

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462861

研究課題名(和文) 唾液ヒスタチンによるインフルエンザウイルス感染とその誘導性炎症の抑制機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of inhibitory mechanisms by salivary histatin in influenza viral infection and its induced inflammation

研究代表者

今村 泰弘 (Imamura, Yasuhiro)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00339136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液蛋白質ヒスタチンは抗菌作用があり、病原体から生体を守っている。唾液には抗ウイルス作用があるが、その詳細な唾液成分は明らかにされていない。ヒスタチンは生体防御に関わる自然免疫関連因子であるため、抗インフルエンザウイルス作用を持つ可能性がある。本研究では、ヒスタチンがインフルエンザウイルス構成成分を阻害する唾液蛋白質であることが判明した。また、ヒスタチンはインフルエンザウイルスやグラム陽性菌の構成成分と相互作用し、それら構成成分による炎症誘発を抑制することが明らかとなった。これらは、唾液蛋白質の新たな生理的機能を見出した結果であり、将来的な抗ウイルス・抗炎症薬の開発に結び付く内容である。

研究成果の概要(英文)：Salivary protein histatins have antimicrobial properties and protect living organism from pathogens. Although there are antiviral actions in saliva, the detailed salivary components are not clarified. Because histatins are innate immune-related factors involved in biophylaxis, histatins are likely to have anti-influenza viral actions. In this study, histatin has turned out to be a salivary protein that inhibits the influenza viral constituent. It has also become apparent that histatin associates with another influenza viral constituent and a gram-positive bacterial one and inhibits them. These are the results of finding the new physiological function of salivary protein. These results are also connected with the future development of antiviral and anti-inflammatory agents.

研究分野：分子生物学・生化学・免疫学

キーワード：唾液蛋白質 ヒスタチン

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病原菌の刺激は、歯周組織・細胞間の複雑な相互作用により慢性の炎症症状を惹起する。これにより、硬・軟組織の破壊が誘導され、持続する。歯周病は心臓血管疾患、糖尿病などの全身疾患と密接に関与することが明らかにされている。以前に我々は、歯周組織の主な構成細胞であるヒト歯肉線維芽細胞(HGFs)を歯周病原菌由来のリポポリサッカライド(LPS)で刺激することにより、炎症性サイトカインの産生が亢進することを示唆した。

唾液の分泌は一日当たり1~1.5ℓ認められ、口腔内の恒常性維持や浄化・嚥下・咀嚼など関係している。また、唾液中の様々な成分は、歯周病、う蝕、ウイルス感染、口腔乾燥症、カンジダ症、がんなどといった口腔疾患の発症と進行に深く関わっている。特に、唾液蛋白質ヒスタチンは、唾液中に特異的且つ比較的多く存在し(唾液蛋白質の約10%)、歯周病原菌 *P. gingivalis* やカンジダ菌などに対する抗菌作用やう蝕原因菌増殖抑制作用がある。また、HIV感染者では唾液中のヒスタチン量が顕著に減少し、カンジダ症などの様々な日和見感染症を発症することが示唆されている。我々は以前に、ヒスタチンが歯周病原菌由来プロテアーゼを阻害することについて示した。また、これまで不明であった唾液腺におけるヒスタチン遺伝子の特異的発現について、ヒスタチン遺伝子プロモーターの転写制御を解析することにより明らかにした(Imamura, Y. *et al.* J. Biochem., 145, 279-288, 2009)。これは、ヒスタチン量減少に伴う疾患に対して、ヒスタチン遺伝子を用いた遺伝子治療への応用が可能な成果である。更に、ヒスタチンは宿主細胞の熱ショック蛋白質 HSC70 と結合し、HGFs の増殖・生存を促進すること、HSC70 の Toll 様受容体(TLR) を介した炎症性サイトカイン産生を抑制することについて明らかにした(Imamura, Y. *et al.*, J. Biol. Chem., 284, 14316-14325, 2009、Imamura, Y. *et al.*, J. Inflamm.-Lond., 11, 4, 2014)。以上の知見は、ヒスタチンの唾液特異的な存在意義やその生理機能の一端を知る結果である。しかし、ヒスタチンの未知なる機能解明、特に、新たな自然免疫機能や宿主に及ぼす影響については、まだ明らかにされていないことが多く、重要な課題である。

