

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861573

研究課題名(和文) ヒト鼻粘膜上皮を用いた呼吸器ウイルス感染に対する新規治療戦略の検討

研究課題名(英文) Curcumin suppresses replication of respiratory syncytial virus and release of inflammatory cytokines and chemokines in normal human nasal epithelial cells.

研究代表者

大國 毅 (Okuni, Tsuyoshi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40464490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：RSウイルス(RSV)は小児の気管支炎や免疫不全患者における肺炎を引き起こし、気管支喘息の増悪因子として重要な病原体であるが、現在までに有効な治療法はない。RSVの最初の標的は鼻粘膜であり、ウイルス複製が進むと下気道に進展、重症化すると考えられている。本研究では、正常ヒト鼻粘膜上皮細胞を用い、さまざまな薬理効果(NF- κ B阻害作用、翻訳調節因子eIF2の脱リン酸化阻害、proteasome阻害)をもつ食品成分クルクミンのRSVに対する抗ウイルス作用について示した。安全性の高いクルクミンによるRSVに対する新規治療法の可能性につながる知見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the most important pathogens for bronchitis, pneumoniae and asthma in infants and young children. However, an effective vaccine and anti-viral therapy for RSV infection have not yet been developed. RSV replicates in the airway mucosa, where it may produce uncomplicated upper respiratory infection or spread distally to lower airways, producing more severe lower respiratory tract infection. In this study, we showed that curcumin which has multipharmacological effects including inhibition of NF- κ B activation, proteasome activation and eIF2 alpha dephosphorylation prevented the replication of RSV in human nasal epithelial cells. Inhibition of RSV in HNECs by curcumin may be effective treatment and prevention for severe lower respiratory disease.

研究分野：ヒト鼻粘膜上皮における自然免疫

キーワード：ヒト鼻粘膜上皮 呼吸器ウイルス

1. 研究開始当初の背景

Respiratory syncytial virus (RSV)はかぜ症候群の原因となる呼吸器ウイルスであり、健常成人では軽微な症状で回復することがほとんどである。しかし乳幼児におけるRSV感染は、肺炎や細気管支炎の原因となる病原体として知られる。1歳までに約60%、3歳までにほぼ100%で感染が認められるが、初感染のおよそ30%の症例で上述の下気道炎症を引き起こすとされる。さらに、RSVは気管支喘息の増悪因子のひとつであるとも考えられている。またRSV感染は生涯にわたり反復して起こるため、高齢者や呼吸器疾患をもつ成人においても重篤な下気道病変の原因になり得る。このように小児から成人において、RSVは重要な呼吸器ウイルスであるが、現在までに有効な薬剤は存在しておらず、新規治療法の開発は急務である。

RSVは接触あるいは飛沫により感染する。このウイルスの最初のターゲットは鼻粘膜上皮であり、複製がすすみウイルス量が増加すると、これを含む分泌物を介し下気道炎症へ進展することが推察されている。過去の報告で、われわれは正常ヒト鼻粘膜上皮細胞 (human nasal epithelial cells; HNECs)へのRSV感染モデルを確立している。この検討の中で、HNECsにおいては、上皮極性蛋白であるタイト結合 (claudin-4, occludin) の局在変化、ウイルス複製・出芽および炎症性サイトカイン・ケモカイン産生に関して、NF- κ Bシグナル分子が重要な役割を果たしていることが示された。

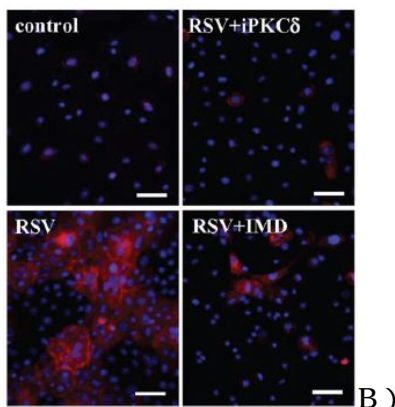
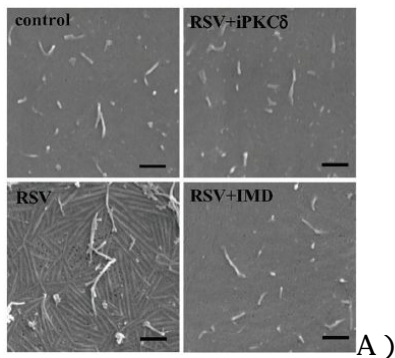


