

機関番号 : 82603

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21791022

研究課題名 (和文) :

RSV 感染症における肥満細胞の脱顆粒化を誘導する非免疫系シグナルの特定

研究課題名 (英文) :

Identification of non-immunological signals that can induce degranulation of mast cells during RSV infection

研究代表者 :

白戸憲也 (SHIRATO KAZUYA)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号 : 40415477

研究成果の概要 (和文) : RS ウイルス(RSV)は世界中における小児呼吸器感染症の主要な原因ウイルスである。先の研究で、RSV に感染した A549 細胞は肥満細胞の脱顆粒化を誘導することが出来、それは RSV 感染 A549 細胞上に発現するなんらかの非免疫系シグナルによってひきおこされることを報告した。そこで本研究ではそれらのシグナルの特定を試みた。いくつかの分子をピックアップすることは出来たが、特定することが出来なかった。しかしそれらのシグナルの代わりに、RSV の複製に関連する因子としてサイトケラチン 8 および 18(C8/18)を特定することができた。RSV 感染における C8/18 の役割を解明するために、C8/18 を恒常的に発現させた HMC-1-C8/18、および C18 を恒常的にノックダウンした A549-C18KD を構築し、これらを用いて RSV 複製動態を調べた。その結果、通常の感染では HMC-1 と比較して、HMC-1-C8/18 においてわずかにウイルス複製が増加した。さらにウイルス感染効率を上昇させるため spinoculation 法を用いたところ、HMC-1-C8/18 細胞内における RSV 複製量は、陽性対象の A549 に匹敵するレベルであった。一方で培養上清中のウイルス量は A549 と比較して 100 倍以上低下していた。さらに、A549-C18KD では A549 と比較して、細胞内、培養上清中ともウイルス量は  $\log 0.5$ ~低下していた。よって、C8/18 は特にその初期段階において RSV 複製に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Respiratory syncytial virus (RSV) is a major causative agent of respiratory tract infections in children worldwide. Previously, we reported that mast cell degranulation was induced by A549 cells infected with RSV and this was induced by some non-immunological signals expressed on RSV-infected A549 cells. Therefore, we had tried to identify the signals but we could not find it. However, in their instead, we found that cytokeratin 8 and 18 were the molecules that had some relation to the RSV replication. To elucidate the role of C8/18 in RSV replication, the replication kinetics of the virus were examined using cloned HMC-1-C8/18 cells, derived from the human mast cell line HMC-1 by the insertion of *C8/18*, and A549-C18KD cells, in which *C18* was knocked down using a specific shRNA expression plasmid. By standard inoculation, the replication efficiency of RSV was slightly higher in HMC-1-C8/18 cells compared to HMC-1 cells. However, following spinoculation, RSV RNA replication was increased more than 10-fold compared with HMC-1 cells. In this situation, the intracellular titer of infectious virus in HMC-1-C8/18 cells matched that in A549 cells, while the release of virus into the culture fluid was much lower than with A549 cells. In addition, the RSV titer in A549-C18KD was  $\log 0.5$  to  $\log 1$  less than that in A549, not only in the cells, but also in the supernatant. This study demonstrates that C8/18 are directly associated with RSV replication, especially in the early stages.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,900,000		1,900,000
平成 22 年度	1,400,000		1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000		3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児感染症学

### 1. 研究開始当初の背景

RS ウイルス(RSV)は世界中における小児呼吸器感染症の主要な原因ウイルスである。先の研究で、RSV に感染した A549 細胞は肥満細胞の脱顆粒化を誘導することが出来、それは RSV 感染 A549 細胞上に発現するなんらかの非免疫系シグナルによって引き起こされることを報告した。そこで本研究ではそれらのシグナルの特定を試みた。いくつかの分子をピックアップすることは出来たが、特定することが出来なかった。しかしそれらのシグナルの代わりに、RSV の複製に関連する因子としてサイトケラチン 8 および 18(C8/18)を特定することができた。そこで、RSV 感染における C8/18 の役割に関する検討を行った。

### 2. 研究の目的

我々の先の研究において、ヒト肥満細胞株 HMC-1 は RSV の複製効率が極めて悪い細胞であることが明らかになっている。そこで主に HMC-1 細胞を用いて、RSV 複製における C8/18 の役割の検討を行った。

