

## 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 15日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591391

研究課題名（和文）2本鎖RNAの抗RSウイルス作用を媒介するメディエーターの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mediators which exert anti-respiratory syncytial virus activity reacted by double-stranded RNA

研究代表者

永井 和重（NAGAI KAZUSHIGE）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50347168

研究成果の概要（和文）：ヒトRSウイルス（RSV）に対する抗ウイルス作用を示す2本鎖RNA（dsRNA）がいかなるメディエーターを介するかを検索する目的で、dsRNAの受容体でありかつ抗ウイルス作用を現すToll-like receptor 3（TLR3）に着目し、TLR3をヒト培養細胞に過剰発現させて、RSV感染実験によりその抗ウイルス作用を調査した。結果は、TLR3過剰発現細胞ではコントロール細胞と比較して有意にRSV産生が抑制された。この作用へのインターフェロン-βの関与は低く、別の因子の関与が推測された。

研究成果の概要（英文）：To investigate antiviral role of double-stranded (ds) RNA, Toll-like receptor 3 (TLR3) whose ligand is dsRNA was overexpressed in A549 cells and those cells were infected with human respiratory syncytial virus (RSV). The TLR3-overexpressed cells produced significantly less amount of RSV in a cell culture supernatant comparing to the control cells. Further investigation suggested that interferon-β was less involved in this effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：RSウイルス、2本鎖RNA、TLR3、自然免疫、抗ウイルス作用、インターフェロン

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染に対する生体の防御機構は自然免疫と獲得免疫から成る。自然免疫において、細胞表面／内でのウイルス構成成分を認識する受容体／センサーが反応し、細胞内シグナル伝達により最終的に抗ウイルス作用を現すI型interferon（IFN）や炎症性サイトカインが産生される。ウイルスが細胞内で複製する際に2本鎖RNA（dsRNA）が形成

され、このdsRNAを認識する自然免疫の受容体／センサーとしてToll-like receptor 3（TLR3）、retinoic acid-inducible gene 1（RIG-I）、melanoma differentiation-associated gene 5（MDA5）などが知られている。

ヒトRSウイルス（RSV）はパラミクソウイルス科に属するマイナス1本鎖RNAウイルスで、インフルエンザと並び毎年冬季に呼

吸器感染症の流行を起こす代表的なウイルスである。RSV 感染に関係する自然免疫として TLR3 及び RIG-I が報告されている。RSV が細胞内で複製される際に dsRNA が合成され、これらの受容体/センサーを介した抗ウイルス作用が現れることが想起される。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは平成 19 年度科学研究費補助金基盤研究 (C)「2 本鎖 RNA による抗 RSV ウイルス作用に関する研究」において、RSV 感染 HeLa 細胞培養上清に dsRNA である poly I:C を添加すると、非添加群と比較して有意に RSV 産生が抑制されたことを報告した。本研究ではこの dsRNA による抗 RSV 作用を更に詳細に解明する目的で、dsRNA の認識受容体である TLR3 に着目し、TLR3 を媒介とする抗 RSV 作用を解明することとした。更に、抗 RSV 作用が認められた場合、TLR3 からのシグナル伝達により産生されると考えられる抗ウイルスサイトカインである I 型 IFN の関与も解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養及びウイルス感染：ヒト肺胞上皮由来 A549 細胞は 10% FBS-DMEM にて、ヒト上皮系 HEp-2 細胞は 10% FBS-MEM にて 37 度、5%CO<sub>2</sub> にて培養された。RSV Long 株は HEp-2 細胞に感染させ、HEp-2 細胞に著明な cytopathic effect が出現した段階で培養上清を回収・遠心し、上清を急速凍結した後-80 度で保存し感染実験に使用した。RSV 感染実験では、Long 株を種々の multiplicity of infection (MOI) で 2 時間培養した後ウイルス液を除去し PBS にて 1 回洗浄後細胞培養を継続した。IFN-β 中和実験では抗 IFN-β ポリクローナル抗体 (PBL Biomedical laboratories, Piscataway, NJ USA) を 2,000 U/ml で RSV 感染後に添加した。