図 1-A) SEM による観察。NF- κ B 阻害剤

(IMD-0354)によりウイルス出芽が抑制される。

図 1-B) claudin-4 に対する免疫染色。RSV感染により増加する claudin-4 は、NF- κ B 阻害剤により抑制される。

以上これまでの発見および我々の過去の報告に基づき、RSV感染に対する予防または新たな治療法の開発につながる知見を得るため、HNECsを用い検討するという着想に至った。

2. 研究の目的

気道上皮、特に鼻粘膜上皮は呼吸器ウイルスに対する宿主防御の first line である。上皮は最頂部の細胞間接着装置、タイト結合分子により上皮バリアを形成しウイルスの侵入を防いでいるとされる。鼻粘膜上皮においても、この上皮バリアが発達していることは、以前から知られている。さらにこの分子は上皮細胞極性にも関わり、生体恒常性の維持に重要な factor である。しかし過去の報告から、複数のウイルスがこのタイト結合分子を逆に利用し、感染を成立させることが示された。前述のようにわれわれは、HNECsにおいて、RSV出芽にはタイト結合分子が関連している可能性を報告した。実験材料がとしてHNECsを用いることで、これらのタイト結合分子の発現・局在変化、ウイルス複製および出芽、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生、以上の反応を抑制する効果が見られれば、抗ウイルス作用を有すると判定することができる。さらに本研究でHNECsを用いている重要な点として、ウイルスの特性、つまりその種類により感染する宿主が異なること(宿主域)、標的とする組織・細胞が異なること(細胞指向性、トロピズム)が挙げられる。動物や不死化した癌細胞を用いた実験では、結果の解釈、ヒトへの治療の応用が困難となる。延命化したHNECsによる検討では、実際のウイルス性上気道炎に生じる生理的变化、また治療効果をとらえるものとする。

近年、疾病予防・アンチエイジング効果のある機能性食品のうち、抗ウイルス作用を発揮する天然由来成分の研究が進んでいる。その中でもわれわれは、すでに広く利用が進んで安全性が確立しており、かつ新規治療法のターゲットとなりえるNF- κ Bの阻害作用を示す“クルクミン”に着目した。クルクミンは天然生薬ウコンに含まれるポリフェノールの一種で、抗ウイルス作用、抗炎症作用、抗酸化作用、抗腫瘍作用といった効果を有している。さらにクルクミンは proteasome, cyclooxygenase-2, JNK, PKC, lipoxigenase, eIF2 の抑制効果も示す。クルクミンがRSVに対し実際に抗ウイルス作用を示すか、またそのメカニズムについて検討することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を遺伝子導入した正常ヒト鼻粘膜上皮細胞への RSV 感染モデルを抗ウイルス作用の評価系として用いる。

手術で得られた下甲介粘膜組織より上皮細胞を分離培養，ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human catalytic submit of telomerase reverse transcriptase; hTERT) を遺伝子導入し延命化したヒト鼻粘膜上皮細胞に，RSV 感染細胞である HEP2 細胞の上清をかけ 1 時間感染させる (MOI=1) . この感染細胞に対し，クルクミン，IMD0354 を処置し，エンベロップ蛋白の発現変化，ウイルス出芽の様子の変化などをウェスタンブロット法，免疫染色，SEM を行った．また以下の実験も行った．

(2)Gene Chip を用い，遺伝子発現変化を網羅的に解析する。

クルクミン処置によりウイルス複製阻害作用があるのか，また上皮細胞の反応性の変化を遺伝子レベルで網羅的に解析する為，DNA マイクロアレイを行った．

(3)炎症性サイトカイン，ケモカイン，また抗ウイルス性サイトカイン，サイトカイン誘導遺伝子の発現変化を検討する。

(2)の DNA マイクロアレイの検討から候補となるサイトカイン，ケモカインを対象に PCR 法，ELIZA 法，ウェスタンブロット法を行い遺伝子レベル，蛋白レベルでの発現変化を検討する。

(4)クルクミン処置による生じた RSV 感染 HNECs のタイト結合分子の発現・局在・機能の変化を解析する。

以前のわれわれの検討では，RSV 感染させた HNECs では，タイト結合分子の一部 (claudin-4, occludin) の発現増加・局在変化が認められていた．クルクミン処置によりこの反応に変化が生じるか，ウェスタンブロット法，免疫染色を行った．また上皮バリアの機能解析に関して，Trans epithelial electrical resistance: TER で検討した (図 2) .

