

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08620

研究課題名(和文) 閉塞性肺疾患気道上皮細胞のC型ライノウイルス放出量定量化法の確立

研究課題名(英文) Development of methods to quantify the release of type C rhinovirus from airway epithelial cells obtained from patients with obstructive pulmonary diseases

研究代表者

山谷 睦雄 (Yamaya, Mutsuo)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60261640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面の洗浄液中のウイルスRNAを測定する方法を用いて、ヒト鼻腔粘膜上皮細胞(HNE細胞)から放出されるC型ライノウイルス(RV-Cs)の定量法を確立した。プロトンATPase阻害薬のバフィロマイシンはRV-C03および炎症性サイトカインの放出量、酸性エンドソーム数を減少させた。この結果から酸性エンドソームを介したRV-Csの増殖経路が明らかになり、エンドソームpHを上昇させる薬剤のRV-Cs増殖抑制作用が示唆された。また、重症喘息発作の関係が報告されているRV-Cs感染受容体CDHR3遺伝子G/Aを有するHNE細胞および喘息症例のHNE細胞におけるRV-C03放出量の増加傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でヒト鼻腔粘膜上皮細胞(HNE細胞)をフィルター膜に培養し、粘膜側の細胞表面を培養液で洗浄することによりHNE細胞から放出されたC型ライノウイルスを回収し、RNAを定量化してウイルス放出量を測定する方法を確立した。さらに、B型ライノウイルスと同様に、C型ライノウイルスにおいても酸性エンドソームが細胞質への侵入経路であることを明らかにした。C型ライノウイルスの感染は炎症性サイトカイン放出などを介して重症喘息発作に関係し、感染治療薬の開発が待たれる分野であるため、ウイルス放出量の定量化法や侵入経路が明らかになったことで今後の感染阻害薬の創薬開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Rhinovirus species C (RV-C) causes more severe asthma attacks than other rhinovirus species. However, a method to quantify the release of RV-Cs from airway cells and the replication pathway of RV-Cs has not been well studied. Pretreatment of primary human nasal epithelial (HNE) cells with the specific vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor bafilomycin A1 reduced the RV-C03 RNA levels in the ASL (airway surface liquid); inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8, in the supernatant; and the number of acidic endosomes where RV-B RNA enters the cytoplasm. The levels of RV-C03 RNA in the ASL obtained from HNE cells with the CDHR3 rs6967330 G/A genotype tended to be higher than those obtained from HNE cells with the G/G genotype. RV-C03 RNA levels in the ASL of patients with asthma tended to be higher than those of patients without asthma. We demonstrated a method to quantify the release of RV-Cs. RV-Cs may be sensitive to drugs that increase endosomal pH in HNE cells.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：C型ライノウイルス ウイルス放出量定量化 マクロライド 炎症性サイトカイン 気道上皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ライノウイルスはウイルスカプシドの遺伝子型に基づく新規の分類法により、A型、B型、C型に分類されている(以後 RV-A、RV-B、RV-C と記載)<sup>1)</sup>。この内、C型ライノウイルス(RV-Cs)の感染により気管支喘息の重症化がもたらされることが報告されているが<sup>2)</sup>。ヒト気道上皮細胞で増殖した RV-Cs の放出量の定量法は確立されていなかった。そのため、ウイルスの増殖・放出の病態やウイルスの増殖経路、ウイルスの増殖を制御する薬剤は不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) C型ライノウイルス(RV-C03)をヒト気道上皮初代培養細胞に感染させ、培養液への細胞外放出量の定量化法を確立する。

(2) RV-C03 の増殖を抑制する薬剤を検討し、増殖経路を探求する。

(3) A型(RV-A16)およびB型(RV-B14)ライノウイルスの放出量との相違を検討する。

(4) 気管支喘息患者の気道上皮における RV-C03 の増殖の特徴を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト鼻腔粘膜上皮細胞の培養