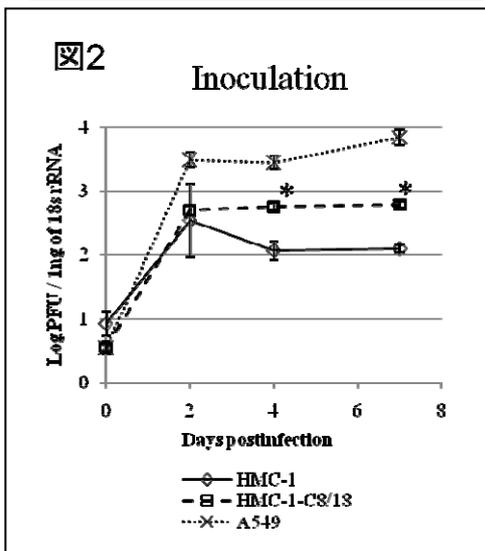
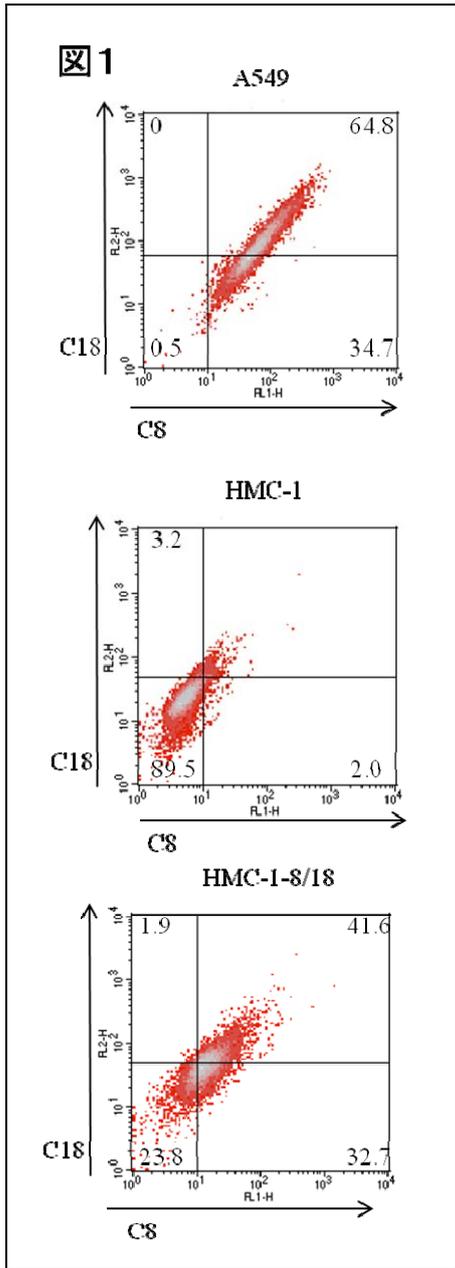
### 3. 研究の方法

C8/18 を恒常的に発現させた HMC-1-C8/18 を作成した。また逆に、C18 を恒常的にノックダウンした A549-C18knock-down(KD)を構築し、これら 2 種の細胞を用いて RSV 複製動態を調べた

### 4. 研究成果

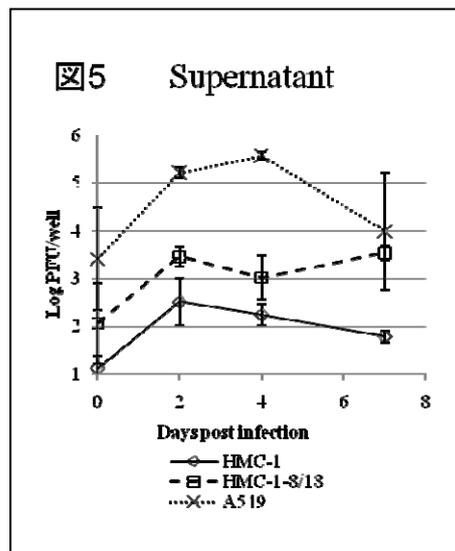
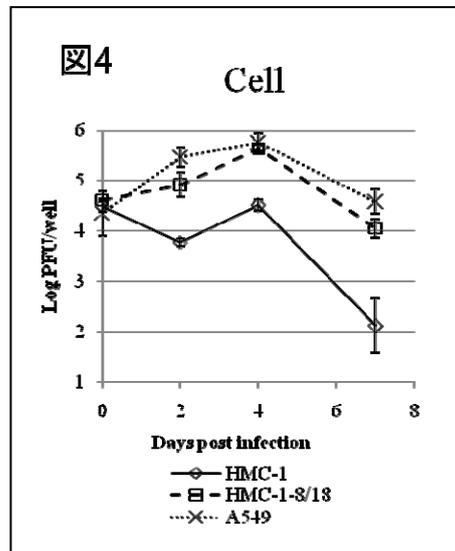
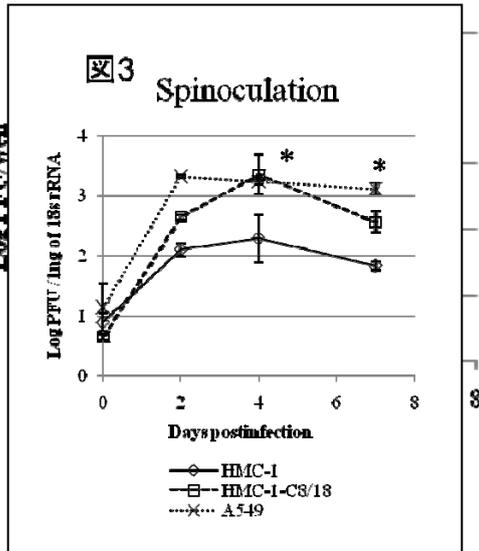
HMC-C8/18 が C8/18 を発現しているかどうかをフローサイトメトリーで確認された(図 1)。次に HMC-1-C8/18 に RSV を接種し、RNA の複製動態をリアルタイム PCR により調べたところ、通常の感染では HMC-1 と比較して、HMC-1-C8/18 においてわずかにウイルス複製が増加した(図 2)。さらにウイルス感染効率を上昇させるため spinoculation

