

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592778

研究課題名(和文) ロタウイルスの口腔粘膜上皮感染に関する研究

研究課題名(英文) Rotavirus infection to oral epithelial cells

研究代表者

浅野 正岳 (Asano, Masatake)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10231896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ロタウイルスは乳幼児ウイルス性下痢症の主な原因であり、感染経路は糞口感染であるとされている。本研究においてはウイルスの侵入門戸である口腔粘膜上皮に対するロタウイルスの感染性について研究することを目的とした。口腔癌由来培養細胞株を用いた感染実験の結果、ロタウイルスは口腔粘膜上皮にも感染することが明らかとなった。また、これと並行して行った腸管上皮細胞における感染実験では、type III インターフェロンの産生に至るシグナル伝達経路の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：Rotavirus is a leading cause of the infant virus-related diarrhea. The main target of rotavirus infection is intestinal epithelial cells. The purpose of this study is to elucidate whether rotavirus can infect to oral epithelial cells. For this purpose, oral squamous cell carcinoma-derived cell lines were selected. The infectivity of rotavirus was examined by both real-time PCR and immunofluorescence cell staining. The results clearly indicated that rotavirus can infect oral epithelial cells. Using intestinal adenocarcinoma cell line, HT-29, the production of type III interferon was also examined. The results indicated that rotavirus infection leads to type III interferon production mainly through NF- κ B pathway. Rotavirus infection also leads to the production of type I interferon. The comparison between type I and type III interferons revealed that type III interferon was produced much higher amount but the anti-viral effect was much profound in type I interferon.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：ロタウイルス 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスは乳幼児ウイルス性下痢症の主な原因であり、感染経路は糞口感染であるとされている。しかし、ウイルスの侵入門戸である口腔の上皮細胞における感染の可能性については何ら報告がない。また、腸管上皮細胞において、ロタウイルスに続いて産生される type III インターフェロンについてはその生物学的重要性が指摘されている。しかし、そのシグナル伝達メカニズムに関しては明らかにされていない。type III インターフェロンはウイルス感染において極めて重要な機能を有すると考えられ、その発現メカニズムの解明はウイルス感染防止の観点から極めて意義深いものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究においてはウイルスの侵入門戸である口腔粘膜上皮に対するロタウイルスの感染性について研究することを目的とした。また、腸管上皮細胞における type I および type III インターフェロン産生のメカニズムについて、生化学的および分子生物学的に検索し、両者のロタウイルス感染防御機能を比較することとした。

3. 研究の方法

(1) ロタウイルスの、口腔粘膜上皮に対する感染性の判定

口腔扁平上皮癌細胞株である Ca9-22、HSC2 および HSC3 細胞を感染実験に用いた。細胞を 2×10^5 /35mm dish の割合で播種し、18 時間培養する。培養後の細胞を、FCS を含まない DMEM で 30 分間 starvation した後、SA11 株および RRV 株を multiplicity of infection 0、0.1、1、10 として感染させた。感染は、5% CO₂ インキュベーター内で 1 時間行った。感染後、10% FCS-DMEM で細胞を洗浄し、更に培養を続け、1、3、6、9、12、24 時間後に total RNA を回収した。通法に従い cDNA を作製した後、RT-PCR 法によりロタウイルス VP6 mRNA の発現を解析した。この実験を通じて、

ロタウイルス由来 mRNA 発現の至適条件を検討した。

(2) ヒト腸管上皮細胞におけるインターフェロンの産生

ヒト大腸がん由来培養細胞 HT-29 を用い type I および type III インターフェロン産生の有無とそのシグナル伝達メカニズムについて検索した。HT-29 を 1×10^6 /24-well dish で播種し、18 時間培養した。培養後の細胞を (1) と同様に処理し SA11 株および RRV 株を感染させた。感染後の細胞培養上清を回収し、ELISA によりインターフェロン産生の有無を確認した。

(3) インターフェロン産生のシグナル伝達経路

インターフェロン産生に至るシグナル伝達経路の解明を目指し、感染実験に先立ち、細胞を NF- κ B inhibitor で処理した後、(2) と同様に感染させた。感染後のインターフェロン産生を ELISA により測定した。また、interferon regulatory factor (IRF) の関与については small interfering RNA (siRNA) を用いた knock down 実験を行った。

(4) type I および type III インターフェロンの比較

リコンビナント type I および type III インターフェロンを種々の濃度で HT-29 を前処理後、SA11 を感染させた。感染 18 時間後に細胞を固定し、1% Triton X-100 によりさいぼうを処理した後、蛍光免疫染色により VP6 タンパク質の産生を観察した。また、同様に処理した細胞から total RNA を抽出し、通法に従って cDNA を調整後、real-time PCR により VP6 遺伝子発現を定量的に解析した。これにより type I および type III インターフェロンの感染抑制効果について比較検討した。