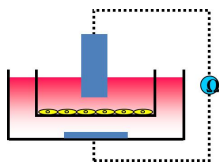


図 2) 上皮バリア

=TER

TER は上皮細胞の電気抵抗を測定し上皮バリア機能を推定する方法

(5)クルクミンのウイルス抑制のメカニズムについて，関連するシグナル分子の解析を行う。

RSV 感染により，NF- κ B 以外にウイルス複製阻害作用を有する翻訳開始因子 2 (eIF2) の活性化が生じることが知られるが，クルクミンはこの eIF2 を含む eIFs を調整する効果もある．そのほか proteasome 阻害作用，を有しており，これらがウイルス複製抑制効果に関連しているか否か，各種阻害剤を用いて検討した．

4. 研究成果

(1)クルクミン処置により RSV 感染細胞における遺伝子発現の変化をきたす。

クルクミン 5 μ g/ml 処置することで，RSV 感染 HNECs の反応性の変化を遺伝子レベルで網羅的に解析した．結果，2 倍以上の変化を認めたものは，タイト結合分子では Claudin-1, -4, -12, occludin, cingulin で発現亢進を，MAGI-1 で発現抑制を認めた．また RIG-I, MDA5, IL-28A, IL-23A, IL-11, COX1, COX2, COX3 で発現抑制を認めた (表 1) .

Gene name	ID	Gene Bank ID	Fold-change control vs RSV感染群	RSV感染群 vs RSV感染+クルクミン処置
CLDN1	H200001413	NM_021101	>2	>2
CLDN3	opHsv0400000648	NM_001306	>4	>2
CLDN4	H300004950	NM_01305	>2	>2
CLDN9	H200009827	NM_020982	>4	>4
CLDN12	H200026459	NM_012129		<4
OCLDN	opHsv0400004868	NM_002538		
CGN (Cingulin)	H300009163	NM_004742		
BAIAP1 (MAGI-1)	H300019020			
DDX58 (RIG-I)	H200013521	NM_014314	>8	<8
IFIH1 (MDAS)	H200009565	NM_0022168	>4	<2
IL-28A	pHsv0400006650	NM_172138;	>2	<2
IL-23A	H200010868	NM_172138	>8	<2
IL-11	H200000450	NM_016584	>2	<4
COX1	opHsv0400005827	NM_496332	>2	<4
COX2	opHsv0400005844		>2	<4
COX3	opHsv0400005879			<4

表 1

(2)クルクミン処置により，RSV 複製・出芽が抑制されると同時に，炎症性サイトカインの産生も抑制される。

クルクミンを 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml と処置していくと，濃度依存的に RSV エンベロップ G 蛋白の発現が遺伝子レベル，蛋白レベルで低下した．さらに免疫染色を行ったところ，G 蛋白，F 蛋白，M2-1 蛋白発現低下を認めた．SEM でもウイルスフィラメントの減少が見られた (図 3) . ウイルスレセプターである nucleolin に影響は認めなかった．

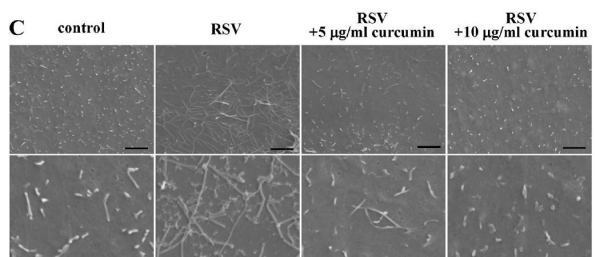
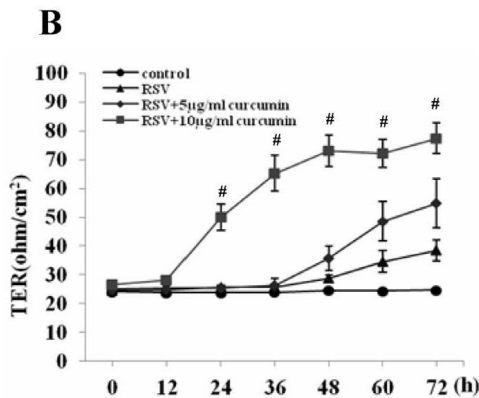
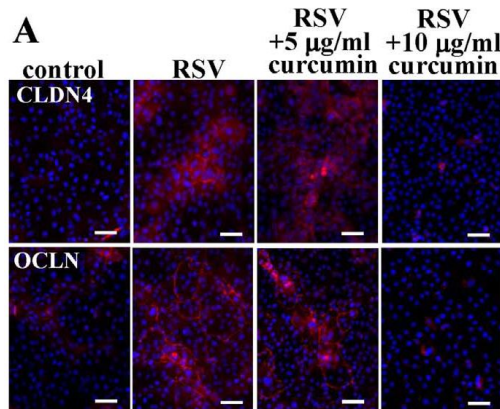


図 3) SEM にてクルクミン処置によりウイルスフィラメントの発現抑制を認める．上段 - 3 μ m, 下段 - 0.5 μ m

同様に, RSV 感染で発現上昇する炎症性サイトカイン TNF- α , ケモカイン RANTES は, 処置したクルクミン濃度依存的に産生抑制が確認された.

(3) RSV 感染により細胞膜表面に claudin-4, occludin はリクルートされるが, クルクミン処置によりこの反応は抑制された. HNECs のバリア機能はクルクミン処置により増強した.

われわれの以前の実験では, HNECs において RSV 感染をきたすとタイト結合分子 claudin-4 および occludin が細胞膜表面にリクルートされる現象が確認された. 各タイト結合蛋白に対する免疫染色を施行したところ, クルクミン 10 μ g/ml を処置するとこの反応は有意に抑制された (図 4A). また上皮バリア機能は, TER によりクルクミン処置で増強することが確認された (図 4B).



(4) クルクミン処置により RSV 感染により活性化する NF- κ B の抑制が生じるだけでなく, 小胞体レベルにおいてウイルス蛋白翻訳を調整する翻訳開始因子 eIF2 の活性化も抑制された.

過去の報告より, RSV 感染 HNECs におけるクルクミンの eIF2 脱リン酸化抑制効果について検討した. ウェスタンブロット法の結果, クルクミン 10 μ g/ml の濃度による処置で, eIF2 の脱リン酸化が抑制されていた. またウイルス感染防御に働く PKR の発現増加もクルクミン処置により誘導された (図 5).

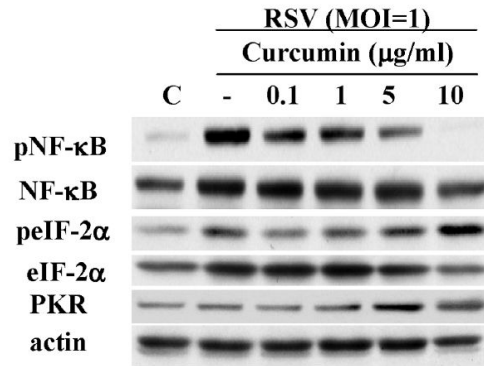


図 5

(5) eIF2 α の脱リン酸化抑制・proteasome 抑制により, RSV 複製および炎症性サイトカイン・ケモカイン産生抑制が生じる.

クルクミンには, 前述のごとく NF- κ B 抑制効果以外に eIF2 脱リン酸化効果, proteasome (蛋白質分解酵素, NF- κ B の核内に関連する) 抑制効果など複数の分子に対する multi-function を有している. これらがクルクミンのもつ抗ウイルス効果であり, RSV 感染におけるウイルス複製・炎症反応の抑制を示す要因と仮説をたて検討した. eIF2 脱リン酸化害剤である Salubrinal, および proteasome 阻害剤である MG123 を用いて, RSV 感染における反応性の変化を検討した. 結果, ウェスタンブロット法にて Salubrinal 10 μ g/ml 処置により G 蛋白および M2-1 蛋白の発現抑制が認められたが, claudin-4, occludin, PKR には影響を与えなかった. また MG123 1 μ g/ml 処置で G 蛋白, M2-1 蛋白発現抑制を, 10 μ g/ml 処置で claudin-4, occludin, NF- κ B 脱リン酸化の抑制がみられた. また ELISA 法により, Salubrinal 10 μ g/ml 処置および MG123 1 μ g/ml 処置により, RSV 感染で産生亢進した TNF- α , RANTES の発現抑制を有意に認めた (data not shown).

