

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591187

研究課題名（和文）ヒト上気道モデルを用いた新規インフルエンザ複製機序の解明とその制御

研究課題名（英文） An investigation and its control of the novel influenza virus replication mechanism using human upper respiratory airway model

研究代表者

佐藤 晶論（SATO MASATOKI）

福島県立医科大学 医学部 講師

研究者番号：60423795

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスは宿主細胞に感染し細胞死を誘導する。また、宿主由来の蛋白分解酵素を利用して複製された仔ウイルスが感染性を獲得する。今回、感染細胞の細胞死とウイルス複製との関係を調べた。その結果、インフルエンザウイルスは感染した細胞にアポトーシス以外の細胞死を誘導し、この細胞死の経路で利用される蛋白分解酵素を利用して感染性を獲得するという新たな感染性ウイルス産生機序の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Influenza viruses induce the cell death to the host cell after infection and the viruses replicated acquire their infectivity using the protease derived from the host cells. In this study, the relation between the cell death induced by influenza virus infection and its replication was studied. As one of results, the novel virus replication mechanism, influenza viruses exploit one of the proteases to acquire infectivity which is induced after infection and contribute to the cell death, is suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：インフルエンザ、アポトーシス、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは表面の膜蛋白の一つであるヘマグルチニンをセリンプロテアーゼの作用により開裂させることで、新たな感染性を獲得する。しかしながら、セリンプロテアーゼを産生しない MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させても外因性のプロテアーゼ添加なしに新しいウイルスの複製サイクルが認められることから、感染

性を獲得するための未知の機序の存在が示唆されている。さらにその新しい複製機序が実際にヒト気道においても認められかどうかは不明である。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスが感染細胞にアポトーシスを誘導し、その際に用いられるプロテアーゼを自己の複製・増殖のために利用

しているとの仮説に基づきこれを検証した。

3. 研究の方法

(1) MDCK 細胞を用いた基礎実験

- ① ウイルス表面蛋白であるヘマグルチニン (HA) が開裂したウイルスを MDCK 細胞に接種し、段階希釈したプロテアーゼ阻害剤とともに 72 時間培養し、比色法によりプロテアーゼ阻害剤の細胞毒性を検討し、さらにリアルタイム PCR 法でウイルス量を定量化することによりその抗ウイルス効果について検討した。
- ② ウイルス量を半減させることのできる濃度 (EC50) の 10 倍の濃度のプロテアーゼ阻害剤存在下にウイルス感染 72 時間後まで経時的にウイルス量をリアルタイム PCR 法で定量化し、さらにウイルスヘマグルチニン (HA) の開裂の様子をウェスタンブロット法にて確認した。
- ③ ウイルスを細胞に感染させる前後に全カスパーゼ阻害剤である Z-VAD FMK、もしくはカスパーゼを介しないアポトーシス経路に重要な役割を担うセリンプロテアーゼの一つである HtrA2 の阻害剤である Ucf-101 を添加し実験を行った。

(2) ヒトアデノイドから上皮細胞を単離・培養し、これにウイルスを感染させ、さらにプロテアーゼ阻害剤存在下に培養し、プロテアーゼ阻害剤の抗ウイルス効果について検討した。

4. 研究成果

(1) MDCK 細胞を用いた基礎実験について

- ① 使用したプロテアーゼ阻害剤は MDCK 細胞に対して細胞毒性は示さなかった。
- ② 約 0.1 μ g/ml のプロテアーゼ阻害剤濃度

でプロテアーゼ阻害剤未添加のコントロールと比較しウイルス産生量を半減させることができた。

- ③ トリプシン添加プロテアーゼ阻害剤未添加条件下ではウイルス量は指数関数的に増加した。
- ④ トリプシン未添加プロテアーゼ阻害剤未添加条件下でもウイルス量は増加したが、トリプシン添加条件下に比較してウイルス量は 100 分の 1 程度であった。
- ⑤ トリプシン未添加プロテアーゼ阻害剤添加条件下ではウイルス量はさらに 100 分の 1 程度に減少させることができた。
- ⑥ ウイルス感染 8 時間後までは、トリプシン添加プロテアーゼ阻害剤未添加条件、トリプシン未添加プロテアーゼ阻害剤未添加条件、トリプシン未添加プロテアーゼ阻害剤添加条件のいずれのウイルス量にも差はなかった。
- ⑦ 培養 72 時間後の培養上清中のウイルス HA の開裂について、トリプシン添加プロテアーゼ阻害剤未添加条件ではすべての HA は開裂、トリプシン未添加プロテアーゼ阻害剤未添加条件では約半数の HA が開裂、トリプシン未添加プロテアーゼ阻害剤添加条件ではほとんどの HA が未開裂であった。
- ⑧ 各条件下でウイルス感染細胞内の細胞質基質を回収しウイルス HA について確認したところ、HA は非開裂状態であった。
- ⑨ ザイモグラムにて、カゼインまたはゼラチンを分解するプロテアーゼが検出された。しかし、これらの活性はウイルス増殖を抑制するプロテアーゼ阻害剤によって抑制されなかった。
- ⑩ Z-VAD FMK もしくは Ucf-101、さらに両者を併用し同様の実験を行ったが、いずれの条件でもウイルス増殖と細胞死を