ヒト鼻ポリープは慢性鼻副鼻腔炎の患者45名(年齢:  $55 \pm 2$  歳、平均年齢 $\pm$ 標準誤差、女性18名、男性27名、気管支喘息症例17名、非気管支喘息症例28名)から内視鏡手術の際に提供を受け、研究に使用した。本研究は東北大学医学部倫理委員会(承認番号: 2018-1-15 および 2021-1-088)および山形大学医学部倫理委員会(承認番号: 2021-75)の承認を受けて実施された。

ヒト鼻腔粘膜上皮細胞(HNE細胞)はヒト鼻ポリープをプロテアーゼ処理して単離され、フィルター膜(Transwell、Corning社)の上に培養した<sup>3)</sup>。

#### (2) ウイルスストックの作成

ライノウイルス(RV-A16、RV-B14、RV-C03、およびRV-C25)は風邪症状の患者から分離され、増殖したウイルスを用いた。RV-A16、RV-C03 およびRV-C25 をフィルター膜に培養したHNE細胞の粘膜側に感染させ、3日~5日間培養し、粘膜側に放出したウイルスを培養液で洗浄してASL (airway surface liquid; 気道表面被覆液)として回収し、ウイルスストックとして用いた<sup>3)</sup>。RV-B14 は線維芽細胞で増殖した。

#### (3) ASL に放出されたウイルス量の測定

ASL に含まれるライノウイルス(RV-A16、RV-B14、RV-C03、RV-C25)の放出量は、SYBR Green アッセイ法を用いた real-time quantitative reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) 法でウイルス RNA を定量化することで測定した<sup>4)</sup>。

#### (4) HNE 細胞のライノウイルス感染と ASL の回収

ライノウイルス(RV-C03、RV-C25、RV-A16)のストック液のウイルス量がRV-B14に換算して  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL になるように希釈し、フィルター膜に培養した細胞に加えて感染し、培養した<sup>5)</sup>。

#### (5) 薬剤添加法

RV-B14 は酸性エンドソームを経由して増殖し、プロトン ATPase 阻害薬でありマクロライドであるバフィロマイシンによって増殖が阻害することを以前に報告している<sup>5)</sup>。そのため、RV-C03 も同じ経路で増殖するかどうかを、バフィロマイシンを用いて検討した。

#### (6) C型ライノウイルス受容体の遺伝子変異解析

RV-Cs の感染受容体が CDHR3 (Cadherin related family member 3)であり、CDHR3 rs6967330 の遺伝子変異(G→A)による CDHR3 発現量の増加とウイルス増殖増加の関係が気管支上皮細胞で指摘されている<sup>6)</sup>。そのため、HNE 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法で CDHR3 遺伝子変異を解析した<sup>7)</sup>。プライマーおよびプローブは過去の報告を基に設計した<sup>7)</sup>。

#### (7) 酸性エンドソーム測定

RV-C03 の増殖経路と細胞内のエンドソーム pH、酸性エンドソーム数との関係を LysoSensor DND-189 dye (Molecular Probes 社、米国)の色素で HNE 細胞を染色して蛍光顕微鏡で調べた<sup>3)</sup>。

#### (8) 炎症性サイトカイン測定

培養液中に放出される炎症性サイトカインは漿膜側培養液を回収して測定した。インターロイキン(IL)-1 $\beta$  と IL-6 は ELISA 法で、IL-8 は酵素免疫法で測定した。

