: 10.1007/s00595-018-1696-x. 査読有

Yang X, Fujisawa M, Yoshimura T, Ohara T, Sato M, Mino M, San TH, Gao T, Kunkel SL, Matsukawa A. Spred2 Deficiency Exacerbates D-Galactosamine/Lipopolysaccharide-induced Acute Liver Injury in Mice via Increased Production of TNF- α . *Sci Rep.* 2018 Jan 9;8(1):188. 査読有

Itakura J, Sato M, Ito T, Mino M, Fushimi S, Takahashi S, Yoshimura T, Matsukawa A. Spred2-deficiency Protects Mice from Polymicrobial Septic Peritonitis by Enhancing

Inflammation and Bacterial Clearance. Sci Rep. 2017 Oct 9;7(1):12833. doi: 10.1038/s41598-017-13204-7. 査読有
Takahashi S, Yoshimura T, Ohkura T, Fujisawa M, Fushimi S, Ito T, Itakura J, Hiraoka S, Okada H, Yamamoto K, Matsukawa A. A Novel Role of Spred2 in the Colonic Epithelial Cell Homeostasis and Inflammation. Sci Rep. 2016 Nov 21;6:37531. doi: 10.1038/srep37531. 査読有
Ito T, Itakura J, Takahashi S, Sato M, Mino M, Fushimi S, Yamada M, Morishima T, Kunkel SL, Matsukawa A. Sprouty-Related Ena/Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Homology 1-Domain-Containing Protein-2 Critically Regulates Influenza A Virus-Induced Pneumonia. Crit Care Med. 2016 Jul;44(7):e530-43. doi: 10.1097/CCM.0000000000001562. 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

Ohkura T, Yoshimura T, Matsukawa A. Spred2 deficiency exacerbates adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance in mice. 日本免疫学会学術集会、2018 年
太田陽子、藤澤真義、吉村禎造、Wayan SI, 阪口政清、豊岡伸一、松川昭博 肺腺癌における Spred2 の役割の解明 日本病理学会学術集会、2018 年
河原明奈、水田亮、藤澤真義、吉村禎造、松川昭博 プレオマイシン肺線維症モデルにおける Spred-2 の役割 日本病理学会学術集会、2018 年
Ohkura T, Marutani R, Yoshimura T, Fujisawa M, Ohara T, Matsukawa A. Spred2 deficiency exacerbates visceral adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. 日本病理学会学術集会、2018 年
Sun C, Yshimura T, Fujisawa M, Ohara T, Yang Xu, Matsukawa A. Spred-2 protects mice from ConA-induced liver injury. 日本病理学会学術集会、2018 年
松川昭博 Ras-Raf-ERK/MAPK 経路とその制御因子 Spred2 による炎症・がんの制御 日本病理学会学術集会、2018 年
河原明奈、藤澤真義、吉村禎造、松川昭博 間質性肺炎モデルにおける Spred-2 の役割 日本病理学会総会、2017
楊旭、吉村禎造、藤澤真義、大原利章、佐藤美和、美野愛、松川昭博 Spred-2 欠損は GalN/LPS 誘導性の急性肝障害を悪化させる 日本病理学会総会、2017 年
小田晋輔、藤澤真義、吉村禎造、大原利章、河原明奈、山口隆廣、太田陽子、松川昭博 膀胱腫瘍における Ras-ERK 経路とその制御因子 Spred-2 の解析 日本病理学会総会、2017 年
Xu Y, Shimura T, Fujisawa M, Ohara T, Sun C, Matsukawa A. Spred-2 deficiency exacerbates lipopolysaccharide (LPS)/D-galactosamine (D-GalN) induced liver injury. Cytokine、2017 年
Sun C, Yoshimura T, Fujisawa M, Ohara T, Xu Y, Matsukawa A. Spred-2 protects mice from ConA-induced liver injury. Cytokine、2017 年
楊旭、吉村禎造、藤澤真義、山口隆廣、小田晋輔、佐藤美和、美野愛、松川昭博 Spred-2 欠損は GalN/LPS 誘導性の急性腎障害を悪化させる 日本炎症再生医学会、2016 年
藤井裕生、何佳利、吉村禎造、藤澤真義、佐藤美和、楊旭、松川昭博 Spred-2 欠損によるシスプラチン腎障害憎悪における好中球の関与 日本病理学会総会、2016 年
楊旭、吉村禎造、藤澤真義、大原利章、山口隆廣、タテサン、小田晋輔、佐藤美和、美野愛、松川昭博 Spred-2 欠損は GalN/LPS 誘導性の急性腎障害を悪化させる 日本病理学会総会、2016 年
松川昭博 Spred-2 による炎症の制御 日本病理学会総会、2016 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/byouri/pathology-1/HOME.html>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：楊旭、孫翠明、高桐、宮武秀行、近藤聖之

ローマ字氏名：(Yang Xu)、(Sun Cuiming)、(Gao Tong)、(Miyatake Hideyuki)、(Kondo Masayuki)

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。