

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08830

研究課題名(和文) 抗インフラマソーム能欠失型ウイルスを利用した新しいウイルス予防・治療法の研究

研究課題名(英文) Study on new vaccine and therapy using the parmyxovirus lacking inflammasome antagonism

研究代表者

小松 孝行 (Komatsu, Takayuki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：20215388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗インフラマソーム能と抗インターフェロン(IFN)能を有するパラインフルエンザウイルス1型V蛋白質とヒトメタニューモウイルス(HMPV)M2-2蛋白質のアラニン置換変異体を作製した。抗インフラマソーム能のみを失ったV変異体は得られなかった。一方、抗インフラマソーム能のみを失ったM2-2変異体は得られたので、そのM2-2変異体を発現する組換えHMPVを作製した。培養細胞に感染させたところ、インフラマソーム依存性のIL-1分泌は抑制しなかったが、IFN- γ 産生は抑制しIFN産生細胞で増殖することができた。本研究により、HMPVの抗インフラマソーム能の役割が解明されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトメタニューモウイルス(HMPV)は、ときに細気管支炎・肺炎を引き起こす。しかし、特異的な治療法がなく、有効なワクチンや治療薬の開発が望まれている。HMPVは、宿主が産生するインターフェロン(IFN)産生とインフラマソーム依存性IL-1の分泌を阻害する機構を備えている。抗IFN能については、多くの研究がなされているので、本研究では、抗インフラマソーム能のみを喪失したHMPVを作製した。このウイルスを使用して、抗インフラマソーム能がワクチンや治療薬の新たな標的として有効なのかを検証できるようになった。

研究成果の概要(英文)：We generated mutants of the V protein of parainfluenza virus type 1 and the M2-2 protein of human metapneumovirus (HMPV), which have anti-inflammasome and anti-interferon (IFN) activity, by alanine substitution. No mutants of the V protein that lost only anti-inflammasome activity were obtained. On the other hand, several mutants of the M2-2 protein that lost only anti-inflammasome activity was obtained, and recombinant HMPV expressing the M2-2 mutant was created. When these recombinant viruses were infected with cultured cells, they did not inhibit inflammasome-dependent IL-1 secretion, but they did inhibit IFN- γ production and were able to grow in IFN-producing cells. This study is expected to elucidate the role of the anti-inflammasome activity of HMPV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パラインフルエンザウイルス メタニューモウイルス アクセサリー蛋白質 インフラマソーム インターフェロン ワクチン 抗ウイルス薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

研究成果の概要 (和文)

1. 研究開始当初の背景

パラインフルエンザウイルス 1 型 (PIV1) は、乳幼児に細気管支炎・肺炎などの下気道感染症を起こしやすい。しかし、特異的な治療法はないため、有効なワクチンや治療薬の開発が望まれている。PIV1 の V 蛋白質は、宿主が産生するインターフェロン (IFN) を阻害する機構 (抗 IFN 能) と宿主が分泌するインフラマソーム依存性 IL-1 を分泌させない機構 (抗インフラマソーム能) を備えている。実際、V 蛋白質を発現しない組換えウイルスは弱毒化する。そのため、V 蛋白質は、ワクチンや治療薬の標的と考えられている。マウスパラインフルエンザウイルス 1 型 (mPIV1) の研究では、抗 IFN 能はウイルスの増殖・病原性には無関係で、それ以外の自然免疫逃避機構が本質ではないかと報告された (Virology. 2007 359:82-91, J.Virol 2012 86:7136-7145)。その後、呼吸器ウイルスでは、感染時に免疫細胞から分泌されるインフラマソーム依存性 IL-1 がウイルスの肺からの排除に極めて重要であり、抗インフラマソーム能を有するウイルスは病原性が高いと報告された。そのため、PIV1 でも抗インフラマソーム能が重要ではないかと考えた。しかし、現在の V 欠損ウイルスは抗インフラマソーム能と抗 IFN 能の両方を喪失しているため、抗インフラマソーム能の役割を解明することができない。抗インフラマソーム能のみを喪失して抗 IFN 能が保持された V 蛋白質を発現する組換えウイルスが作製できれば、ウイルス感染における抗インフラマソーム能の役割が解明でき、ワクチンや治療薬開発のための基盤情報が得られると考えた。