## 4. 研究成果

(1) C型ライノウイルスの細胞外放出量の定量化法を確立した。

RV-C03 は感染 24 時間後に ASL 中および細胞内に検出され、最大値は感染 72 時間と 120 時間の間で観察された(図 1 A、B)。

(2) 確立した方法を用いて、C型ライノウイルスの増殖経路を明らかにした。

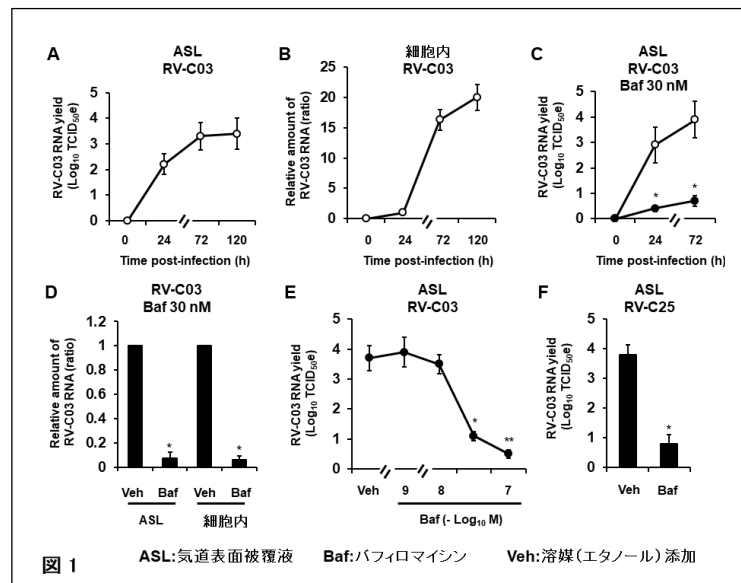


図 1

バフィロマイシンを HNE 細胞に作用した場合に RV-C03 放出量は減少し(図 1 C、D)、濃度依存性の減少効果を示した((図 1 E)、また、細胞内のウイルス RNA 量も減少し((図 1 D))、別の型の C 型ライノウイルス(RV-C25)の ASL 放出量もバフィロマイシンの作用で減少した((図 1 F)。

(3) C型ライノウイルス受容体 CDHR3 の遺伝子型とウイルス放出量、気管支喘息との関係を検討した。

遺伝子型を解析した 26 症例のうち G/A 遺伝子は 5 症例で認め、G/G 遺伝子型は 21 症例で認めた。G/A 遺伝子型を示した HNE 細胞から ASL に放出される RV-C03 ウイルス量は G/G 遺伝子型を示した HNE 細胞から ASL に放出される RV-C03 ウイルス量に比べて増加傾向を示した(図 2 A)。しかし、統計上の有意

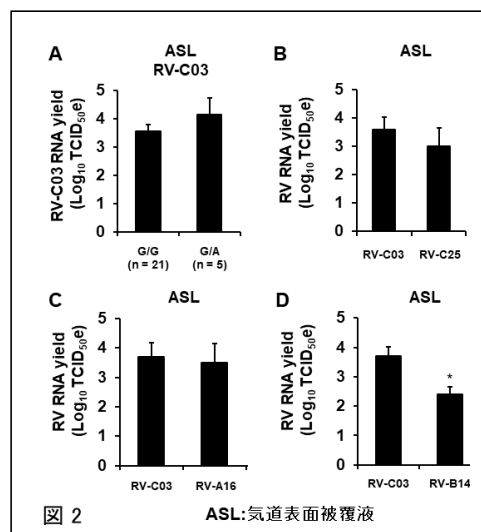


図 2

差は認めなかった。喘息症例から採取した HNE 細胞でも RV-C03 放出量は増加傾向を示した。

(4) B 型ライノウイルスに比較した C 型ライノウイルスの放出量増加を確認した。

RV-C25 および RV-A16 の放出量は RV-C03 の放出量と差がなかった (図 2 B、C)。これに対し

て、RV-C03 の放出量は RV-B14 の放出量に比べて増加した (図 2 D)。

(5) C 型ライノウイルスの放出に対する薬剤の抑制作用を明らかにした。

酸性エンドソーム数を減少させ

る効果を有するバフィロマイシン、EIPA、クラリスロマイシン(CAM)、および抗菌活性を有しないマクロライドである EM900 は RV-C03 放出量を減少した (図 3 A)。バフィロマイシンは、RV-C の受容体である CDHR3 の mRNA 発現量を減少させた (図 3 B)。

(6) 薬剤添加による酸性エンドソーム数の減少を明らかにした。

酸性エンドソームは HNE 細胞内に緑色の顆粒状に観察された (図 4 A)。バフィロマイシンの培養液添加によって酸性エンドソーム数が減少した (図 4 B)。

酸性エンドソームから発生する蛍光の強度はバフィロマイシンを作用させてからの時間経過とともに減少した (図 4 C)。

また、EIPA、クラリスロマイシン(CAM)、EM900 の添加によっても、酸性エンドソームから発生する蛍光の強度は減少した。(図 4 D)

