

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20590476

研究課題名（和文） TLR情報伝達系によるウイルス増殖性の制御に関する研究

研究課題名（英文） Fluctuation of virus growth via activation of TLR signaling pathway.

研究代表者

藤井 暢弘 (FUJII NOBUHIRO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90133719

研究成果の概要（和文）：細胞の分裂や増殖を伴う活性化がウイルスの増殖性に如何なる影響を与えるかについて検討した。急性感染、持続感染のモデルをリンパ球系細胞、上皮系細胞で構築し、TLR情報伝達系をLPS、熱ショック蛋白、イミキモド等で活性化し細胞培養上清中の遊離ウイルス量を測定した。その結果、リンパ球系や単球系細胞に持続感染している麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、単純ヘルペスウイルス1型（HSV1）の遊離ウイルス量には大きな変化は認められなかった。しかし、上皮系細胞であるFL細胞をイミキモドで処理した場合は、インターフェロン非依存的にHSV1の増殖は有意に抑制された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the fluctuation of virus growth via activation of TLR signaling pathway in persistently or acutely infected cells with measles, mumps or herpes simplex viruses. The fluctuation was not recognized in lymphoid cell lines persistently infected with these viruses through treatment with LPS or HSP. On the other hand, release of herpes simplex virus type 1 was significantly suppressed by pretreatment of FL cells with imiquimod.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性・感染免疫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 多くのウイルスは細胞の活性化、増殖性・分裂に依存して複製することが知られている。つまり、宿主細胞の増殖因子を必要としている。

(2) リンパ系細胞、上皮系細胞は細胞膜やエンドソーム膜上にTLR(Toll-like receptor)を発現し、その情報伝達系を介して細胞を活

性化し、インターフェロン（IFN）を含む種々サイトカインを誘導し自然免疫の成立に深く関与している。また、細胞分裂の誘導なども促進する。

(3) TLRのリガンドとしては、ウイルスや細菌の構成成分以外に宿主生体の産生する熱ショック蛋白（HSP）等も報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) TLR情報伝達系を介する細胞の活性化(分裂、増殖、サイトカイン産生等)がウイルスの増殖性に如何なる影響を与えるかを検討する。

(2) 特に、持続感染(潜伏感染、慢性感染)状態のウイルスの再活性化、増殖性の増加がTLR情報伝達系の活性化と関連しているかどうかを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 持続感染細胞の成立

リンパ球系細胞であるTAL-1, CCRF-CEM, AKATA, 単球系細胞であるU937, THP-1, 神経系細胞であるU118-MG, ST88-14, MO3.13, SK-N-AS, NT2, ヒト羊膜由来上皮細胞FL等を用いて麻疹ウイルス(MeV), ムンプスウイルス(MuV), 単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)による持続感染系の成立を試みた。ウイルス力価の測定はVero細胞によるプラーク形成法によった。ウイルスの定性にはPCR, RT-PCR法によった。

### (2) サイトカインの測定

培養上清中のサイトカインの定量はELISAキット(ELISA Development kit), また検出は細胞抽出全RNA(RNeasy Mini kit)を用いたRT-PCR法によった。

### (3) TLRの刺激

大腸菌O111: B4株由来LPS(100 or 1000 ug/ml), ヒトHSP70(10 ug/ml), HSP免疫複合体(ヒトHSP70:10 ug/ml + 抗ヒトHSP70抗体:10ug/ml), TPA(50nM), イミキモド(10 ug/ml)によりそれぞれの細胞を24時間処理した。U937, THP-1に関しては、活性ビタミンD3(10 nM)で24時間処理、未処理したものを刺激した。

(4) NF- $\kappa$ B活性化はレポータ遺伝子発現増強により測定した。

(5) イミキモド処理FL細胞における抗ウイルス因子の検索は、細胞から抽出したRNAを用いた網羅的マイクロアレイによって行った。

## 4. 研究成果

### (1) 持続感染細胞系の成立。

MeV, MuVによる持続感染系は用いた全ての細胞系で成立した。これらの持続感染系では、ほぼ全ての細胞がウイルスに感染しており、培養上清中には1ml当り1000~10000個のウイルス粒子が検出できた。