### 2. 研究の目的

パンデミックなインフルエンザ感染症は、高齢者の肺炎、幼児の脳症を引起し、致命的である。インフルエンザウイルスは口・鼻腔から進入し、主に咽頭から気道・肺で感染が認められる。その感染成立には、宿主・口腔細菌由来セリンプロテアーゼによるウイルス表面蛋白質ヘマグルチニンの限定分解が必要である。また、ウイルスの増殖は、宿主細胞内で複製されたウイルスを細胞から遊

離させるノイラミニダーゼが必要となる。口腔内にはノイラミニダーゼ産生菌が存在し、ウイルスの遊離に関与することが示唆されている。しかし、口腔内で重篤なウイルス感染・増殖が殆ど認められていない。これは、口腔内自然免疫機構、特に唾液成分の抗ウイルス作用によるものと考えられる。我々は以前に、唾液蛋白質 MPI (mucus protease inhibitor) によるヘマグルチニンの限定分解阻害に伴う抗インフルエンザウイルス作用を明らかにした(J. Biochem. 121, 309-316, 1997)。一方、ヒスタチンは唾液中に比較的多く存在し、異物に対する生体防御と恒常性維持に関与する自然免疫関連因子であることから、ヒスタチンはインフルエンザウイルスの機能に対して何かしら影響を与えている可能性が考えられる。

本研究の目的は、ヒスタチンによる抗インフルエンザウイルス作用、宿主の異物であるインフルエンザウイルス構成成分やグラム陽性菌由来ペプチドグリカンの刺激誘導性炎症への影響を中心に解明することである。これらにより、抗ウイルス・抗炎症薬開発に繋がるヒスタチンの基礎的知見取得と更なる唾液蛋白質の機能解明を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究課題の主な成果における研究方法は以下である。

#### (1) ヒスタチン3によるインフルエンザウイルスノイラミニダーゼの活性阻害

インフルエンザウイルス A(H1N1)ノイラミニダーゼ(0.5 U/L)とザナミビル(0.1 nM)、コントロールペプチド((Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>: 0.3, 3, 30 μM)、ヒスタチン3(0.3, 3, 30 μM)をそれぞれ混合し、氷中で10分間放置した。その後、EnzyChrom Neuraminidase Assay Kit (BioAssay systems 社製)により、ノイラミニダーゼの活性を測定した。

#### (2) ヒスタチン3によるインフルエンザウイルスヘマグルチニン誘導性炎症の抑制

インフルエンザウイルスヘマグルチニンによるTLR活性化に及ぼすヒスタチン3の影響(ルシフェラーゼアッセイ)

NF-κB結合配列にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミド(0.5 μg)とβ-ガラクトシダーゼ発現ベクター(内部標準: 0.05 μg)を293-TLR2/CD14細胞(TLR2とCD14を恒常的に発現しているHEK293細胞: 3 × 10<sup>5</sup>)に導入した。1日後、インフルエンザA(H1N1)ウイルスヘマグルチニン(0.5 μg/ml)と上記コントロールペプチド(3, 30 μM)或いはヒスタチン3(3, 30 μM)をそれぞれ混合し、細胞に添加した。6時間後に細胞を回収して溶解後、細胞抽出液を調製した。この抽出液を用い、ルシフェラーゼ及びβ-ガラクトシダ

ーゼの活性を測定し、相対的な NF- $\kappa$ B の転写活性を算出した。

ヒスタチン 3 とインフルエンザウイルスヘマグルチニンの相互作用解析 (免疫沈降法)  
FLAG タグとヘマグルチニンとの融合蛋白質 (FLAG-HA) 発現ベクターと ECFP とヒスタチン 3 との融合蛋白質 (ECFP-Histatin 3) 発現ベクターを HEK293 細胞に導入した。2 日後に細胞を回収して溶解後、細胞抽出液を調製した。この抽出液と抗 GFP 抗体或いは抗 FLAG 抗体を混合し、免疫沈降した。沈降物を SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、上記抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて解析した。

(3) ペプチドグリカンによる炎症性サイトカイン産生に及ぼすヒスタチン 3 の影響 (酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法))