2. 研究の目的

私達は、2004 年にマウスパラインフルエンザウイルス 1 型 (mPIV1) V 蛋白質に IFN 産生阻害活性があることを報告した (Virology. 2004 325:137-148)。当時は、この抗 IFN 能が V 欠損 PIV1 の弱毒化の原因と考えられた。しかし、清谷、入江らによって、抗 IFN 能はウイルスの増殖・病原性には無関係で、*in vivo* に特有の免疫細胞が担う自然免疫に対する阻害能が重要ではないかと報告された (Virology. 2007 359:82-91, J.Virol 2012 86:7136-7145)。その後私達は、2018 年に mPIV1V 蛋白質にインフラマソーム依存性 IL-1 の分泌を阻害する活性があることを報告した (J.Virol 2018 92:e00842-18)。そこで、本研究では、mPIV1V 蛋白質の抗インフラマソーム機構と抗 IFN 機構を解析し、抗インフラマソーム能のみを欠失した V 蛋白質を発現する組換えウイルスを作製し、ウイルス感染における抗インフラマソーム能の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発現プラスミド

PIV1 V 蛋白、HMPV M2-2 蛋白質、それぞれの欠損または点置換変異体 (Vm、M2-2m) を発現するプラスミドを作製した。各遺伝子の ORF を発現ベクター pCA7 の CAG プロモーターの下流に挿入した。FLAG、V5、MyC、HA タグを付加した発現プラスミドも作製した。NLRP3 インフラマソーム依存性 IL-1 分泌経路や IFN- γ 産生経路のシグナル伝達分子を発現するプラスミド、ウイルスミニゲノムアッセイ、リバースジェネティクスで使用したプラスミドは以前作製したものを使用した (J. Virol. 2018 92:e00842-18, Microbes Infect. 2020 22:322-330, Microbes Infect. 2010 12:135-145, J Clin Virol. 2013 56:31-36)。

(2) NLRP3 インフラマソーム阻害能 (抗インフラマソーム能) の評価

前駆体 IL-1 と NLRP3 インフラマソーム複合体を構成する分子 (NLRP3、ASC、および前駆体 Casp-1) を発現するプラスミドとともに Vm あるいは M2-2m を発現するプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、培養液中に分泌される IL-1 量を ELISA で測定しインフラマソーム阻害能を評価した。

(3) IFN 産生経路阻害能 (抗 IFN 能) の評価

IFN- プロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミド pIFN- -Luc と RIG-I 経路を構成するシグナル伝達分子 (RIG-I とそのユビキチンリガーゼ TRIM25) を発現するプラスミドとともに Vm あるいは M2-2m を発現するプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を測定し IFN 産生経路阻害能を評価した。

(4) ウイルスミニゲノムアッセイによる転写複製調節能の評価

リーダー配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したウイルスミニゲノム発現プラスミドと N, P, L, M2-1 蛋白質発現プラスミドを BHK-T7 細胞 (T7RNA ポリメラーゼを発現) とともに M2-2m をトランスフェクションし、細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を測定しウイルスゲノムの転写複製調節能を評価した。

(5) 組換えウイルスの作製

M2-2m 遺伝子を発現する HMPV Jpn03-1 株のゲノム RNA 発現プラスミドと転写複製に関わる N, P, L, M2-1 蛋白質を発現するプラスミドを BHK-T7 細胞にトランスフェクションし、組換え変異ウイルス (HMPV-M2-2m) を作製した。

(6) 組換え変異ウイルス感染による IFN 産生の評価

IFN-stimulated response element (ISRE) プロモーター下流に分泌型の Lucia ルシフェラーゼ遺伝子が挿入されたレポーター遺伝子を発現する A549 細胞に HMPV-M2-2m を感染させて、培養液中のルシフェラーゼ活性を測定し IFN 産生経路阻害能を評価した。

(7) 組換え変異ウイルス感染による IL-1 分泌の評価

THP-1 細胞に HMPVM2-2m を感染させて、培養液中に分泌される IL-1 量を ELISA で測定しインフラマソーム阻害能を評価した。

4. 研究成果

(1) PIV1 の V 変異体 (Vm) の解析

荷電アミノ酸をアラニンに置換した Vm を作製した。ELISA によってインフラマソーム阻害能を調べると、阻害能を喪失した Vm が複数得られた。これらの Vm について、レポーターアッセイによって IFN 産生経路阻害能を調べると、すべて IFN 産生経路阻害能も喪失していた。以上の結果より、計画した実験では抗インフラマソーム能のみを喪失し抗 IFN 能が保持された Vm を得ることはできなかった。採択時に計画した PIV1 では期待した変異体を得られなかったため、抗インフラマソーム能を示すことを見いだしていた HMPV M2-2 蛋白に研究対象を変更した。