一方、HSV-1に関しては安定な持続感染系は成立しなかった。但し、TALL-1, U937, THP-1においてはやや安定な持続感染系を成立させることができた。さらにHSV-1VR3株(野生株)の欠損株、d41株(U41欠損VR3株)、d13株(U13欠損VR3株)を用いて持続感染系の成立を試みたところ、TALL-1ではVR3, d13でやや安定な系が得られたが、d41は不安定な系であった。U937, THP-1ではVR3は不安定であり、d41, d13感染系は比較的継代は可能であるが常にあるレベルの死細胞が認められた。

d13, d41持続感染U937細胞でのIFN誘導性MHCクラスI, II発現に対する抑制能に差異が認められた。U937細胞は、IFN- $\alpha$ 処理によりMHCクラスI発現が、またIFN- $\gamma$ 処理によりMHCクラスII発現がそれぞれ有意に上昇する。HSV-d13持続感染U937細胞(U937-d13)は未感染U937細胞とクラスI, II発現に関しては大差が認められず、IFN- $\alpha$ ,  $\gamma$ 処理による発現増強も同程度認められた。これに反して、HSV-d41持続感染U937細胞(U937-d41)のクラスI, IIの発現レベルは未感染U937細胞の発現レベルより著しく抑制されていた。また、この抑制レベルはIFN- $\alpha$ ,  $\gamma$ の処理によっても回復しなかった。

従って、U13遺伝子産物にはMHCクラスI, IIの発現を制御(抑制)する機能が存在する可能性が示唆された。

### (2) MeV, MuV持続感染細胞のTLR刺激

成立した全てのMeV及びMuV持続感染細胞をLPS, HSP70, HSP70免疫複合体で処理したがウイルス遊離量に変動は認められなかった。

U937, THP-1細胞に関してはTPAやビタミンD3処理によりマクロファージへ分化することが報告されている。持続感染細胞と未感染細胞との比較において、これらの薬剤処理による分化程度に差は認められず、さらにウイルス量も変化しなかった。

U937, THP-1におけるMeV感染はTLR4やTLR7情報伝達系をA20の誘導を介して抑制するのでNF- $\kappa$ BやAP-1の活性化は認められずサイトカインの誘導も生じない、つまり細胞の活性化は生じていない可能性があるためウイルス量の変動が小さいとも推察される。しかし、MuV感染ではTLR刺激でNF- $\kappa$ Bの活性化が生じサイトカインは誘導されるがウイルス量に変化は生じなかった。

さらにMeV持続感染U937細胞ではTPA処理において極めて高力価のIFN- $\alpha$ の誘導が認められるが、ウイルス量は抑制されることはなかった。

これらのことはMeVやMuVの持続感

染系においてはTLR情報伝達系の活性化はウイルス複製や産生に影響をおよぼさないものと推察された。

(3) HSV持続感染細胞のTLR刺激  
今回用いた細胞株においては残念ながら安定な持続感染系は得ることはできなかった。しかし、それぞれの細胞でのHSV複製、増殖能は様々であり、細胞変性効果(CPE)の出現に違いのあることも判明した。

感染がある程度期間維持できたTALL-1, U937, THP-1の系でTLR刺激を試みた。いずれのHSV-VR3株、HSV-d13株、HSV-d41株の感染細胞もTLR刺激によってウイルスの遊離には大きな影響は表れなかった。U937, THP-1細胞においてはNF-κBの活性化が認められるがウイルス量に変化が無いことから、細胞の活性化がウイルス複製を促進することはないと推察された。

#### (4) イミキモド処理によるHSV複製・増殖性の変動

イミキモドはヒトパピローマウイルスによる尖圭コンジローマの治療薬として臨床応用されている薬剤である。作用機序はTLR7/8を刺激し、I型IFNを含むサイトカインを誘導・産生することによりウイルス感染細胞に間接的に影響を与えるものと考えられている。今回はHSVの標的細胞でもある上皮系細胞でのイミキモドの効果を検討した。

イミキモド処理したFL細胞では、イミキモドの濃度と処理時間に依存してHSV-1の増殖が著しく抑制された。HSVの前初期タンパク質ICP4の発現は感染後6時間まではイミキモド処理細胞と未処理細胞間では差が認められなかった。しかし、感染12時間以降ではイミキモド処理細胞ではICP4発現は強く抑制され、初期および後期タンパク質の発現は殆ど認められなかった。TLR7経路阻害剤IRS661処理はイミキモドによるHSV複製抑制効果を解除した。

イミキモドによってFL細胞内に誘導されるRNAをマイクロアレイによって解析した結果、I型およびIII型IFN、IFN誘導性抗ウイルス因子、サイトカインの発現増加は認められなかった。一方、システインプロテアーゼ阻害因子であるシスタチンAとCの強い発現誘導が認められた。シスタチンの誘導はIRS661の処理により抑制された。また、FL細胞へのシスタチンAの導入はHSVの複製を有意に抑制した。すでにシスタチンCがHSVの複製を抑制するとの報告があるが、今回は、これに加えてシスタチンAがHSVに対する抗ウイルス効