抑制することはできなかった。

以上の結果により、

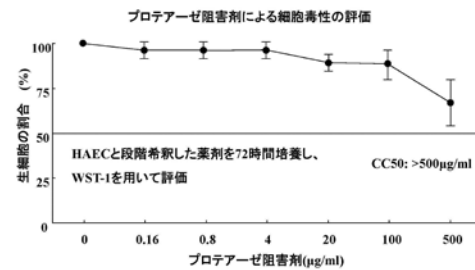
① 複製された仔ウイルスの HA がプロテアーゼを産生しないとされていた MDCK 細胞由来のプロテアーゼにより開裂し、効率よく感染性を獲得し増殖するが、既存のプロテアーゼ阻害剤で効果的に阻害されることが示された。つまり、ウイルス感染により MDCK 細胞内部から HA 開裂に関与するプロテアーゼが誘導されている可能性を示すものである。

② さらに、HA 開裂は MDCK 細胞から培養上清中に分泌されるプロテアーゼの作用によらない、またはザイモグラムでは検出できないプロテアーゼの作用により HA が開裂をうける可能性を示唆するものである。

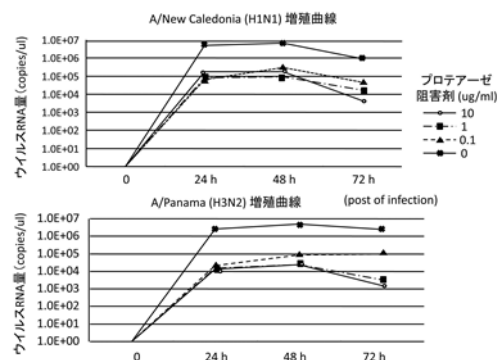
③ ウイルスは細胞感染後にアポトーシス以外の細胞死を誘導し、その経路では HtrA2 以外のセリンプロテアーゼが関与していることが考えられ、これがウイルス HA を開裂し以後のウイルス複製・増殖に寄与していると考えられた。これは現在まで報告がみられない新しいウイルス複製機序である。この機序を制御することでプロテアーゼ阻害剤が今までにない新しい抗ウイルス剤となりうる可能性がある。

(2) ヒトアデノイド由来上皮細胞モデルによる実験について

① 用いたプロテアーゼ阻害剤はヒトアデノイド由来上皮細胞に対して毒性を示さない(次図)。



② プロテアーゼ阻害剤により、対照と比較してウイルス増殖を効果的に抑制する(下図)。



以上の結果は、プロテアーゼ阻害剤がヒトで安全にかつ有効な抗ウイルス剤の候補となりうることを示すものである。

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 6 件)

(1) Watanabe M, Suyama K, Hashimoto K, Sato M, Ohara S, Abe Y, Kawasaki Y, Yamaguchi S, Saijo M, Hosoya M. Mumps Virus-Associated Acute Encephalopathy: Case Report and Review of the Literature. *J Child Neurol.* 2012 ;28:243-245. DOI: 10.1177/0883073812441060. 査読有

(2) Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, Sato T, Kanno S, Takano K, Ito M, Katayose M, Nishimura H, Kawasaki Y,

Hosoya M. Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. J Med Virol. 2012;84:1135-1142. DOI: 10.1002/jmv.23306. 査読有

- (3) Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA, Simmerman JM, Gordon A, Sato M, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. Lancet. 2011;378:1917-30. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61051-9. 査読有
- (4) Hashimoto K, Katayose M, Sakuma H, Kawasaki Y, Sumikoshi M, Sakata H, Sato M, et. al. Uteroglobulin-related protein 1 and severity of respiratory syncytial virus infection in children admitted to hospital. J Med Virol. 2011;83:1086-92. DOI: 10.1002/jmv.22073. 査読有
- (5) Katayose M, Hosoya M, Haneda T, Yamaguchi H, Kawasaki Y, Sato M, Wright PF. The effectiveness of trivalent inactivated influenza vaccine in children over six consecutive influenza seasons. Vaccine. 2011;29:1844-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.12.049. 査読有
- (6) Kawasaki Y, Endo K, Suyama K, Sato M, Ito M, Hashimoto K, Hosoya M. Serum SP-D levels as a biomarker of lung injury in respiratory syncytial virus bronchiolitis. Pediatr Pulmonol. 2011;46:18-22. DOI: 10.1002/ppul.21270. 査読有

[学会発表] (計4件)

- (1) 佐藤晶論、経時的にペラミビル血中濃度とウイルス量を測定したインフルエンザの検討。第44回日本小児感染症学会。2012年11月24日、25日、北九州市。
- (2) 佐藤晶論、インフルエンザウイルス感染 MDCK 細胞のアポトーシスとウイルス複製。第43回日本小児感染症学会。2011年10月29日、30日、岡山市。
- (3) Sato M. The effectiveness of trivalent inactivated influenza

vaccine in children over six consecutive influenza seasons. The 49th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, 2011年10月20日～23日、ボストン、米国。

- (4) Sato M. Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. Options for the Control of Influenza VII. 2010年9月3日～7日、香港、中国。

[図書] (計1件)

佐藤晶論。中山書店、小児科臨床ピクシス、小児感染症-最新カレンダー&マップ。ウイルス性髄膜炎。2011; 32-35。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 晶論 (SATO MASATOKI)
福島県立医科大学 医学部 講師
研究者番号: 60423795

(2) 研究分担者

細矢 光亮 (HOSOYA MITSUAKI)
福島県立医科大学 医学部 教授
研究者番号: 80192318

橋本 浩一 (HASHIMOTO KOUICHI)
福島県立医科大学 医学部 准教授
研究者番号: 50322342

大原 信一郎 (OHARA SHINICHIRO)
福島県立医科大学 医学部 助教
研究者番号: 00566846