*S. aureus* 由来ペプチドグリカン (1  $\mu$ g/ml) に上記コントロールペプチド (5, 50  $\mu$ M) 或いはヒスタチン 3 (5, 50  $\mu$ M) をそれぞれ混合し、氷中で 30 分間放置した。これらを HGFs ( $1 \times 10^4$ ) に添加し、1 日培養した。培地を回収後、培地中の IL-6 産生量を CytoSet kit (BioSource 社製) の方法に従い測定した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒスタチン 3 によるインフルエンザウイルスノイラミニダーゼの活性阻害

インフルエンザウイルスは宿主細胞に感染後、新たなウイルスが複製され、感染細胞から出芽して遊離する。この時、インフルエンザウイルスの膜表面に存在するノイラミニダーゼを必要とする。

ヒスタチン 3 存在下におけるノイラミニダーゼの活性を測定した (図 1)。ヒスタチン 3 は量依存的にノイラミニダーゼの活性を阻害した。また、抗インフルエンザウイルス薬 (ノイラミニダーゼ阻害薬) であるザナミビル (0.1 nM) 存在下ではノイラミニダーゼの活性が約 25% まで低下した。一方、コントロールペプチドでは、ノイラミニダーゼの活性を阻害しなかった。これらの結果から、ヒスタチン 3 はインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼを阻害することが判明し、唾液蛋白質であるヒスタチン 3 が抗インフルエンザウイルス作用を持つ生理活性物質であることが示唆された。

(2) ヒスタチン 3 によるインフルエンザウイルスヘマグルチニン誘導性炎症の抑制

ヘマグルチニンによる TLR 活性化に及ぼすヒスタチン 3 の影響

これまでに我々は、蛋白質性のリガンド (HSC70) が TLR を活性化すること、また、これをヒスタチン 3 が抑制することを示唆した。インフルエンザウイルスヘマグルチニン

はウイルス感染成立において極めて重要な蛋白質である。以前に、麻疹ウイルスのヘマグルチニンは TLR2 のリガンドとなることが報告された (Bieback, K. *et al.*, J. Virol. 76, 8729-8736, 2002)。そこで、インフルエンザウイルスヘマグルチニンは TLR2 のリガンドとなるのかどうか検討した。NF- $\kappa$ B 結合配列連結ルシフェラーゼ遺伝子を 293-TLR2/CD14 細胞に導入し、ヘマグルチニンで刺激したところ、量依存的に NF- $\kappa$ B は活性化された (データ不掲載)。また、上記実験系において、ヘマグルチニン刺激時にヒスタチン 3 が存在すると量依存的に NF- $\kappa$ B の活性化は抑制されることが判明した (図 2)。以上の結果から、ヒスタチン 3 はインフルエンザウイルスヘマグルチニンによる TLR2 を介した NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することが明らかとなった。このことは、ヒスタチン 3 が NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現を抑制する自然免疫関連因子であることを示唆する。

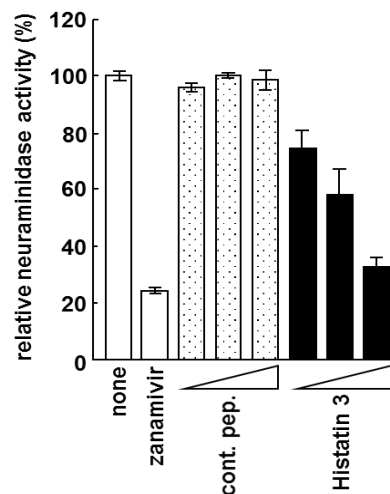


図 1 ヒスタチン 3 によるインフルエンザ A (H1N1) ウイルスノイラミニダーゼの活性阻害

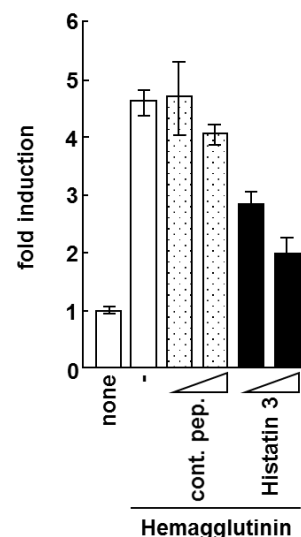


図 2 インフルエンザ A (H1N1) ウイルスヘマグルチニンによる TLR2 活性化に及ぼすヒスタチン 3 の影響

ヒスタチン3とインフルエンザウイルスヘマグルチニンの相互作用解析

ヒスタチン3はヘマグルチニンによるTLR2活性化を抑制することから、ヒスタチン3とヘマグルチニンが直接相互作用する可能性がある。そこで、このことを調べるために、免疫沈降法により解析した。FLAG-HAとECFP-Histatin 3発現ベクターをHEK293細胞に導入し、2日後に細胞を回収して細胞抽出液を調製した。これを用い、抗GFP抗体(図3A)或いは抗FLAG抗体(図3B)で免疫沈降した。その後、抗FLAG抗体或いは抗GFP抗体でウェスタンブロッティングを行った。その結果、ヒスタチン3とヘマグルチニンは相互作用することが明らかとなった。