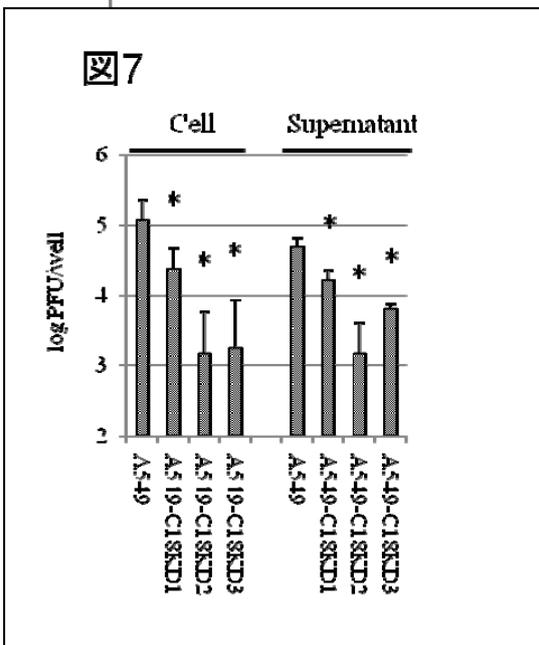
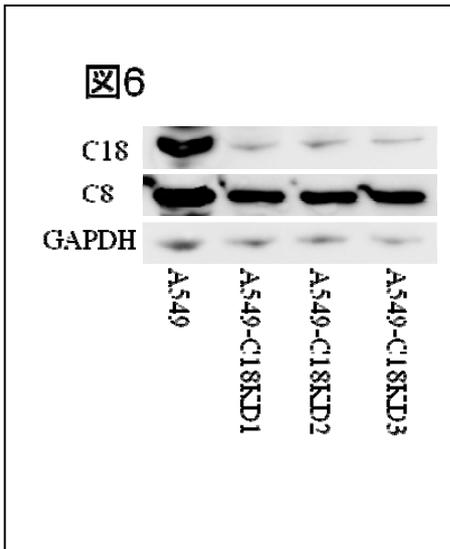
法を用いたところ、HMC-1-C8/18 細胞内における RSV 複製量は、陽性対象の A549 に匹敵するレベルであった(図 3)。Spinoculation を行った場合、細胞内の感染性ウイルス粒子量も A549 と同レベルに存在していた(図 4)。一方で培養上清中のウイルス量は A549 と比較して 100 倍以上低下していた(図 5)。次に A549-C18KD は C18 発現量が低下していることを確認された(図 6)。そこで A549 とともに RSV の感染実験を行ったところ、感染後 4 日後において細胞内、培養上清中ともウイルス量は  $\log_{0.5} \sim 1$  低下していた(図 7)。よって、C8/18 は RSV 複製に関与している可能性が示唆され、特に複製初期段階で作用している事が考えられた。



**Figure 4**

**Cell**





## 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 件)  
投稿準備中

〔学会発表〕(計 1 件)  
白戸憲也、川瀬みゆき、氏家誠、松山州徳  
細胞骨格蛋白 cytoke<sup>r</sup>atin8/18 が respiratory  
syncytial virus (RSV)の複製に与える影響につい  
て  
第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11  
月 徳島

〔図書〕(計 件)  
〔産業財産権〕

## ○出願状況 (計 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◇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  
白戸憲也 (SHIRATO KAZUYA)  
国立感染症研究所・ウイルス第三部  
・主任研究官  
研究者番号：40415477

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無