(7) C 型ライノウイルス感染による炎症性サイトカイン放出量の増加とバフィロマイシンの抑制効果を明らかにした。

RV-C03 感染前後に HNE 細胞漿膜側培養液に放出される炎症性サイトカイン量を測定した。IL-1 $\beta$  は感染 24 時間までは検出感度以下であったが、72 時間で上昇し、測定が可能な濃度になった。バフィロマイシンを HNE 細胞に作用させた場合に感染 72 時間後の IL-1 $\beta$  の放

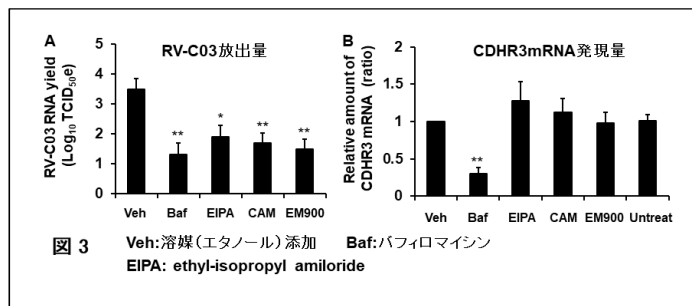


図 3 Veh: 溶媒 (エタノール) 添加 Baf: バフィロマイシン  
EIPA: ethyl-isopropyl amiloride

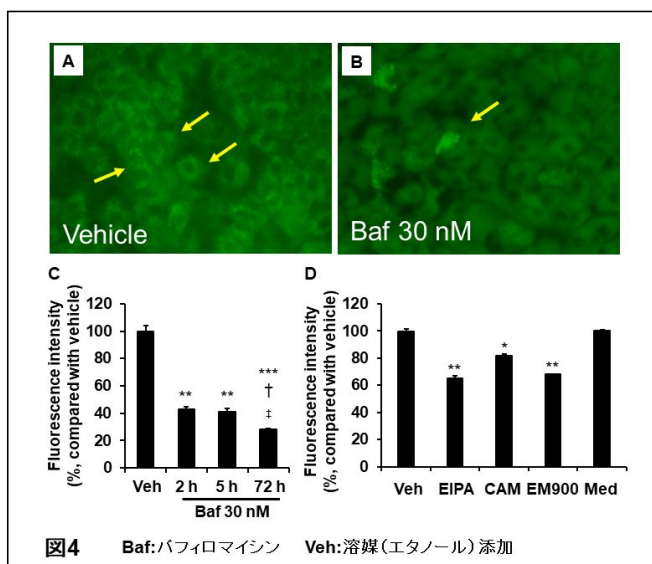


図 4 Baf: バフィロマイシン Veh: 溶媒 (エタノール) 添加

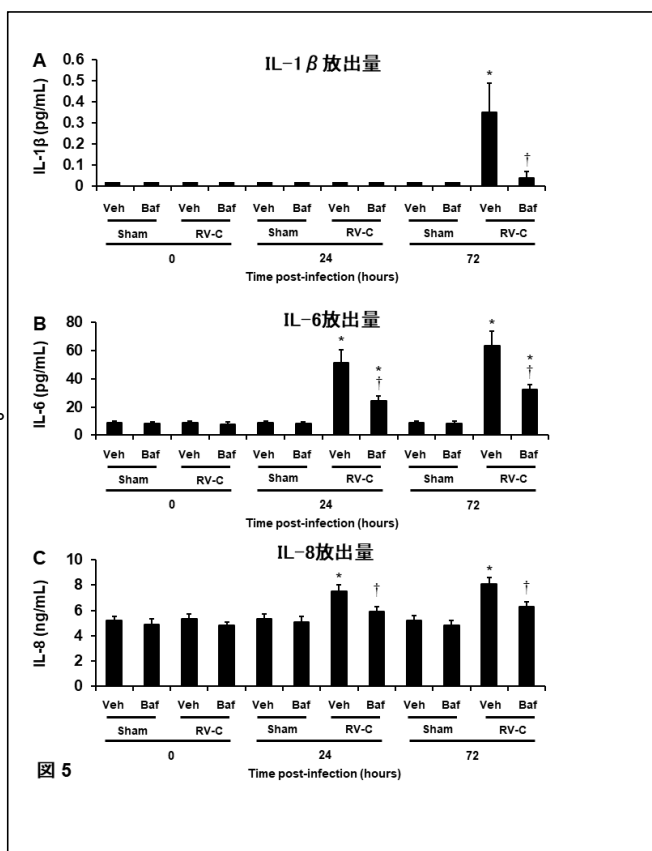


図 5 Time post-infection (hours)