4. 研究成果

(1) ロタウイルス感染後の口腔上皮細胞 Ca9-22 および HSC3 から抽出した RNA を用い

で行った real-time PCR の結果、ウイルスを 1 時間感染させた後、さらに 2 時間培養することによりロタウイルス由来の VP6 遺伝子発現を効率よく検出することができた。この条件下で感染実験を行ったところ、ウイルス感染細胞からのみ VP6 遺伝子の発現を特異的に確認することができた。また、同様に感染させた細胞を用いた蛍光免疫染色の結果、感染細胞において明瞭な viroplasm の形成を確認することができるのが、最低でも 14 時間後であることが明らかとなった。今回用いたすべての培養細胞株において、VP6 および viroplasm の検出に成功し、口腔上皮細胞においてもロタウイルスの感染が成立することが明らかとなった。

(2) 腸管上皮細胞におけるインターフェロン産生について ELISA による測定を行ったところ図 1 に示すとおり、type III インターフェロンに関しては一過性の産生が認められた。興味深いことに、type III インターフェロン産生は moi の低下と共に遷延化する傾向にあり、moi 0.17 では発現のピークが 12 時間後に認められた。また、ロタウイルスの SA11、RRV 株共に type III インターフェロン産生を誘導したが、SA11 株においてより効率的な産生誘導が認められた。

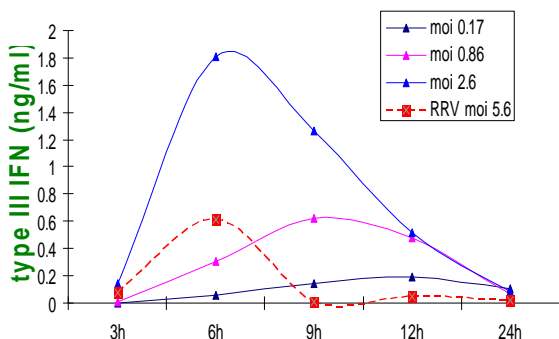


図 1 ロタウイルス感染に伴う type III インターフェロン産生の時間的推移

一方 type I インターフェロンについては産

生量は type III インターフェロンに比較して約 1/10 であることが解った。また産生様式も、type I インターフェロンでは一時減弱するものの、時間経過とともに産生能が回復することが明らかとなった。これは、HT-29 細胞に表出される type I および type III インターフェロンレセプターの質的違いに由来する現象ではないかと考え、現在検索を続けている。

(3) ロタウイルス感染に続く type III インターフェロン産生のシグナル伝達経路について検索するため、転写因子 NF- κ B の特異的なインヒビターである isohelenin 及び TPCK を用いた実験を行った。その結果、type III インターフェロン産生はそれぞれのインヒビターの濃度依存的に抑制され、50 μ M においてはほぼ完全に産生が抑制されることが明らかとなった(図 2)。このことからロタウイルス感染による type III インターフェロン産生は NF- κ B に依存することが明らかとなった。

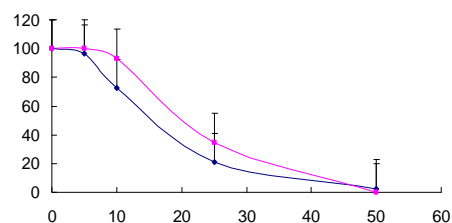


図 2 TPCK (red)および isohelenin (black) による type III インターフェロン産生抑制

一方、IRF に対する siRNA を用いた実験では、それぞれの IRF 遺伝子の発現低下を real-time PCT により確認した後に、ロタウイルス感染を行い、培養上清に含まれる type III インターフェロンを ELISA により測定したところ、IRF1 の若干の関与が示唆されたものの、従来から type III インターフェロン産生に重要とされていた IRF3, 5, 7 では産生量に有意な差は認められなかった。このことから、HT-29 では type III インターフェロ

ン産生のシグナル伝達経路に何らかの変異がある可能性が示唆された。

(4) type I および type III インターフェロンの抗ウイルス活性を比較するためにそれぞれのリコンビナントタンパク質を用いた前処理実験を行った。その結果、type I インターフェロンは type III インターフェロンと比較して、より低濃度で効率よくロタウイルス感染を抑制することが明らかとなった。

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)

Omagari D, Takenouchi-Ohkubo N, Endo S, Ishigami T, Sawada A, Moro I, Asano M, Komiyama K. Nuclear factor kappa B plays a pivotal role in polyinosinic-polycytidylic acid-induced expression of human β -defensin 2 in intestinal epithelial cell. Clin Exp Immunol, 査読有, 165, 85-93, 2011

[学会発表](計3件)

Asano M, Iwasa S, Nishiyama M, Sato G, Gojoubori T, Komiyama K. ASSESSMENT OF ANTI-VIRAL ACTIVITY OF ACID-ELECTROLYZED FUNCTIONAL WATER (FW)

5th European rotavirus biology meeting, Valencia (Spain), 2013, October 6th

Sato G, Gojoubori T, Omagari D, Asano M, Komiyama K. EVALUATION OF PREVENTIVE EFFECT OF TYPE I AND TYPE III IFN ON ROTAVIRUS INFECTION.

5th European rotavirus biology meeting, Valencia (Spain), 2013, October 7th

Asano M, Omagari D, Gojoubori T, Komiyama K. PRODUCTION OF TYPE III IFNS BY ROTAVIRUS INFECTED INTESTINAL EPITHELIAL CELLS.

11th International symposium on double-stranded

RNA viruses. Puerutoriko (USA), 2012, November 30th

[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

浅野 正岳 (ASANO, Masatake)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号: 1 0 2 3 1 8 9 6

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: