

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19139

研究課題名(和文)フラビウイルス感染におけるBcl-2タンパク質の制御

研究課題名(英文) Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival

研究代表者

岡本 徹 (TORU, OKAMOTO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：80628595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルスといったフラビウイルスの感染におけるBCL2ファミリー蛋白質の制御機構を検討した。フラビウイルスに感染した細胞では、BCL2蛋白質の1つであるMCL1の発現が低下し、感染細胞の生存がBCLXLに依存することを見出した。BCLXL欠損細胞やBCLXL阻害剤を処理した細胞にフラビウイルスを感染させると、速やかに細胞死が誘導され、また、BCLXL欠損マウスは日本脳炎ウイルスの感染に抵抗性を示した。以上の成績から、BCLXLの機能を抑制すると、フラビウイルスに感染した細胞は細胞死を誘導し、ウイルスの増殖を抑制されることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the roles of BCL2 proteins in the induction of apoptosis in cells upon infection with flaviviruses, such as Japanese encephalitis virus, Dengue virus and Zika virus. We showed that survival of the infected cells depends on BCLXL, a pro-survival BCL2 protein due to suppression of the expression of another pro-survival protein, MCL1. Treatment with BCLXL inhibitors, as well as deficient BCLXL gene expression, induced BAX/BAK-dependent apoptosis upon infection with flaviviruses. Furthermore, we examined the roles of BCLXL in the death of JEV-infected cells during in vivo infection. Haploinsufficiency of the BCLXL gene, as well as administration of BH3 mimetic compounds, produced resistance to the lethal challenge of JEV infection and suppressed inflammation. These results suggest that BCLXL plays a crucial role in the survival of cells infected with flaviviruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フラビウイルス アポトーシス BCL2

1. 研究開始当初の背景

フラビウイルスにはデングウイルス、日本脳炎ウイルス、ジカウイルスなど多くのヒトに病気を起こすウイルスが含まれているが、これらに対する効果的な治療薬はない。フラビウイルス感染における細胞死にはこれまでに様々な報告があるが、個体レベルでの重要性を検討した報告はほとんどなく、遺伝子欠損細胞やマウスを用いた研究を検討する必要があると考えた。アポトーシスは様々な細胞死の中でも個体の生存や維持に中心的な役割を果たしている。BCL2 蛋白質ファミリーはアポトーシスを制御する中心的な蛋白質であり、その発現変化は自己免疫性疾患、発癌等、様々な疾患と関連していることが言われている。近年、様々な BCL2 に対する阻害剤が開発され、癌治療の現場で使用されるようになってきている。ウイルス感染における BCL2 の役割に対する検討は古くから報告されているが、培養細胞や癌細胞を用いた報告が多く、さらには BCL2 の過剰発現による影響に関する報告のため、生理的条件下での BCL2 蛋白質ファミリーの関与に関する検討はそれほどなかった。癌細胞では特定の BCL2 の過剰発現が観察されており、それらを標的とすることで癌細胞特異的に細胞死を誘導できると考えられている。もし、特定の BCL2 を標的とすることで、ウイルス感染細胞に特異的に細胞死を誘導できれば、新たな治療戦略としての候補となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、フラビウイルス感染細胞における BCL2 ファミリー蛋白質に注目し、非感染細胞と比較してその生存に与える BCL2 蛋白質発現の変化を検討する。これまでにフラビウイルス感染細胞では、BCL2 蛋白質の 1 つの MCL1 の発現が低下していることを見出している。したがって、BCLX を抑制することにより、ウイルス感染細胞は顕著なアポトーシスを誘導することがわかっている。本研究では、各種 BCL2 蛋白質に対する阻害剤や、遺伝子欠損マウスを用いて、特定の BCL2 阻害におけるフラビウイルス感染の影響を検討する。BCLX を抑制することによるウイルス感染細胞のアポトーシスの亢進が生体内でどのような影響があるのかを検討した。得られた情報を元に、フラビウイルス感染における最適な創薬の標的を提案する。