ヘマグルチニンは宿主由来のセリンプロテアーゼにより限定分解されてHA1とHA2になり、宿主細胞へのウイルス感染が成立する。そこで、ヒスタチン3とHA1或いはHA2との相互作用を解析したところ、ヒスタチン3はHA1と結合することが明らかとなった(データ不掲載)。これらのことから、ヒス

タチン3はヘマグルチニンと結合し、ヘマグルチニンの機能に影響を与えることが示唆される。実際、ヒスタチン3はヘマグルチニンによるTLR2を介したNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制したことから伺える(図2)。

(3) ペプチドグリカンによる炎症性サイトカイン産生に及ぼすヒスタチン3の影響

グラム陽性菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンはTLR2のリガンドであり、TLR2を介してNF- $\kappa$ Bを活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導する。ヒスタチン3はTLR2に対するペプチドグリカンのリガンド効果に影響を及ぼすのかどうか調べた。293-TLR2/CD14細胞にNF- $\kappa$ B結合配列連結ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ヒスタチン3存在下で*S. aureus*のペプチドグリカンで刺激した。細胞抽出液を調製後、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ヒスタチン3はペプチドグリカンのTLR2活性化(NF- $\kappa$ B活性化)を抑制することが明らかとなった(データ不掲載)。また、ヒスタチン3存在下でHGFsをペプチドグリカンにて刺激した場合、ERKのリン酸化(活性化)はヒスタチンの量依存的に抑制されることが明らかとなった(データ不掲載)。更に、ヒスタチン3存在下でHGFsをペプチドグリカンにて刺激し、産生された培地中のIL-6量をELISA法により解析した(図4)。その結果、ペプチドグリカンによるIL-6の産生はヒスタチン3の量依存的に抑制された。一方、コントロールペプチドでは認められなかった。同様の結果は、IL-8産生に関しても認められている。以上から、ヒスタチン3はペプチドグリカンのTLR2を介したNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制し、結果として炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。従って、ヒスタチン3はグラ

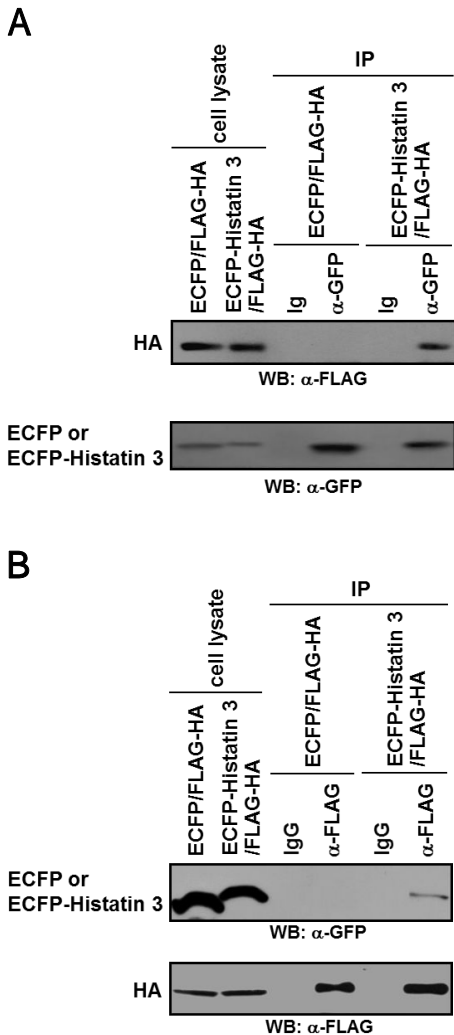


図3 ヒスタチン3とインフルエンザA(H1N1)ウイルスヘマグルチニンとの相互作用  
A) ヒスタチン3に結合するヘマグルチニン(HA)  
B) ヘマグルチニンに結合するヒスタチン3

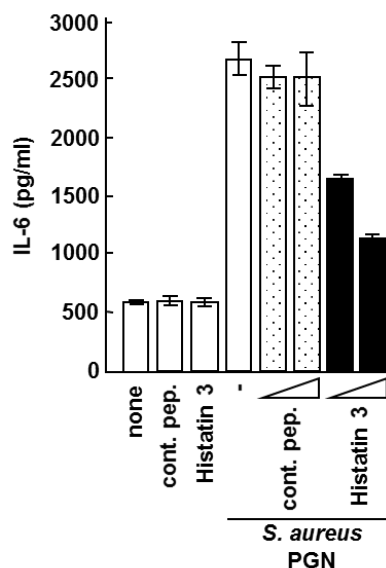


図4 HGFsにおけるペプチドグリカン(PGN)の炎症性サイトカイン産生に及ぼすヒスタチン3の影響

ム陽性菌由来ペプチドグリカンで誘導される炎症に対し、抗炎症作用を有する生理活性物質であることが提唱される。

上記をまとめると、ヒスタチン3はインフルエンザウイルスヘマグルチニンと結合し、TLR2に対するヘマグルチニンのリガンド効果を抑制する。また、インフルエンザウイルスノイラミダーゼを阻害する唾液蛋白質であることが判明した。ヘマグルチニンはインフルエンザウイルスの宿主細胞への感染時に、また、ノイラミダーゼは新たに生成したウイルスの感染細胞からの遊離時に必要となる蛋白質である。ヒスタチン3はこれらタンパク質の機能に直接影響を及ぼす可能性があるため、インフルエンザウイルスの感染に対するヒスタチン3の効果を解析した。その結果、レベルは非常に低いものの、ヒスタチン3によるウイルス感染の抑制傾向が認められた(データ不掲載)。これまで、ある種の唾液成分には抗ウイルス作用があるとされており、ヒスタチン3は少なくともその中の1つであることが示唆される。また、口腔内で重篤なインフルエンザウイルス感染・増殖が認められないのは、少なくともヒスタチン3による影響があるものと考えられる。

インフルエンザウイルス感染・増殖に伴い、また、グラム陽性菌由来ペプチドグリカンの刺激により、宿主細胞の複雑且つ過剰な免疫システムにより炎症が誘発され、持続する。本研究では、ヘマグルチニンやペプチドグリカンによる炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8)産生をヒスタチン3が抑制することを明らかにした。この機序は、ヒスタチン3がヘマグルチニンやペプチドグリカンに直接結合することで、これら刺激物(リガンド)によるTLR2を介したシグナル伝達を抑制するものである。ヒスタチン3は刺激物の機能を初期の段階で抑制することから、慢性的な炎症誘発を軽減(抗炎症作用)することが可能な生理活性物質であると提唱される。これらから、ヒスタチンには抗炎症薬開発への可能性が秘められており、将来的な課題となる。

以上の結果は、これまで明らかにされていない唾液蛋白質の宿主に与える生理的機能及び意義を解明し始めた成果である。また、新しい着眼点に基づき、世界に先駆けて行われた研究成果である。今後、更に唾液蛋白質の新規生理的機能の解明を目指し、将来的な薬剤開発を視野に入れた研究が必要とされる。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

今村泰弘, 唾液ヒスタチンとペプチドグリカンの結合による Toll 様受容体 2 シグナルへの影響, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会

ならびに総会, 2016 年 8 月 26 日, 北海道札幌市 札幌コンベンションセンター

今村泰弘, 唾液ヒスタチンによるペプチドグリカンの Toll 様受容体 2 シグナル抑制, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2015 年 9 月 13 日, 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

今村泰弘, 唾液蛋白質ヒスタチンによる細胞増殖とユビキチン化促進作用, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2014 年 9 月 27 日, 福岡県福岡市 福岡国際会議場

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

今村 泰弘 (IMAMURA, Yasuhiro)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 00339136

### (2)研究分担者

雪田 聡 (YUKITA, Akira)  
静岡大学・教育学部・准教授  
研究者番号: 80401214

安藤 宏 (ANDO, Hiroshi)  
松本歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 30312094

増田 裕次 (MASUDA, Yuji)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授  
研究者番号: 20190366

### (3)連携研究者

王 宝禮 (WANG, Pao-Li)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 20213613