

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23790507
 研究課題名（和文） RS ウイルス感染鼻粘膜上皮細胞における IFN λ の産出機序
 と病態形成への関与
 研究課題名（英文） Producing mechanism and function of IFN- λ in nasal epithelial cells
 infected with RS-virus.
 研究代表者 岡林 環樹 (OKABAYASHI TAMAKI)
 大阪大学・微生物病研究所・特任准教授
 研究者番号：10359995

研究成果の概要（和文）：

我々は「RSV感染ヒト鼻粘膜上皮細胞では、III型IFNであるIFN- λ が優位に誘導される」ことを見出した。しかし、RSV感染小児鼻汁では、IFN- λ とIFN- β に有意な差は認められなかった。鼻汁中に肺炎レンサ球菌の混在、ケモカインの産生を確認した。ビールの苦み成分「フムロン」が、RSV複製、ケモカイン産生を、また、抗菌薬「クラリスロマイシン」が、ケモカイン産生、肺炎レンサ球菌付着を、抑制した。これらの結果は、新しいRSV治療方針の可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

We reported that IFN- λ is the predominant IFN induced from RSV infected nasal epithelial cells. However, there were no-significant difference between IFN- λ and IFN- β in nasal discharge of RSV-infected child. *Streptococcus pneumonia* and chemokines in nasal discharge were detected. Humuleone, the main constituent of hop bitter acids, inhibited RSV replication and chemokines production, and Clarithromycin, antimicrobial agent, inhibited chemokines production and PAF expression, which is the receptor of *S. pneumonia*. These results suggested new treatment approach to RSV infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	3,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：RS ウイルス、hTERT 導入ヒト正常細胞、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、ヒトテロメラーゼ遺伝子(hTERT)を導入する事により継代可能としたヒト正常鼻粘膜上皮細胞を樹立し、RSV

の侵入門戸となる正常鼻粘膜の感染系を作製することに成功した。この系により、RSV感染した鼻粘膜上皮細胞では、IFN- α/β といったI型IFNはほとんど産生されず、IFN- λ

という新たに見い出された III 型 IFN が産生されることを明らかにした (Okabayashi et al., Virus Res. 2011)。さらに、この IFN- λ が、細胞質内ウイルスセンサーである Retinocic acid-inducible gene-I (RIG-I) を起点とした抗ウイルス自然免疫応答を担っていることを明らかにした。

これまでの RSV の基礎研究においては、肺胞上皮ガン細胞である A549 や気道上皮細胞などの、RSV 感染の第一標的細胞ではなく、維持しやすいガン細胞を用いられてきた。それにより RSV 感染時には I 型 IFN が誘導されることが報告されてきた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの正常鼻粘膜細胞系を用いることにより、RSV 感染時の第一標的細胞における自然免疫応答の解明と、IFN- λ が RSV 感染症に及ぼす影響の基礎研究と、臨床検体による裏付けを行い、RSV 感染症および喘息、アトピーなどの RSV 関連アレルギー疾患の予防的診断、治療法開発へ展開するため、以下の基礎研究を行う。

- 1) 正常鼻粘膜細胞と、A549 細胞を始めとする RSV 感染実験に用いられる培養細胞における自然免疫応答を、IFN、サイトカイン、ケモカイン誘導性の違いから明確にする。
- 2) RSV 感染者由来の鼻汁を用いて、IFN- λ 産生量を測定し、ウイルス増殖性、臨床症状との関連性を調べる。
- 3) RSV 患者およびアレルギー患者における鼻汁由来細胞、末梢血細胞における IFN- λ 産生性および IFN- λ 反応性を調べ、IFN- λ とアレルギー症状との関連性を明らかにする。
- 4) RSV 感染時のウイルス複製、サイトカイン

ン産生調節に影響する因子の探索を行う。

3. 研究の方法

1) 札幌医科大学で樹立した、ヒトテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) を導入することにより継代可能としたヒト正常鼻粘膜細胞に RSV を感染させ、その上清中の各種 IFN、サイトカイン量を測定した。