(2) トランスフェクション及び TLR3 過剰発現細胞の作成：TLR3 一過性過剰発現実験では、ヒト TLR3 発現ベクター pUNO-hTLR3-HA (InvivoGen, San Diego, CA USA) を A549 細胞に Effectene (キアゲン, 東京) を使用してトランスフェクションした。コントロールベクターは、上記ベクターを *EcoRV* で切断し hTLR3 配列の約 60% を除去した後 T4 DNA ligase で作成した pUNO-HA を用いた。トランスフェクション 24 時間後に Long 株を感染させた。TLR3 を持続的に過剰発現する A549 細胞株を樹立するため、トランスフェクション 48 時間後に培養液に blasticidin S (InvivoGen) 10 µg/ml を添加し、生存細胞コロニーを選択し、細胞を増幅させた後セルパンカー 1 (三菱化学メディエンス, 東京) にて -80 度に保存した。

(3) フローサイトメトリー：細胞表面上で

の TLR3 過剰発現をフローサイトメトリーで検出した。A549 細胞を 0.5 mM EDTA で剥離し、FACS バッファー (3 % FCS, 0.02 % sodium azide in PBS) にて洗浄・遠心分離し、PE-labeled anti-human TLR3 (eBioscience, San Diego, CA USA) あるいは PE-labeled mouse IgG1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA USA) で染色し、BD FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA USA) でフローサイトメトリーを実施した。細胞内における TLR3 過剰発現については、抗体による染色前に BD Cytofix/Cytoperm solution (BD Bioscience) で処理を施し、フローサイトメトリーで検出した。

(4) プラークアッセイ：RSV 感染実験で保存した培養上清を 10 倍階段希釈し、HEp-2 細胞が充満した 24 ウェルマイクロプレートに 150 µl/ウェル添加し 2 時間培養した後、1 % FBS, 0.75 % メチルセルロース-MEM を加え 5 日間培養した。その後細胞を 10%ホルマリンで固定し、0.5 % クリスタルバイオレットで染色し、プラーク数を顕微鏡にて数えた。同じ希釈での 3 ウェルのプラーク数の平均値を最終プラーク数とした。

(5) IFN-α/β ELISA：細胞培養上清中のヒト IFN-α 及び IFN-β 濃度はそれぞれ human IFN-α ELISA kit (PBL Biomedical Laboratories) 及び human IFN-β ELISA kit (PBL Biomedical Laboratories) を使用し、450 nm での吸光度を Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA USA) にて測定された。

(6) RNA 抽出：RSV 感染培養細胞上清におけるウイルス RNA の抽出は MagExtractor™-viral RNA (東洋紡、大阪)、細胞からのトータル RNA の抽出は MagExtractor™-RNA (東洋紡) を使用して行なった。抽出されたトータル RNA は DNase I にて処理され-80 度で保存された。

(7) リアルタイム RT-PCR：リアルタイム RT-PCR は TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) を使用して、7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) にて実施された。TLR3 mRNA 定量はマルチプレックスリアルタイム RT-PCR で行なわれ、20 µl 反応溶液中 10 µl TaqMan RT-PCR mix, TLR3 及び glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase それぞれの TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) (20x プライマー・プローブミックス) 各 1 µl, 0.6 µg RNA サンプルを反応させた。RSV の定量のため、Long 株 N 蛋白遺伝子 (nt 1140-1264) を RT-PCR にて増幅し、増幅産物を pCR4-TOP0 ベクター (ライフテクノロジーズジャパン, 東京) に組み込みクローニングし RSV ベクターを作成した。N 蛋白遺伝子塩基配列は DNA シークエンスに

を確認した。RSV のウイルス定量は、20  $\mu$ l 反応溶液中、TaqMan RT-PCR mix (10  $\mu$ l)、フォワードプライマー 5' -CATCCAGCAAATACACCATCCA-3' (10  $\mu$ M)、リバープライマー 5' -TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATCAA-3' (10  $\mu$ M)、プロベ 5' -FAM-CGGAGCACAGGAGAT-MGB-3' (2.5  $\mu$ M)、サンプル RNA または 10 倍階段希釈された RSV ベクター (各 1  $\mu$ l) を混入させた。RSV コピー数は、階段希釈された RSV ベクターによるスタンダードカーブを作成し求めた。