(6) 考察

RSV は宿主細胞に侵入すると, ウイルス蛋白である M2-1 蛋白により転写因子である NF- κ B が活性化, NF- κ B の核内移行によってさまざまな炎症性サイトカイン・ケモカイン産生を亢進し宿主の炎症反応を惹起する. さらにヒト気道上皮である HNECs への感染では, タイト結合分子である claudin-4, occludin の膜表面への局在変化・上皮極性の変化が生じウイルス出芽に関連するものと考えられたが, これも NF- κ B シグナル経路が中心的な役割を担っていた. このように, RSV 感染に対する治療法開発のターゲットとして NF- κ B シグナル分子が候補に挙げられた. また感染細胞より産生されたインターフェロンが PKR を活性化, それにより eIF2 のリン酸化が生じウイルスの翻訳抑制, 蛋白合成障害がおこりウイルス複製が抑制さ

れることから, eIF2 調節もキーの一つと考えた。

本研究で用いたクルクミンは, 抗炎症効果, アンチエイジング効果, 抗腫瘍効果などの薬理作用を持つ, 近年注目されている天然由来成分である。クルクミンは NF- κ B 抑制作用以外に, 複数のシグナル分子を抑制する結果, 抗炎症に働くとされる。これら既知の知見から, クルクミンのもつ NF- κ B 阻害効果, 翻訳調節因子 eIF2 への効果, proteasome 阻害効果により抗 RSV 作用を持つと仮説を立て, 気道上皮である HNECs を用いて検討した。

上述の結果のように, クルクミン投与により NF- κ B 抑制効果を発揮し, 感染に伴い産生される TNF や RANTES などの炎症性サイトカイン・ケモカインの抑制を引き起こすと同時に, 上皮バリアの機能上昇も生じウイルス感染防御・炎症反応抑制に働いたと考えられた。さらに PKR の活性化を介した eIF2 のリン酸化によるウイルス蛋白の翻訳抑制効果のため, ウイルス複製阻害が生じた。また, proteasome 抑制効果によりリン酸化 I κ B 分解を阻害, これに伴い NF- κ B の核内移行を阻止していることも推察された。これらの複数の作用により, 抗ウイルス作用, 抗炎症作用を発揮するものと考えられた。

クルクミンは自然界に存在し既に広く応用された, 副作用の少ない成分である。本研究結果と併せて考慮すると, 乳幼児に好発する RSV に対し, 新規治療法としてクルクミンの鼻粘膜に対する局所投与の可能性が示された。さらに RSV 感染の最初の標的となる上気道-鼻粘膜においてウイルス複製を阻害できれば, 病状の重症化・下気道への進展を防ぐことができるかもしれない。治療効果だけでなく, 安全性や疾病予防の観点から, 今後クルクミンを含め, 薬理作用を持つ食品成分のさらなる研究が期待される。

引用文献

- Masaki T, Kojima T, Okabayashi T, et al. A nuclear factor- κ B signaling pathway via protein kinase C δ regulates replication of respiratory syncytial virus in polarized normal human nasal epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2011 22(13): 2144-56
- Takano K, Kojima T, Go M, et al. HLA-DR- and CD11c-positive dendritic cells penetrate beyond well-developed epithelial tight junctions in human nasal mucosa of allergic rhinitis. *J Histochem Cytochem*. 2005 53:611-619
- Guttman JA, Finlay BB. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta* 2009 1788: 832-841
- Chen L, Tian G, Shao C, et al. Curcumin modulates eukaryotic initiation factors in human lung adenocarcinoma epithelial cells. *Mol Biol Rep*. 2010 37: 3105-3110
- Remers K, Buchholz K, Werchan H.

Respiratory syncytial virus M2-1 protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *Virology* 2005 331: 260-268 2010

Unterholzner L, Bowie AG. The interplay between viruses and innate immune signaling: recent insights and therapeutic opportunities. *Biochem Pharmacol*. 2008 75: 589-602

Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J Biol Chem* 1995 270: 24995-25000

Pulmmer SM, Holloway KA, Manson MM, et al. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF- κ B activation via the NIK/IKK signaling complex. *Oncogene* 1999 18: 6013-6020

Milacic V, Banerjee S, Landis-Piowar KR, et al. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2008 68: 7283-7292

Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets* 2011 12: 332-347

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Okuni T, Nomura K, Miyata R, Kakuki T, Ogasawara N, Kondo A, Kurose M, Himi T. Tricellular junctions in human nasal mucosa. ERS/ISIAN 2014. 平成 26 年 6 月 22 日 ~ 26 日 Amsterdam (Netherlands)

〔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：
出願年月日：

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

大國 毅 (Okuni, Tsuyoshi)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：40464490

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：