

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591297

研究課題名（和文）インフルエンザウイルスによるIFN- α シグナル伝達遮断のメカニズム研究課題名（英文）Influenza A Virus Abrogates Interferon- α Response in Respiratory Epithelial Cells by Disruption of the Jak/Stat Pathway

研究代表者

上谷 光作（UETANI KOHSAKU）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10244758

研究成果の概要（和文）：

Influenza A/Aichi/2/68, H3N2亜型のみならず、H1N1型(PR8)、H2N2型(Okuda)インフルエンザウイルスの増殖・精製を行い、ヒト肺腺癌細胞株A549細胞と初代培養されたヒト正常気管支上皮細胞NHBE細胞を用いて、M.O.I.10以上で*in vitro*の感染実験系を構築した。これにより流行株の全ての亜型ウイルスにおいて、正常呼吸上皮細胞における宿主免疫応答の解析が可能となった。インフルエンザウイルスを感染させた8時間後、細胞をインターフェロン(IFN)- α 1,000U/mlで刺激すると、IFNシグナル伝達経路の最下流に位置するSTAT-1の701チロシン残基のリン酸化は、驚くべき事に消失していた。つまりインフルエンザウイルス感染細胞ではIFN- α のシグナル伝達は遮断されていた。IFN- γ で刺激するとやはりSTAT-1のリン酸化は抑制されていたが、IFN- α 程では無かった。この実験結果によって、IFNが持つ抗ウイルス作用はインフルエンザウイルスには無効であることが示唆された。即ち、インフルエンザウイルスはIFNが持つ抗ウイルス作用に拮抗すメカニズムを有することになる。このメカニズムを解明すれば、IFNが持つ抗ウイルス作用にインフルエンザウイルスを回帰させることも可能となり、新規治療法の開発に繋がるものと考えられた。次に、最初にIFN- γ シグナル伝達経路構成分子である、①IFNGR1、②IFNGR2、③Jak1、④Jak2、⑤STAT-1の5つ分子についてmRNAと蛋白発現を検討した。PCRによるmRNA発現量の検討ではウイルス非感染細胞と感染細胞で顕著な差を見出せなかった。しかしウェスタン分析による蛋白発現量に関しIFNGR1とJak1がウイルス感染細胞では選択的に抑制されており、他の分子の発現量には有意差は認められなかった。次にこれらの分子の蛋白発現量の違いがウイルス感染細胞内で発現されるウイルス蛋白分子に起因するものか検討をおこなった。ウイルス感染細胞内ではHA, NA, M1, M2, NP, PB1, PB2, PA, NS1, NS2の10個のウイルス蛋白が作られる。この中でどのウイルス蛋白がIFNシグナル伝達を遮断する原因分子であるか検討した。最初、IFN antagonistとして知られるNS1蛋白がIFN刺激によるStat1チロシンリン酸化を抑制する原因分子と想定し、NS1蛋白発現プラスミド(pCAGGS-NS1)をA549細胞に導入を試みたが効率が悪く、ヒト胎児腎細胞 HEK293細胞に導入し、NS1蛋白を十分量発現させ、その後IFNで刺激しStat1チロシンリン酸化を検討した。その結果、NS1蛋白はStat1チロシンリン酸化を抑制しなかった。即ち、NS1蛋白はIFNシグナル伝達遮断のメカニズムは関与しないことが証明された。

研究成果の概要（英文）：

In the course of evolution, influenza A viruses also have developed different mechanisms to counteract the IFN-induced antiviral activities. There is accumulating evidence that IFN- α/β and IFN- γ are ineffectual against influenza A virus. Therefore, we hypothesized that influenza A virus may have evolved molecular mechanisms to evade the IFN- α/β and IFN- γ -dependent anti-viral pathways. To test this, we investigated IFN-induced MHC class II expression in A549 cells infected with influenza A virus. These cells are highly sensitive to IFN-induced MHC class II expression

through Jak/Stat and CIITA pathways. The data show that influenza A virus inhibits IFN-induced upregulation of MHC class II.

