

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659750

研究課題名(和文) Ⅲ型インターフェロン遺伝子多型解析を用いた上気道疾患制御戦略個別化の試み

研究課題名(英文) Therapeutic approach using analysis of type III IFN SNPs in upper respiratory disease

研究代表者

氷見 徹夫 (Himi, Tetsuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90181114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：RSVの鼻粘膜上皮で感染作用機序について検討した。RSVの鼻粘膜上皮への感染様式は上皮細胞の頂部に付着し細胞内へ侵入する。続いて、鼻粘膜上皮細胞内で複製され、再び細胞頂部に移動し鼻腔方向へ出芽した。また、鼻粘膜での抗ウイルス作用の主体はⅢ型IFNである。従来のⅢ型IFNの誘導は少なかった。NF- $\kappa$ B経路はRSV複製と関係があり、この抑制作用を持つクルクミン、フムロンにつき検討した。鼻粘膜上皮細胞を用いた検討では、クルクミンの処置によりRSV複製、炎症性物質の抑制が認められた。フムロンのRSVの増殖抑制効果も確認した。副作用の少ない生理活性物質もRSV感染を抑制作用を持つことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of respiratory disease. The human nasal epithelium is the first line of defense during respiratory virus infection. RSV could infect these cells from apical but not basolateral side, and enhanced the expression of tight junction proteins. RSV infection induces polarity in the infected cells, thereby spreading the infection. As an innate immune response against diverse viral infections, a host induces two types of IFN, type-I and type-III. Type -III, but not type-I, contributes to the main first line defense against respiratory virus infection in nasal mucosa. Curcumin and Humulon can prevent the replication of RSV and the epithelial responses to it. Moreover, Clarithromycin also suppressed RSV-induced PAF receptor expression and adhesion of fluorescein-labeled *S. pneumoniae* cells to A549 cells. These are useful biological products for the prevention and therapy for RSV infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，耳鼻咽喉科学

キーワード：インターフェロン 遺伝子多型 鼻粘膜 上皮細胞 ウイルス受容体

### 1. 研究開始当初の背景

近年インターフェロン(IFN)の一部が新たな機序を持つ免疫調節の分子であることが分かってきた。抗ウイルス作用の主体である型IFN(IFN $\gamma$ )、免疫調節作用を持つ型IFN(IFN $\alpha$ )のほかに、新たに型IFN(IFNラムダ $\lambda$ )ファミリー、IL-28A, IL-28B, IL-29)が発見された。IFNの発現はウイルス感染などにより誘導され、抗ウイルス活性、MHCクラスII抗原提示の制御などの生理活性を有する。日本人のIFN $\lambda$ 遺伝子変異が他の人種と大きく異なることが報告された。

抗ウイルス作用を持つ自然免疫に關与する物質の解析にはウイルス抑制を評価できるシステムが必要である。そのため、まず、ヒトの細胞を用いたシステム構築を優先的に始めることとした。また、実際にインターフェロンと同様な抗ウイルス作用を持つ物質の同定も並行して行う必要がある。このような抗ウイルス作用を持つ免疫抑制物質と実際のウイルス感染との研究は社会的に重要な課題である。

### 2. 研究の目的

ウイルス性上気道炎症での鼻粘膜の役割を明らかにするためには、まず、ウイルス感染で起こる鼻粘膜上皮細胞の反応について理解する必要である。その中でも、ウイルスの種特異性と細胞指向性の理解と宿主免疫応答のうち、自然免疫応答と抗ウイルス反応の鼻粘膜での特徴を理解することが重要である。われわれは正常なヒト鼻粘膜上皮細胞を用いたウイルス感染系を確立して、鼻粘膜上皮に特徴的なウイルスへの免疫応答を模索した。また、上皮細胞へのウイルスの侵入・複製・出芽のメカニズムを明らかにすることで感染様式が解明され、抗ウイルス応答の詳細について検討することで鼻粘膜上皮のウイルスに対するインターフェロンを含めた抗ウイルス初期応答が解明できる。気道粘膜でのウイルス感染の詳細を明らかにし、さらに、鼻粘膜上皮の炎症の場としての特徴を利用した新しい治療戦略を提言することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 鼻粘膜上皮へのウイルス感染系の確立とTLRを介した反応

RSV感染細胞:HEP2の上清(500 $\mu$ l)を、鼻粘膜上皮細胞にかけて1時間で感染させる。その後、通常培地で2回洗い感染細胞として使用した。ヒト鼻粘膜初代培養細胞にhTERT(テロメラーゼ逆転写酵素)レトロウイルス産生細胞の上清をかけ感染させ、hTERT導入鼻粘膜上皮細胞を作成した。この延命化したhTERT導入ヒト鼻粘膜上皮細胞を使用し、これにウイルス感染しているHEP2細胞の上清をかけた上で上記の条件でRSVを感染させた。

これらを用いて、RSVのエンベロープタン

パクであるGタンパク・Fタンパクの発現を、RT-PCR、ウエスタンブロット法、免疫染色で確認した。さらに、炎症性サイトカインであるIL-8やTNF $\alpha$ の発現もELISA法で確認した。

#### (2) ウイルスの上皮細胞指向性、侵入、出芽の解析

頂端側と基底側のそれぞれからRSV感染を行うため、二重構造を持つディッシュを用いて2方向からの感染実験を行った。

RSVのGタンパク、Fタンパク、免疫染色、ウエスタンブロット法、電子顕微鏡の解析を用いて検討した。免疫染色では3次元解析も行った。

#### (3) RSV感染ヒト鼻粘膜上皮細胞でのインターフェロン産生解析

RSV(Long株,A2株)をMOI1で感染させ、ウイルス増殖性はHep2細胞を指標細胞としたプラーク形成法で、IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)産生はELISAで、IFN誘導遺伝子(ISG)の発現はRT-PCRおよびウエスタンブロット法で解析した。

#### (4) RSV感染鼻粘膜上皮細胞に対する感染抑制効果を持つ物質の同定

手術によって得られた下甲介鼻粘膜上皮細胞にhTERT(human catalytic subunit of telomerase reverse transcriptase)を導入することで延命化したヒト正常鼻粘膜上皮細胞(human nasal epithelial cells: HNECs)を培養した。培養した正常鼻粘膜上皮細胞にRSVを感染させ、クルクミンを投与したときのタンパク発現をwestern blot法、免疫染色で、遺伝子発現をRT-PCR法で調べた。また、タイト結合のバリア機能についてTERを用いて評価し、走査型顕微鏡を用いてウイルスフィラメントや出芽の様子を確認した。炎症物質の発現の変化についてはELISA法で調べた。ホップの成分のフムロンについても検討した。

#### (5) RSV感染により誘発される鼻粘膜上皮への細菌付着抑制物質の同定

肺炎球菌の気道上皮細胞への付着の解析。肺炎球菌をFITC標識し、上皮細胞にRSV感染後48時間後にFITC標識肺炎球菌の接着アッセイを行い、蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリー(FACS)にて観察した。PAF受容体の細胞表面での発現はマウス抗PAF受容体モノクローナル抗体および蛍光標識抗体で染色し、FACSで解析した。また、mRNAレベルを半定量的RT-PCR法を用いて測定した。

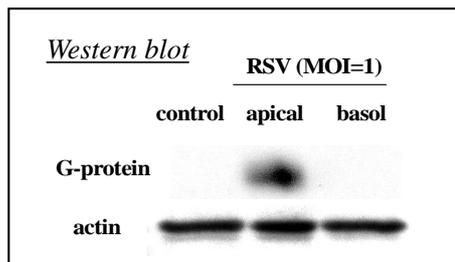
### 4. 研究成果

#### (1) 鼻粘膜上皮へのウイルス感染系の確立とTLRを介した反応

ヒト鼻粘膜上皮細胞には TLR1~10 が発現していることがわかっている。TLR ファミリーの中で、TLR3 はウイルス由来の ds RNA および人工合成物である Poly (I:C) を認識する。ヒト鼻粘膜上皮細胞に対して各 TLR 特異的リガンドを処置したところ、TLR3 リガンド Poly(I:C) 処置したときのみタイト結合分子 JAM-A 発現低下を認め、細胞境界に存在する JAM-A の局在に変化が認められた。さらに、Poly (I:C) 処置すると炎症性サイトカインである IL8・TNF 産生誘導が生じるが、他の TLR リガンドではこの現象は認められなかった。このように、ヒト鼻粘膜上皮ではウイルス感染の炎症惹起、上皮バリア機能の低下の要因として TLR3 を介した作用があると考えられる。

## (2) R S ウイルスの感染様式、細胞間接着装置の変化

RSV の感染がヒト鼻粘膜上皮細胞の頂側膜で起こるか、側基底膜で起こるかを調べるために、細胞を二重のディッシュで培養し RSV に感染させた。ウエスタンブロット法でタンパクの発現を観察すると、RSV/G タンパク質は頂端側からの感染群のみに認められた。免疫染色においても、24 時間後、72 時間後ともに頂端側感染群で RSV/G の発現は側基底側からの感染に比べ強かった。つまり、RSV はヒト鼻粘膜上皮細胞では細胞の頂端側表面から優位に感染すると考えられた(下図)。



さらに免疫染色では、RSV/G、F タンパク質が RSV 感染 8 時間後には核のまわりで観察されたのに対して、経時的な観察を続けると感染 24h 後では、頂端側細胞表面付近に移動するように認められた。これに比較してヌクレオカプシドタンパクは感染 24 時間後では細胞質の中で特に核周囲に分布している。また電子顕微鏡的観察での出芽の状態は頂端面で観察され、さらに、透過型電子顕微鏡でも細胞表面にウイルス特有の粒子と思われるものが観察された。このように、RSV のヒト鼻粘膜上皮細胞での侵入・出芽は細胞頂側からの侵入、そして出芽であることが確認できた。

また、RSV 感染後の鼻粘膜上皮細胞において、タイト結合タンパクの変化を調べるために、ウエスタンブロット法、RT-PCR、リアルタイム PCR と免疫染色を行った。ウエスタンブロット法では、claudin-4 と occludin は、RSV 感染後、時間依存的で増加した(。RT-PCR とリアルタイム PCR で、claudin-4

と occludin の mRNA は RSV 感染後 24h 後から増加したが、UV 不活性 RSV 群とコントロール群で変化なかった。RSV 感染 24h 後の免疫染色では、コントロールと比較して、claudin-4 と occludin は、鼻粘膜上皮細胞の細胞膜上での発現が増加した。

## (3) 鼻粘膜上皮への RV 感染後の IFN 誘導の特徴

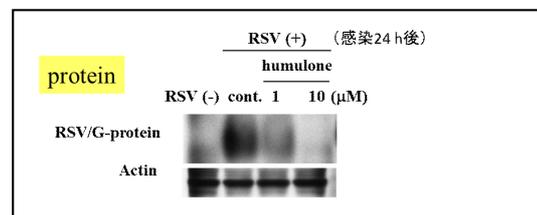
呼吸器ウイルス(RSV、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス)を感染させた鼻粘膜上皮細胞における IFN 系の状態を調べるために、IFN と ISG の mRNA 濃度を RT-PCR で測定した。IFN- $\gamma$  1 と 2/3 の mRNA 発現は呼吸器ウイルス感染で誘導された。一方、驚くことに IFN- $\gamma$  2 は呼吸器ウイルス感染した鼻粘膜上皮ではほとんど誘導されなかった。

## (4) RSV 感染抑制作用を持つ生理活性物質

RSV 感染正常ヒト鼻粘膜細胞において claudin4 や occludin の発現上昇が見られ、バリア機能の上昇が見られた。クルクミンを投与することによって、タイト結合タンパクの発現上昇がタンパク及び mRNA レベルで認められ、TER にてバリア機能が上昇していることも確認された。ウイルスエンベロープタンパクである G タンパクや、転写調節因子である M2-1 タンパクの発現の抑制もタンパクレベルで認められた。

クルクミン投与によるウイルスのタンパク発現抑制とタイト結合タンパクの発現上昇は免疫染色でも同様に確認できた。走査型顕微鏡にてクルクミン投与によりウイルスフィラメントの発現抑制とウイルスの出芽の抑制が認められた。また、RSV 感染正常ヒト鼻粘膜細胞にクルクミンと投与すると NF- $\kappa$ B の活性化が低下し、TNF や RANTES など炎症性物質が低下した。

フムロン；もう一つの活性化物質として、同様に NF- $\kappa$ B の活性抑制作用を持つホップ苦味成分(フムロン)の RSV ウイルス感染によるウイルス抑制効果を検証した。クルクミンと同様に RSV 感染上皮細胞で RSV の増殖抑制効果及び炎症緩和効果を確認した(下図)。



このように、クルクミンやホップのような副作用の少ない生理活性物質も RSV 感染を制御する機能、炎症抑制作用を持つことがわかった。これらの活性物質は乳幼児の RSV 感染症に対し使用可能な候補となる可能性

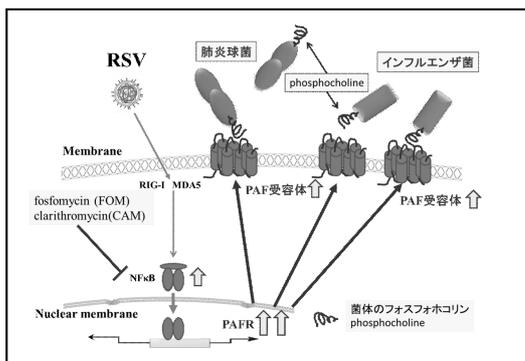
を示している。

(5) RSV 感染により誘発される鼻粘膜上皮への細菌附着抑制物質の同定

RSVで発現増強が認められたPAF受容体は用量依存性にホスホマイシン投与で抑制された。NF- B の阻害薬(PDTC)ではPAF受容体のRSVによる発現亢進はコントロールレベル近くまで低下した。ホスホマイシンのPAF受容体発現亢進の抑制は感染後に投与しても同様の効果が確認できた(RSV感染4 または 12時間後) また、PAF発現亢進はクラリスロマイシンでも抑制されることがわかった。その効果は、ホスホマイシンと同等であった。

このPAF発現抑制効果のメカニズムは以下のように考察できる。まず、我々は気道上皮細胞のRSV感染により誘導される interleukin-8 (IL-8) と regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)などのケモカインはホスホマイシンで抑制されるがウイルスの複製は抑制しなかったことを報告している<sup>10)</sup>。

さらに、RSV感染によるケモカインの誘導とホスホマイシンの抑制効果はNF- B 活性に依存することも報告してきた<sup>10)</sup>。PAF受容体の転写はNF- Bによって調節されており、NF- B 阻害剤は気道上皮細胞株への肺炎球菌附着を抑制する。これゆえ、ホスホマイシンの抑制効果はNF- B 活性の抑制によるものと考えられる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

1. Nomura K, Takano K, Himi T, Kojima T. (10 名, 9, 10 番) Pseudomonas aeruginosa elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir Res*. 2014 Feb 18;15:21. doi: 10.1186/1465-9921-15-21. (査読有)
2. Abe A, Takano K, Seki N, Himi T. (7 名 7 番) The clinical characteristics of patients with IgG4-related disease with infiltration of the labial salivary gland by IgG4-positive cells. *Mod Rheumatol*. 2014 Mar 26. [Epub ahead of print] <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14397595.2014.891964> (査読有)
3. Tabeya T, Seki N, Takano K, Himi T. (12 名 10 番) The role of cytotoxic T cells in

IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis, the so-called Mikulicz's disease. *Mod Rheumatol*. 2014 Mar 4. [Epub ahead of print] <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14397595.2014.882045> (査読有)

4. Obata K, Kojima T, Yokota S, Tsutsumi H, Himi T (全 15 名 2, 14 番) Curcumin prevents replication of RS virus and the epithelial responses to it in human nasal epithelial cells. *PLoS One*. 2013 8(9):e70225. doi: 10.1371/journal.pone.0070225. eCollection 2013. (査読有)

5. Hirakawa S, Kojima T, Yokota SI, Himi T. (全 15 名 5, 9 番) Marked induction of MMP-10 by RS virus infection in human nasal epithelial cells. *J Med Virol*. 2013 85(12):2141-50. doi: 10.1002/jmv.23718. Epub 2013 Sep 5. (査読有)

6. Shirasaki H, Himi T (全 4 名 4 番) Expression and localization of purinergic P2Y(12) receptor in human nasal mucosa. *Allergol Int*. 2013 62(2):239-44. (査読有)

7. Shirasaki H, Himi T (全 6 名 6 番) . Localization and up-regulation of CysLT-2 receptor in human allergic nasal mucosa *Allergol Int*. 2013. 62(2): 223-8. doi: 10.2332/allergolint.12-OA-0490. (査読有)

8. Kojima T, Takano K, Himi T (全 19 名 1, 3, 18 番) . Regulation of tight junctions in upper airway epithelium. *Biomed Res Int*. 2013;2013:947072. doi: 10.1155/2013/947072. (査読有)

9. Fuchimoto J, Kojima T, Yokota SI, Himi T (全 15 名 2, 14 番) Humulone suppresses replication of RS virus and release of IL-8 and RANTES in normal human nasal epithelial cells. *Med Mol Morphol*. 2013 Feb 5. 46(4):203-9. doi: 10.1007/s00795-013-0024-1. (査読有)

10. Shimizu Y, Himi T (全 20 名 15 番) Necessity of early intervention for IgG4-related disease--delayed treatment induces fibrosis progression. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 52(4):679-83. doi: 10.1093/rheumatology/kes358. (査読有)

11. 氷見徹夫: 総論「上気道と上部消化管のアレルギー」:アレルギーの臨床 33(8): 806 2013. (査読なし)

12. 氷見徹夫, 高野賢一, 大國毅, 小笠原徳子, 正木智之, 小幡和史, 堤裕幸, 小島隆, 澤田典均, 横田伸一: ウイルス性上気道炎での免疫応答と鼻粘膜上皮の役割 耳鼻咽喉科展望 56: 162-77, 2013. (査読なし)

13. Fuchimoto J, Kojima T, Himi T (全 12 名 2, 11 番) . Hop water extract inhibits double-stranded RNA-induced thymic stromal lymphopoietin release from human nasal epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy*. 2012 26(6):433-8. doi: 10.2500/ajra.2012.26.3814. (査読有)

14. Shirasaki H, Himi T (全 4 名 34 番) . Localization and upregulation of the nasal histamine H1 receptor in perennial allergic rhinitis. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:951316. doi: 10.1155/2012/951316. Epub 2012 Oct 23. (査読有)

15. Hayashi J, Himi T (全 11 名 10 番) Analysis and results of Ku and XRCC4 expression in hypopharyngeal cancer tissues treated with chemoradiotherapy. *Oncol Lett*. 2012

4(1):151-155. (査読有)

16. Yokota S, Himi T (全 6 名 5 番). Clarithromycin suppresses human respiratory syncytial virus infection-induced Streptococcus pneumoniae adhesion and cytokine production in a pulmonary epithelial cell line. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:528568. doi: 10.1155/2012/528568. Epub 2012 Jun 12. (査読有)

17. Ara S, Himi T (全 14 名 12 番). Sorting nexin 5 of a new diagnostic marker of papillary thyroid carcinoma regulates Caspase-2. *Cancer Sci.* 2012 103(7):1356-62. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02296.x. Epub 2012 Jun 4. (査読有)

18. Himi T, Takano K (全 5 名 1 番), A novel concept of Mikulicz's disease as IgG4-related disease. *Auris Nasus Larynx.* 2012 39(1):9-17. (査読有)

19. Shiga K, Himi T (全 25 名 16 番). Malignant melanoma of the head and neck: a multi-institutional retrospective analysis of cases in northern Japan. *Head Neck.* 2012 34(11):1537-41. doi: 10.1002/hed.21984. Epub 2012 Mar 31. 査読有

20. Nomura K, Kojima T, Himi T (全 7 名 2. 6 番) Regulation of IL-33 and TSLP in human nasal fibroblasts by proinflammatory cytokines. *Laryngoscope.* 2012 122(6):1185-92. doi: 10.1002/lary.23261. Epub 2012 Mar 27. 査読有

21. Kamekura R, Kojima T, Himi T (全 6 名 2, 6 番). The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2012 42(2):218-28. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03867.x. (査読有)

22. Shirasaki H, Himi T (全 3 名 3 番) Anti-leukotriene therapy may be effective for the treatment of salivary eosinophilic inflammation. *Allergol Int.* 2012 61(1):175-6. doi: 10.1155/2011/259867. Epub 2011 Nov 17. (査読有)

23. Yamamoto M, Himi T (全 22 名 16 番) Value of serum gG4 in the diagnosis of IgG4-related disease and in differentiation from rheumatic diseases and other diseases. *Mod Rheumatol.* 2012 22(3):419-25. doi: 10.1007/s10165-011-0532-6. Epub 2011 Sep 28. (査読有)

24. Yamamoto M, Himi T (全 13 名 11 番). Risk of malignancies in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol.* 2012 22(3):414-8. doi: 10.1007/s10165-011-0520-x. Epub 2011 Sep 6. (査読有)

25. Seki N, Himi T (全 5 名 5 番). Spontaneous regression of lung lesions after excision of the submandibular gland in a patient with chronic sclerosing sialadenitis. *Auris Nasus Larynx.* 2012 39(2):212-5. doi: 10.1016/j.anl.2011.01.025. Epub 2011 May 14. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 氷見徹夫：ウイルス性炎症における上気道粘膜の役割。第 1 回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会 総会・学術講演会 ランチョンセミナー 平成 25 年 9 月 6 日 大分市
2. 氷見徹夫：「扁桃・アデノイドはなぜあるのか？鼻はなにをしているのか？-小児の粘膜免疫・粘膜防御最前線」第 8 回日本小児耳鼻咽喉科学会ミートザエキスパ

ート 平成 25 年 6 月 20 日 前橋市

3. 氷見徹夫：宿題報告 上気道炎症における鼻粘膜の役割。第 113 回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会 2012 年 5 月 11 日 新潟

〔図書〕(計 1 件)

氷見徹夫，アイワード，上気道炎症における鼻粘膜の役割，2012 年，1-433 ページ

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

氷見 徹夫 (Himi Tetsuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90181114

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

小島 隆 (Kojima Takashi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30260764

堤 裕幸 (Tsutsumi Hiroyuki)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：80217348