(8) 統計解析：スチューデント *t* 検定を行い、*P* < 0.05 で有意とした。データは平均  $\pm$  標準誤差で表記した。

#### 4. 研究成果

(1) TLR3 一過性過剰発現による RSV の産生抑制：TLR3 の RSV に対する抗ウイルス作用を検証する目的で、ヒト TLR3 遺伝子を A549 細胞に一過性に過剰発現させ RSV 感染を試みた。TLR3 過剰発現は TLR3 mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR にて定量し評価した。ヒト TLR3 発現ベクター (pUNO-hTLR3-HA) をトランスフェクションした細胞では、トランスフェクション 24 時間後にコントロールベクターでの細胞に比べ約 8 倍発現が増加していた (図 1a)。これらの細胞にトランスフェクション 24 時間後に Long 株を MOI 3 で感染させ、感染 12 及び 24 時間後に細胞培養上清中の RSV コピー数を定量した。その結果、いずれの時間においても TLR3 過剰発現細胞において RSV コピー数は有意に減少していた (図 1b)。特に感染 24 時間後では、TLR3 過剰発現細胞での RSV コピー数はコントロール細胞でのコピー数より約 70% 抑制されていた。以上の結果より、TLR3 発現は A549 細胞において RSV 産生を抑制することが示唆された。

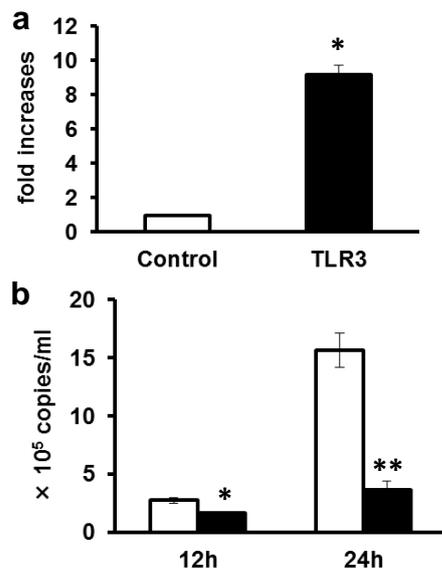
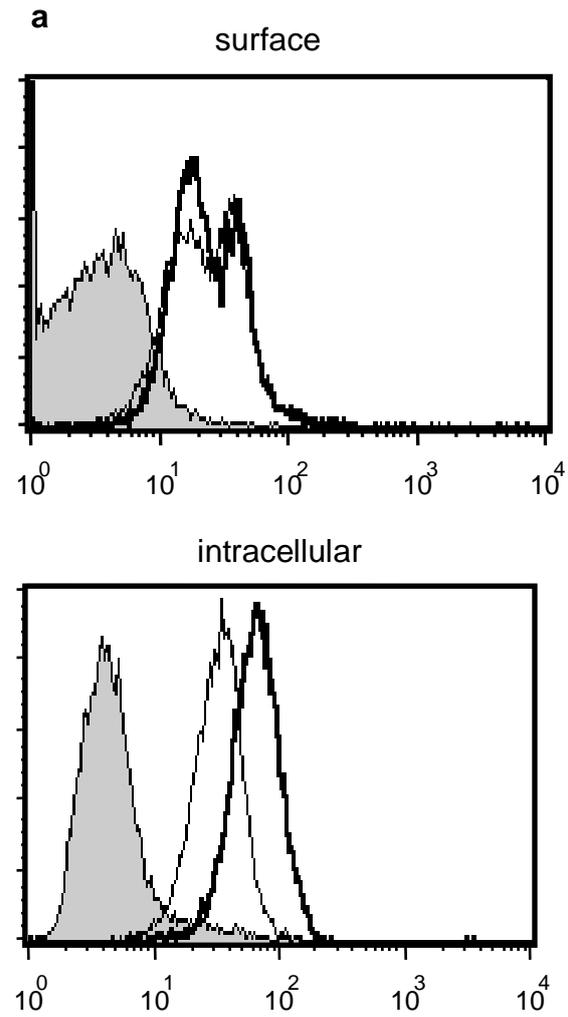