出量は減少した(図5A)。これに対し、

IL-6 および IL-8 の培養液濃度は感染前でも検出可能な濃度であった。さらに感染 24 時間および 72 時間後に放出量は増加した。また、バフィロマイシンを HNE 細胞に作用させた場合に感染 24 時間および 72 時間後の IL-6 および IL-8 放出量は減少した(図5B、C)。

#### (8) 研究成果のまとめ

ヒト気道上皮(HNE)初代培養細胞に C 型ライノウイルスを感染させ、細胞から放出されるウイルス量を定量化する方法を確立した。今後、C 型ライノウイルスの増殖を抑制する薬剤の創薬に応用できる方法になると期待される。さらに、HNE 細胞内のエンドソーム pH を上昇させる性質を有するバフィロマイシンや、臨床で使用されるマクロライドであるクラリスロマイシン、抗菌活性を持たないマクロライドである EM900 による C 型ライノウイルスの増殖・放出抑制効果を認めた。これらの結果は、酸性エンドソームが C 型ライノウイルスの増殖経路であることを示すとともに、エンドソームの pH を上昇させる薬剤が C 型ライノウイルスの増殖・放出を抑制させる可能性が示唆された。また、B 型ライノウイルスに比べた C 型ライノウイルスの放出量の増加と、気管支喘息の重症化に関係する C 型ライノウイルス感染受容体の遺伝子変異を有する HNE 細胞における C 型ライノウイルスの放出量の増加傾向を認めた。

#### 引用文献

Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus, *J Allergy Clin Immunol* 125, 1190-1199, 2010.

Bizzintino J, Lee WM, Laing IA, et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma children, *Eur Respir J* 37, 1037-1042, 2011.

Yamaya M, Nishimura H, Deng X, et al. Inhibitory effects of glycopyrronium, formoterol and budesonide on coronavirus HCoV-229E replication and cytokine production by primary cultures of human nasal and tracheal epithelial cells, *Respir Investig* 58, 155-168, 2020.

Nakagome K, Bochkov YA, Ashraf S, et al. Effects of rhinovirus species on viral replication and cytokine production, *J Allergy Clin Immunol* 134, 332-341, 2014.

Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, et al. Bafilomycin A<sub>1</sub> inhibits rhinovirus infection in human airway epithelium: effects on endosome and ICAM-1, *Am J Physiol* 280, L1115-L1127, 2001.

Basnet S, Bochkov YA, Brockman-Schneider RA, et al. CDHR3 asthma-risk genotype affects susceptibility of airway epithelium to rhinovirus C infections, *Am. J Respir Cell Mol Biol* 6, 450-458, 2019.

Stenberg Hammar K, Niespodziana K, van Hage M. et al. Reduced CDHR3 expression in children wheezing with rhinovirus, *Pediatr. Allergy Immunol.* 29, 200-206, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaya M, Deng X, Kikuchi A, Sugawara M, Sato N, Kubo T, Momma H, Kawase T, Nakagome K, Shimotai Y, Nishimura H.	4. 巻 304
2. 論文標題 The proton ATPase inhibitor bafilomycin A 1 reduces the release of rhinovirus C and cytokines from primary cultures of human nasal epithelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2021.198548.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山谷睦雄	4. 巻 49
2. 論文標題 ライノウイルスと喘息	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床とウイルス	6. 最初と最後の頁 261-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西村 秀一 (Nishimura Hdekazu) (50172698)	独立行政法人国立病院機構（仙台医療センター臨床研究部）・その他部局等・医長・室長  (81301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------