Further, influenza A virus interferes with the host response by blocking the IFN- α/β and IFN- γ signal cascade through inhibition of phosphorylation of Stat1 on tyrosine 701, which is required for its translocation to the nucleus and DNA binding, and serine phosphorylation, which is required for the full transcriptional activation of the protein. Nuclear translocation of Stat1 α upon IFN- γ stimulation was significantly inhibited in influenza A virus-infected cells and this was associated with a decrease in tyrosine 701 and serine 727 phosphorylation of Stat1 α .

The influenza virus-encoded NS1 has been shown to inhibit the host-cell antiviral responses. In order to investigate the effect of NS1 protein on tyrosine phosphorylation of Stat1, the cells transfected with NS1 expression vector or empty vector were treated with type I or type II IFN, and total cellular lysates were prepared for analyzing Stat1 phosphorylation by Western blotting. No significant inhibition of IFN- γ -induced tyrosine phosphorylation of Stat1 was observed in the cells transfected with NS1 expression vector. The inhibition of IFN- α -induced phosphorylation of Stat1 by influenza A virus infection is not due to NS1 protein.

The activation of Stat1 is ultimately dependent on the upstream signaling events of the IFN- γ signal transduction system, which includes IFNGR1, IFN- γ receptor subunit 2 (IFNGR2), Jak1, and Jak2. IFNGR1, IFNGR2, Jak1, Jak2, and Stat1 mRNAs were constitutively expressed in uninfected and influenza A virus-infected cells regardless of IFN- γ treatment, suggesting that influenza A virus infection did not affect transcription of the genes for these molecules. We found that Stat1 α , IFNGR2, and Jak2 were equivalently expressed in uninfected and influenza A virus-infected cells, whereas there was a dramatic decrease of Jak1 and IFNGR1 proteins in infected cells. Together, these data suggest that Jak1 and IFNGR1 are decreased by a posttranscriptional mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計			

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：①感染症、②ウイルス、③免疫学、④シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス肺炎では、気管支肺胞洗浄液中に大量のインターフェロン・ガンマ(IFN- γ)が産生されている。驚くべきことに、この IFN- γ はインフルエンザウイルスの制御に関与しない。つまり、インフルエンザウイルスは IFN- γ の抗ウイルス作用を回避する機構を有していることが知られていた。我々はインフルエンザウイルス感染細胞内では IFN- γ シグナル伝達路は遮断されており、遮断の原因は IFN- γ のシグナル伝達路の構成要素 IFNGR1, Jak1 の発現が選択的に抑制されリン酸化のカスケードが進行しないことを見出し、この抑制メカニズムに IFN-antagonist として知られるウイルス蛋白、NS1 蛋白は関与しないことを証明した。さら

に興味深いことに、ウイルス感染細胞は IFN- α 刺激に対しても不応性になっていることを見出した。この事象の発見が、「インフルエンザウイルスが IFN- α シグナル伝達経路を遮断するメカニズム」の解明の研究着想経緯である。

2. 研究の目的

病原体感染早期に産生されるインターフェロンは自然免疫系の防御機構として炎症を誘導し感染の拡大を防ぐ重要なサイトカインである。最近、我々はインフルエンザウイルスが IFN- γ の抗ウイルス作用を回避するメカニズムを解明した。興味深いことに、インフルエンザウイルス感染細胞は IFN- γ のみならず IFN- α シグナル伝達系も抑制、遮断さ

れ、IFN- α 刺激に対し不応性になっている可能性が示唆された。IFN- α 刺激に反応しなければインフルエンザウイルスはIFN- α の抗ウイルス作用を回避することができる。インフルエンザウイルスは巧妙に宿主免疫応答を免れ、度重なる感染が成立する。インターフェロンの宿主免疫応答を回避する機構はインフルエンザウイルスの再感染や易感染性、さらに病態の重症度に深く関与していると考えられる。よって本研究は、単にインフルエンザウイルス感染症の新しい病態解明を目的とするのみならず、新規治療法開発の観点から応用を目指すものである。