図 1 a A549 細胞に pUNO-hTLR3-HA ベクター (TLR3) あるいは pUNO-HA ベクター (Control) をトランスフェクションした後、リアルタイム RT-PCR にて測定された TLR3 mRNA 発現。b RSV 感染 12、24 時間後の TLR3 過剰発現細胞 (黒棒) 及びコントロール細胞 (白棒) における RSV コピー数。a、b 共データは 3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差で表記。\*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01。

(2) TLR3 持続的過剰発現細胞における細胞内での TLR3 過剰発現：TLR3 の抗 RSV 作用を更に検証する目的で、TLR3 持続的過剰発現 A549 細胞を作成した。TLR3 発現ベクター (pUNO-hTLR3-HA) 及びコントロールベクター (pUNO-HA) を A549 細胞にトランスフェクションした後、blasticidin S にて生存細胞の選別を行い、それぞれ複数コロニーを継代・増幅し凍結保存した。最終的に TLR3 過剰発現細胞 2 クローン (A548/TLR3-HA2 及び A549/TLR3-HA8) が細胞内に TLR3 を過剰発現していることがフローサイトメトリーで確認された (図 2)。これら 2 クローンを使用し以後の RSV 感染実験を進めた。



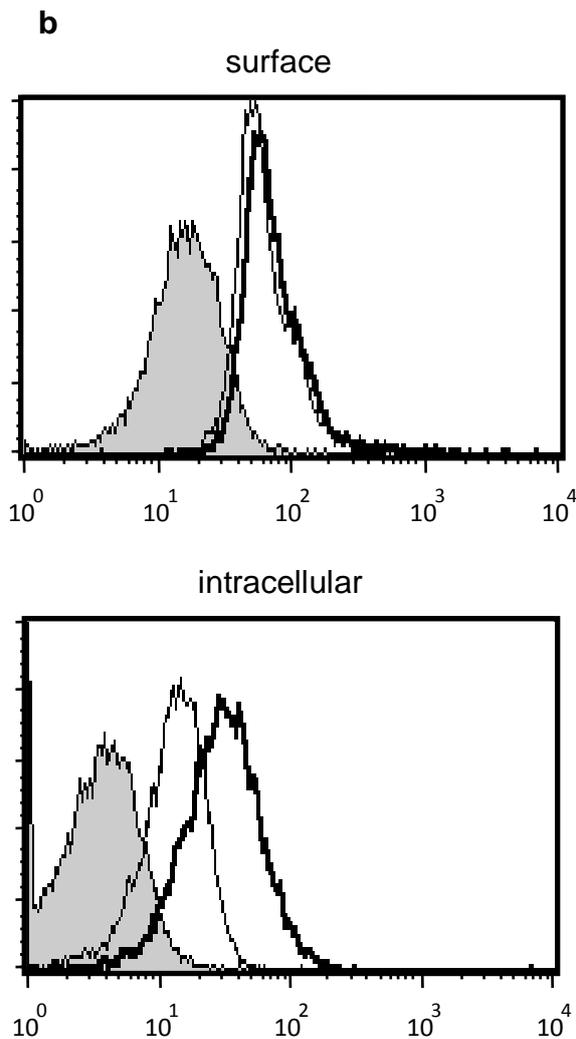


図 2 TLR3 持続的過剰発現クローン A549/TLR3-HA2 細胞 (a) 及び A549/TLR3-HA8 細胞 (b) での細胞質内 (intracellular) 及び細胞表面 (surface) における TLR3 発現のフローサイトメトリーによる解析。影の付いたピークは A549/TLR3-HA2 細胞 (a) 及び A549/TLR3-HA8 細胞 (b) PE ラベルマウス IgG1 で染色された細胞、細線は PE ラベル抗ヒト TLR3 抗体で染色された A549/HA3 細胞、そして太線は抗ヒト TLR3 抗体で染色された A549/TLR3-HA2 細胞 (a) 及び A549/TLR3-HA8 細胞 (b) を表す。