(2) HMPV の M2-2 変異体 (M2-2m) の解析

荷電アミノ酸をアラニンに置換した M2-2m を作製した。ELISA によってインフラマソーム阻害能を調べると、阻害能を喪失した変異体が 8 つ得られた (M2-2-m1 ~ -m8)。これらについて、レポーターアッセイによって IFN 産生経路阻害能を調べたところ、抗 IFN 能を保持した M2-2-m3, -m5, -m8 が得られた。さらに、ウイルスミニゲノムアッセイによって転写複製調節能を調べると、M2-2-m3, -m5, -m8 とともに M2-2-WT と同レベルの転写複製調節能を示した。以上の結果より、抗インフラマソーム能のみを喪失してその他の機能が保持された M2-2m が得られた。

(3) M2-2 変異体を発現する組換え変異ウイルス (HMPV-M2-2m) の作製

M2-2-m3、-m5、-m8 を発現するウイルス全ゲノム発現プラスミドを作製し、リバースジェネティクス法にて組換え変異ウイルス HMPVM2-2-m 3、-m5、-m 8 を作製した。

(4) HMPV-M2-2m のインフラマソーム阻害能の解析

HMPVM2-2-m3 , -m5、-m8 を THP-1 細胞に感染させ、培養液中の IL-1 量を測定したところ、M2-2 を発現しない組換えウイルス (HMPV M2-2) に近い IL-1 の分泌がみられた。以上の結果より、3 種類の変異ウイルスとも抗インフラマソーム能が解除されていることが示唆された。

(5) HMPV-M2-2m の IFN 産生経路阻害能の解析

HMPV-M2-2-m3 , -m5、-m8 を A549 レポーター細胞に感染させたところ、HMPV M2-2 のようなレポーター活性の上昇はみられず、親株 (HMPV-WT) と同レベルのレポーター活性を示した。以上の結果より、得られた HMPV-M2-2m は IFN 産生経路阻害能を保持していることが示唆された。

(6) HMPV-M2-2m の増殖

HMPV-M2-2m を LLC-MK2 細胞 (IFN 産生細胞) に感染させ増殖を調べたところ、3 種類のウイルスとも HMPV M2-2 とは異なり HMPV-WT に近い増殖を示した。

(7) まとめ

採択時に計画したパラインフルエンザウイルス 1 型では期待した変異体を得られなかった。そこで、対象ウイルスにヒトメタニューモウイルスを用いて計画を遂行した。過剰発現を用いた再構成系で評価して得られた M2-2 変異体を発現する組換えウイルスは、抗インフラマソーム能のみを喪失してその他の機能が保持されていた。このウイルスを用いれば、ウイルスに備えられた抗インフラマソーム能がワクチンや治療薬の新たな標的として有効なのかを検証できるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Y, Morita N, Kitagawa Y, Bin Gotoh, Komatsu T (責任著者).	4. 巻 22
2. 論文標題 Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits RIG-I signaling by preventing TRIM25-mediated RIG-I ubiquitination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.970750.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Morita N, Tanaka Y, Takeuchi K, Kitagawa Y, Sakuma R, Koide N, Komatsu T (責任著者).	4. 巻 21
2. 論文標題 SeV C Protein Plays a Role in Restricting Macrophage Phagocytosis by Limiting the Generation of Intracellular Double-Stranded RNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.780534.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakuma R, Morita N, Tanaka Y, Koide N, Komatsu T (責任著者).	4. 巻 66
2. 論文標題 Sendai virus C protein affects macrophage function, which plays a critical role in modulating disease severity during Sendai virus infection in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 124-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12956.	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 Morita N, Tanaka Y (共第一著者), Odkhuu E, Naiki Y, Komatsu T (責任著者), Koide N.	4. 巻 22
2. 論文標題 Sendai virus V protein decreases NO production via inhibiting RIG-I signaling in infected RAW264.7 macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micobes and Infection	6. 最初と最後の頁 322-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micinf.2020.01.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中幸枝, 森田奈央子, 小松孝行
2. 発表標題 ヒトメタニューモウイルスM2-2蛋白質のインターフェロン- シグナル抑制機構.
3. 学会等名 細菌学会中部支部総会（金沢）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka Y, Morita N, Kitagawa Y, Gotoh B, Komatsu T.
2. 発表標題 Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits RIG-I signaling by preventing TRIM25-mediated RIG-I ubiquitination.
3. 学会等名 The 70 th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田奈央子, 田中幸枝, 小松孝行
2. 発表標題 センダイウイルスV蛋白質はRIG-Iシグナルを阻害することで一酸化窒素の産生を抑制する
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

〔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	田中 幸枝 (Tanaka Yukie) (10197486)	福井大学・学術研究院医学系部門・助教 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	森田 奈央子 (Morita Naoko) (20815881)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	

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