2) 札幌医科大学病院小児科に来院した RSV 感染小児から鼻汁を回収し、各種 IFN、サイトカイン量を測定した。鼻汁中 IgA 濃度を ELISA により測定し、IgA 濃度を基準とすることにより、各患者の鼻汁中 IFN、サイトカイン量を比較した。

3) hTERT 遺伝子導入したヒト正常鼻粘膜細胞、肺胞上皮細胞を用いた RSV 感染細胞培養系を用いて、ウイルス複製、サイトカイン産生に影響する因子の探索を行った。

対象としては、抗菌薬「クラシルロマイシン」(アボットジャパン提供)、ビールの苦み成分である「フムロン」(サッポロビール提供)を使用した。

4) IFN、サイトカイン量の測定には、細胞内 RNA もしくは鼻汁中細胞 RNA を用いた半定量的 RT-PCR、細胞上清、鼻汁を用いた ELISA を使用した。

5) 呼吸器細胞表面に発現する肺炎レンサ球菌受容体「PAF 受容体」を、FACS、RT-PCR により測定した。

6) 肺炎レンサ球菌の呼吸器細胞表面への付着を確認するために、FITC 標識した肺炎レンサ球菌を用いた。RSV 感染した呼吸器細胞に、各種化合物を処理し、FITC 標識レンサ球菌を

感染させた。それぞれの対象において、細胞表面に付着したレンサ球菌数を FACS により解析した。

4. 研究成果

1)我々は、hTERT 遺伝子導入ヒト正常鼻粘膜細胞に RSV が感染すると、RIG-I 依存的に IFN- λ が誘導されることを見出した。そこで、実際の RSV 感染者鼻汁における IFN、サイトカイン量を測定した。札幌医科大学病院小児科に来院した RSV 感染小児 (n=65) から鼻汁を回収し、鼻汁中 IFN 量、IgA 量を ELISA にて測定した。鼻汁中 IgA 濃度を基準とした IFN- λ と IFN- β 産生量を比較したところ、両者の産生量に有意な差は認められなかった (IFN- λ :IFN- β =0.45:0.48)。

これらの鼻汁中に肺炎レンサ球菌の混在と IL-8, RANTES の産生を確認し、RSV 患者の病態に、細菌の混合感染を併発した炎症性ケモカインの誘導が関連していることを確認した。

2) RSV を感染させた A549 肺胞上皮細胞に、クラリスロマイシンを 0-100 μ g/ml で処理しても、RSV のウイルス力価、G 遺伝子発現量には影響しなかった。その時の細胞上清中のサイトカイン、ケモカインを測定してみると、IL-6, IL-8, RANTES の産生量がクラリスロマイシン濃度依存的に抑制されていた (図 1)。

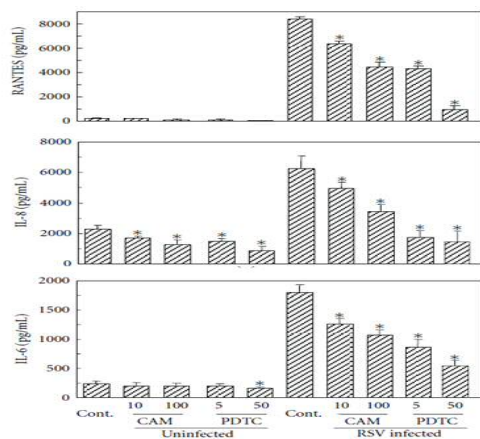


図 1. クラリスロマイシン (CAM) における RSV 誘導性 RANTES, IL-8, IL-6 の抑制

3)呼吸器上皮細胞表面上に発現する肺炎レンサ球菌受容体 PAF 受容体は、RSV が感染することにより発現量が増加した。この受容体の発現量は、クラリスロマイシン濃度依存的に抑制された。クラリスロマイシンによる PAF 受容体の発現抑制を確認するために、FITC 標識した肺炎レンサ球菌を、クラリスロマイシン処理した RSV 感染呼吸器上皮細胞に処理すると、非処理群に比べて、処理群では FITC 標識細菌の付着が有意に低かった (図 2)。