(3) TLR3 持続的過剰発現細胞における RSV の産生抑制: TLR3 持続的過剰発現クローン細胞 (A548/TLR3-HA2 細胞及び A549/TLR3-HA8 細胞) とコントロールクローン細胞 (A549/HA3 細胞) に Long 株を MOI 3 で感染させ、感染 12、18 及び 24 時間後に細胞培養上清を採取し急速凍結保存した。保存された上清における RSV 産生量をプラークアッセイにて定量した結果、TLR3 過剰発現細胞ではコントロール細胞よりも有意に RSV 産生量が抑制されていた。特に感染 24 時間後では RSV 産生抑制率は 80%以上であった (図 3)。以上

より、TLR3 持続的過剰発現細胞においても TLR3 の抗 RSV 作用が示された。

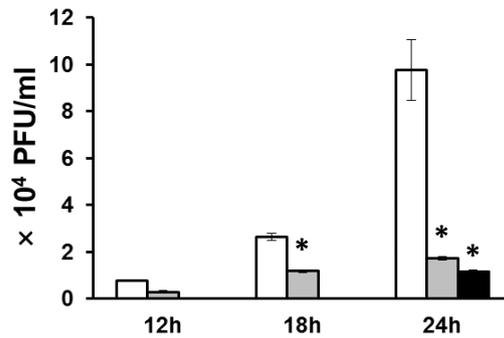


図 3 A549/HA3 細胞 (白棒)、A549/TLR3-HA2 細胞 (灰色棒) 及び A549/TLR3-HA8 細胞 (黒棒) における RSV プラークアッセイ結果。PFU: plaque forming units。データは 3 回の実験の平均値±標準誤差で表記。\*,  $P < 0.05$ 。

(4) IFN- $\beta$ による TLR3 の抗 RSV 作用の部分的媒介: これまで TLR3 の抗ウイルス作用には I 型 IFN (IFN- $\alpha/\beta$ )、特に IFN- $\beta$ の関与が報告されてきた。そこで TLR3 の抗 RSV 作用に IFN- $\alpha/\beta$ が関与しているかを検証するため、TLR3 持続的過剰発現細胞での RSV 感染実験で凍結保存した培養上清中の IFN- $\alpha/\beta$ を ELISA にて測定した。IFN- $\alpha$ はいずれの細胞において感染 24 時間後でも測定感度以下であった。これに対し IFN- $\beta$ は感染 18 時間後より測定可能であったが、予想に反し、感染 24 時間後ではコントロール細胞 (A549/HA3 細胞) の方が TLR3 持続的過剰発現細胞 (A549/TLR3-HA2 及び A549/TLR3-HA8 細胞) よりも有意に多量の IFN- $\beta$ を培養上清中に放出していた (図 4)。

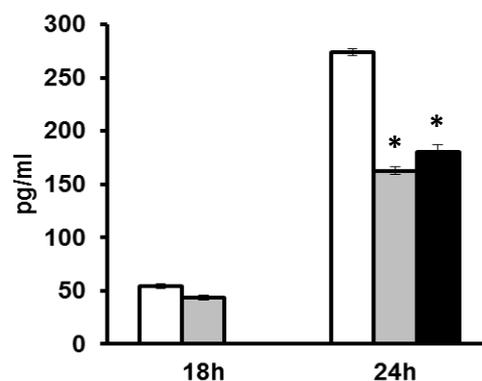


図 4 A549/HA3 細胞 (白棒)、A549/TLR3-HA2 細胞 (灰色棒) 及び A549/TLR3-HA8 細胞 (黒棒) の培養上清による IFN- $\beta$  ELISA。データは 3 回の実験の平均値±標準誤差で表記。\*,  $P < 0.05$ 。