果を發揮することが明らかになった。

FL細胞でのイミキモドの抗HSV効果はI型およびIII型IFNシステム非依存的に發揮されることも判明した。

FL細胞以外の上皮系細胞であるHeLa、SiHa、CasKiにもTLR7が発現しており、イミキモドによってシスタチンAが誘導されることから、これらの細胞においてもHSV複製抑制がもたらされることが推察された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

① Okabayashi, T., Yokota, S., Fujii, N. 他6、Type-IIIinterferon, not type-I interferon, is the predominant interferon induced by respiratory virus infected nasal epithelial cells. J.Gen.Virol. 2011, in press. 査読有。

② Yokota, S., Okabayashi, T., Fujii, N. Measles virus C protein suppresses gamma-activated factor formation and virus induced cell growth arrest. Virology 2011, in press. 査読有。

③ Yokota, S., Okabayashi, T., Fujii, N. The battle between virus and host: modulation of Toll-like receptor signaling pathways by virus infection. Mediators of Inflammation, Vol. 2010, ID184328, 12pages. 査読有。

④ Yokota, S., Fujii, N. Immunomodulatory activity of extracellular heat shock proteins and their autoantibodies. Microbiol. Immunol., Vol. 54, 2010, 299-307. 査読有。

⑤ Yokota, S., Okabayashi, T., Fujii, N. 他3、Fosfomycin suppresses RS-virus-induced Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae adhesion to respiratory epithelial cells via the platelet-activating factor receptor. FEMS Microbiol. Lett., Vol. 310, 2010, 84-90. 査読有。

⑥ Kamiya, T., Okabayashi, T., Yokota, S., Fujii, N. 他4、Increased caspase2 activity is associated with induction of apoptosis in IFN-B sensitive melanoma cell lines. J. Interferon & Cytokine Res. Vol. 30, 2010, 349-357. 査読有。

⑦ Yokota, S., Chiba, S., Furuyama, H., Fujii, N. Cerebrospinal fluids containing anti-HSP70 autoantibodies from multiple sclerosis patients augment HSP70-induced proinflammatory cytokine production in

monocytic cells. J.Neuroimmunol.Vol.218, 2010, 129-133. 査読有。

⑧ Yokota, S., Okabayashi, T., Fujii, N. 他 2、Helicobacter pylori lipopolysaccharides upregulate Toll-like receptor 4 expression and proliferation of gastric epithelial cells via the MEK1/2-ERK1/2 mitogen activated protein kinase pathway.

Infect. Immun. Vol. 78, 2010, 468-476. 査読有。

⑨ Okabayashi, T., Yokota, S., Fujii, N. 他 2、Fosfomycin suppresses chemokine induction in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. Clinic. Vac. Immunol. Vol. 16, 2009, 859-865. 査読有。

⑩ Hashimoto, K., Yokota, S., Fujii, N. 他 11, RSV replication is attenuated by counter-acting expression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) molecules. Virology Vol. 391, 2009, 162-170. 査読有。

⑪ Kakugawa, T., Yokota, S., Fujii, N. 他 8、High serum concentrations of autoantibodies to HSP47 in nonspecific interstitial pneumonia compared with idiopathic pulmonary fibrosis. BMC Pulm Med. 2008 Nov. 4. pp1-6, 査読有。

⑫ Yokota, S., Okabayashi, T., Fujii, N. 他 1、Measles virus P protein suppresses Toll-Like receptor signal through up-regulation of ubiquitin-modifying enzyme A20. FASEB J. Vol. 22, 2008, 74-83. 査読有。

[学会発表] (計 10 件)

① 岡林環樹、横田伸一、藤井暢弘。RSV 感染鼻粘膜上皮細胞における III 型インターフェロンの重要性。日本インターフェロン・サイトカイン学会、2010、6月25-26日、北九州国際会議場(北九州市)。

② 横田伸一、岡林環樹、藤井暢弘。ムンプスウイルス感染単球系細胞株におけるインターロイキン-10 発現上昇。日本ウイルス学会、2009、10月25-27日、都市センターホテル(東京)。

③ Yokota, S., Okabayashi, T., Fujii, N. Modulation of Toll-like receptor signal transduction by bacteria, virus, and self. Regulation of innate immunity (Symposium), October 28 and 29, 2008, Hokkaido University (Sapporo).

[図書] (計 1 件)

① 藤井暢弘、横田伸一、岡林環樹。ウイルス感染と自然免疫、臨床検査、医学書院、2009、pp 17-27。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

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

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 暢弘 (FUJII NOBUHIRO)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90133719

(2) 研究分担者

横田 伸一 (YOKOTA SHIN-ICHI)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10325863  
岡林 環樹 (OKABAYASHI TAMAKI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10359995

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：