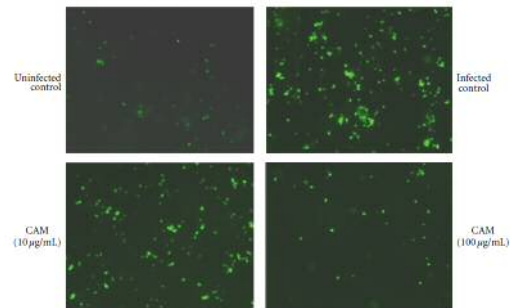


図 2. クラリスロマイシン (CAM) 処理による FITC 標識肺炎レンサ球菌付着の抑制

このことより、クラリスロマイシンは、RSV 感染細胞からの炎症、アレルギーに関与するサイトカイン、ケモカインの産生抑制を起こし、さらに肺炎レンサ球菌の付着も抑制することが分かった。抗菌薬による新たな抗菌活性および抗炎症作用という知見を見出した。

4) RSV を感染させた hTERT 導入ヒト正常鼻粘膜細胞にフムロンを 0-10 μ M で処理すると、RSV ウイルスの G 蛋白発現量、RNA 量が抑制された (図 3)。

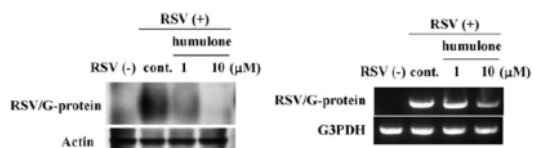


図 3. フムロンによる RSV 複製の抑制

感染細胞の免疫染色、ウイルス力価測定においても、フムロンによる RSV 産生抑制を確認できたことから、フムロンには RSV 感染を抑制する効果があることを明らかにした。

5) また、RSV 感染細胞にフムロンを処理し、ケモカインの産生抑制効果を検討した。フムロンの濃度依存的に、RSV により誘導されるケモカイン IL-8, RANTES がフムロン処理により抑制されることが分かった (図 4)。

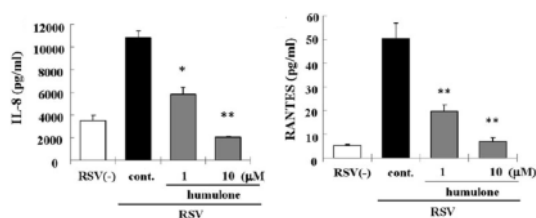


図 4. フムロンによる

RSV 誘導ケモカインの産生抑制

これらの結果より、RSV が感染したヒト鼻粘膜細胞において、ビールの苦み成分であるフムロンがウイルス複製、それによるケモカイン産生を抑制的に作用することが明らかになった。フムロンは NF- κ B 情報伝達経路を抑制することが報告されているが、今回の実験ではウイルス複製を抑制することによるケモカインの誘導が抑えられているために、他の経路への遮断効果が作用している可能性を示唆した。これらの知見より、フムロンが RSV 感染症に対して抑制効果を示す生物学的製品として有効であることが示された。

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 2 件)

Fuchimoto J, Kojima T, Okabayashi T, Masaki T, Ogasawara N, Obata K, Nomura K, Hirakawa S, Kobayashi N, Yokota SI, Fujii

N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Humulone suppress replication of RSV and release of IL-8 and RANTES in normal human nasal epithelial cells. Med. Mol. Morphol, Feb. 2013. (査読有)

doi : 10.1007/s00795-013-0024-1

Yokota SI, Okabayashi T, Hirakawa S, Tsutsumi H, Fujii N. Clarithromycin suppresses human RSV infection -induced Streptococcus pneumoniae adhesion and cytokine production in a pulmonary epithelial cell line. Mediators Inflamm. Jun. 2012. (査読有)

doi : 10.1155 · 2012/528568

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡林 環樹 (OKABAYASHI TAMAKI)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号 : 10359995