上記の結果を検証するために、培養液中の IFN- $\beta$ を中和する抗 IFN- $\beta$ 抗体を RSV 感染直

後に細胞培養液中に添加して同様の実験を行った。抗 IFN- $\beta$ 抗体は 2,000 U/ml で添加した。この濃度では RSV 感染 24 時間後の A549 細胞培養上清中の IFN- $\beta$ を中和する (ELISA で検出感度以下となる) ことが予備実験で確認されている。RSV 感染 24 時間後における RSV 産生量は、抗 IFN- $\beta$ 抗体未添加群において A549/TLR3-HA2 細胞では A549/HA3 細胞と比較して有意に低下していた。抗 IFN- $\beta$ 抗体添加後では両細胞群とも未添加群と比較して有意に RSV 産生量が増加した。しかし A549/TLR3-HA2 細胞では抗 IFN- $\beta$ 抗体添加後も RSV 産生量は A549/HA3 細胞での水準まで上昇せずに低値であった (図 5)。

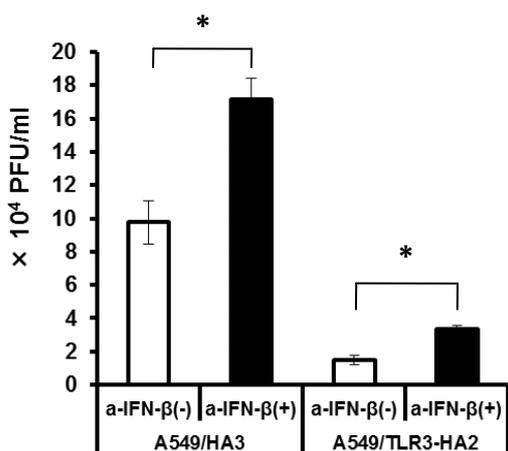


図 5 A549/HA3 細胞及び A549/TLR3-HA2 細胞における、抗 IFN- $\beta$ 抗体未添加 (a-IFN- $\beta$  (-)) (白棒) あるいは抗 IFN- $\beta$ 抗体添加 (a-IFN- $\beta$  (+)) (黒棒) での RSV プラークアッセイ結果。PFU: plaque forming units。データは 3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差で表記。\*,  $P < 0.05$ 。

RSV 感染 24 時間後に TLR3 持続的過剰発現細胞ではコントロール細胞に比して、IFN- $\beta$ 産生が有意に低下していたことに関して、TLR3 持続的過剰発現細胞では RSV 産生量も有意に低下していたことから、RSV 感染により TLR3 から IFN- $\beta$ 以外の別の因子が誘導され、それが抗 RSV 作用を現わし、結果的により多量の RSV が細胞に感染することで、より多量の IFN- $\beta$ が感染細胞から産生されたことが推測された。このことは TLR3 持続的過剰発現細胞で IFN- $\beta$ を中和しても、コントロール細胞の水準まで RSV 産生量が増加しなかったことから、TLR3 の抗 RSV 作用に IFN- $\beta$ はあまり関与せず、別の因子が媒介している可能性が考えられた。

(5) 結論: 本研究において dsRNA をリガンドとする TLR3 が、RSV 感染を抑制する方向に作用することが示された。またこの作用に対して、IFN- $\beta$ は中心的な役割を果たしていな

いことが推測された。

## 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 1 件)

- ① 永井和重、RS ウイルス感染症、チャイルドヘルス、査読無、13 巻、2010、788-791

[学会発表] (計 3 件)

- ① 渡辺一人、ヒト TLR3 過剰発現細胞クローンの樹立と RS ウイルス感染に対する感染抑制効果、第 41 回日本小児感染症学会総会・学術集会、2009 年 11 月 15 日、福井市  
 ② 渡辺一人、ヒト TLR3 過剰発現細胞クローンの樹立と RS ウイルス感染に対する感染抑制効果、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京都  
 ③ 渡辺一人、RS ウイルス感染に対する TLR3 の感染防御作用、第 112 回日本小児科学会学術集会、2009 年 4 月 17 日、奈良市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永井 和重 (NAGAI KAZUSHIGE)  
 札幌医科大学・医学部・研究員  
 研究者番号: 50347168

### (2) 研究分担者

堤 裕幸 (TSUTSUMI HIROYUKI)  
 札幌医科大学・医学部・教授  
 研究者番号: 80217348

及川 巧 (OIKAWA TAKUMI)

札幌医科大学・医学部・研究員  
 研究者番号: 70574739

### (3) 連携研究者

なし