3. 研究の方法

我々は、influenza A/Aichi/2/68, H3N2をヒト気道上皮細胞(A549細胞)に *in vitro* で感染させ、研究を進める。まず、(i) ウイルス感染細胞をIFN- α で刺激し、シグナル伝達が減衰・消失していく現象の経時的变化を検討する。続いて、(ii)シグナル伝達路のどの部分が遮断されているのか検討する。さらに、(iii) ユビキチン・プロテアゾーム系の活性化がIFN- α シグナル伝達路構成要素の選択的蛋白分解に関与しているかどうか解析する。最後に、(iv) 感染細胞内で発現するウイルス蛋白の中でどの分子がIFN- α 伝達経路の遮断の原因となっているのか検討する。

4. 研究成果

Influenza A/Aichi/2/68, H3N2亜型のみならず、H1N1型(PR8), H2N2型(Okuda)インフルエンザウイルスの増殖・精製を行い、ヒト肺腺癌細胞株A549細胞と初代培養されたヒト正常気管支上皮細胞NHBE細胞を用いて、M.O.I.10以上で *in vitro* の感染実験系を構築した。これにより流行株の全ての亜型ウイルスにおいて、正常呼吸上皮細胞における宿主免疫応答の解析が可能となった。癌細胞を用いた感染実験と比較し、より生理学的な実験系で得られたデータは貴重である。インフルエンザウイルスを感染させた8時間後、細胞をインターフェロン(IFN)- α 1,000U/mlで刺激すると、IFNシグナル伝達経路の最下流に位置するSTAT-1の701チロシン残基のリン酸化は、驚くべき事に消失していた。つまりインフルエンザウイルス感染細胞ではIFN- α のシグナル伝達は遮断されていた。IFN- γ で刺激するとやはりSTAT-1のリン酸化は抑制されていたが、IFN- α 程では無かった。この実験結果によって、IFNが持つ抗ウイルス作用はインフルエンザウイルスには無効であることが示唆された。即ち、インフルエンザウイルスはIFNが持つ抗ウイルス作用に拮抗すメカニ

ズムを有することになる。このメカニズムを解明すれば、IFNが持つ抗ウイルス作用にインフルエンザウイルスを回帰させることも可能となり、新規治療法の開発に繋がるものと考えられる。次に、最初にIFN- γ シグナル伝達経路構成分子である、①IFNGR1,②IFNGR2,③Jak1,④Jak2,⑤STAT-1の5つ分子についてmRNAと蛋白発現を検討した。PCRによるmRNA発現量の検討ではウイルス非感染細胞と感染細胞で顕著な差を見出せなかった。しかしウェスタン分析による蛋白発現量に関しIFNGR1とJak1がウイルス感染細胞では選択的に抑制されており、他の分子の発現量には有意差は認められなかった。次にこれらの分子の蛋白発現量の違いがウイルス感染細胞内で発現されるウイルス蛋白分子に起因するものか検討をおこなった。ウイルス感染細胞内ではHA, NA, M1, M2, NP, PB1, PB2, PA, NS1, NS2の10個のウイルス蛋白が作られる。この中でどのウイルス蛋白がIFNシグナル伝達を遮断する原因分子であるか検討した。最初、IFN antagonistとして知られるNS1蛋白がIFN刺激によるStat1チロシンリン酸化を抑制する原因分子と想定し、NS1蛋白発現プラスミド(pCAGGS-NS1)をA549細胞に導入を試みたが効率が悪く、ヒト胎児腎細胞HEK293細胞に導入し、NS1蛋白を十分量発現させ、その後IFNで刺激しStat1チロシンリン酸化を検討した。その結果、NS1蛋白はStat1チロシンリン酸化を抑制しなかった。即ち、NS1蛋白はIFNシグナル伝達遮断のメカニズムは関与しないことが証明された。

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0件)

[学会発表] (計2件)

- ① Defective Expression of HLA-DR α in The Human Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 by Interferon- γ
平成22年5月19日
New Orleans
- ② IFN- γ Stimulates Prolonged Expression of HLA-DR α in Human Airway Epithelium
平成21年5月19日
San Diego

以上、いずれもアメリカ胸部疾患学会国際会議で発表。

[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

上谷 光作 (UETANI KOHSAKU)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：21591297

(2) 研究分担者

村垣 泰光 (MURAGAKI YASUTERU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40190904

(3) 連携研究者

()

研究者番号：