3. 研究の方法

培養細胞株に日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルスを感染させ、様々な BCL2 阻害剤を加えて培養し、細胞死への影響を検討した。さらに、様々な BH3-only 蛋白質を定常的に発現する細胞株を作製し、これ

ら 3 種のウイルスを感染させ、細胞死への影響を検討した。また、標的として考えられた BCL2 蛋白質に関してゲノム編集技術を用いて欠損細胞を作製し、フラビウイルス感染での影響を検討した。培養細胞株にフラビウイルスを感染させ、BCL2 蛋白質ファミリーの発現量を検討した。また、様々な培養細胞を用いて、フラビウイルス感染における BCL2 蛋白質の発現変化や、BCL2 阻害剤の感受性を評価した。さらに生体レベルでのウイルス感染における BCLX 阻害の影響を検討するために、ゲノム編集技術を用いて BCLX 遺伝子欠損マウスを作製し、フラビウイルス感染への感受性を検討した。マウスに日本脳炎ウイルスを感染させ、感染部位でのウイルス増殖やサイトカインやケモカインの発現上昇を検討した。さらに、ウイルス感染細胞とマクロファージによる貪食機構を検討するため、ウイルス感染細胞とマクロファージを調整し、これらを共培養することによるウイルス増殖への影響やマクロファージによるサイトカイン、ケモカインの発現変化を検討した。さらにマクロファージによる貪食能を検討するため、pH 感受性の色素を用いた貪食の程度をフローサイトメトリーにより検討した。

4. 研究成果

日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルスに代表されるフラビウイルス感染では、BCLX 阻害剤による細胞死が顕著に誘導されることを明らかにした。また BH3-only 蛋白質の中でも BAD を発現した細胞株ではフラビウイルス感染に高い感受性を示した。したがって、フラビウイルス感染細胞では BCLX にその生存が依存していることを見出した。そこで、BCLX と MCL1 の蛋白質発現を検討したところ、フラビウイルス感染細胞では経時的に MCL1 の蛋白質の発現低下が観察された。したがって、フラビウイルスが感染すると、MCL1 の蛋白質量が低下するために、BCLX にその生存が依存していることを明らかにした (図 1)。

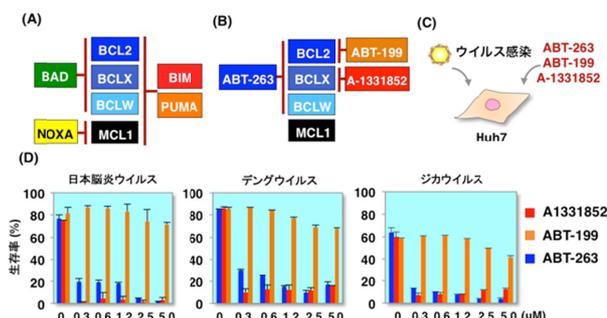


図1. フラビウイルス感染細胞はBcl-X阻害により特異的に細胞死を誘導する。(A) BH3-only蛋白質 (Bim, Puma, Bad, Noxa)とBcl-2蛋白質 (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Mcl-1)との相互作用、BadやNoxaは特定のBcl-2蛋白質とのみ相互作用する。(B)近年、各Bcl-2蛋白質と特異的に結合する低分子化合物が開発された。(C) ウイルス感染におけるBcl-2蛋白質の影響を検討するために各種Bcl-2阻害剤を加えて、細胞死への影響を検討した。(D) 日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス感染細胞はBcl-X阻害により顕著に細胞死を誘導することがわかった。

フラビウイルス感染による MCL1 の発現低下のメカニズムを検討するため、RNA decay による MCL1 mRNA の分解を検討した。XRN1 欠損細胞を作製し、日本脳炎ウイルスを感染させ

たところ、MCL1 の分解は、野生型と同程度であった。このことから、RNA decay の経路はフラビウイルス感染での MCL1 の発現低下に関与しないことが分かった。次に、ウイルス感染による蛋白質合成への影響を検討した。MCL1 は半減期が 30 分程度と非常に不安定な蛋白質として知られているが、日本脳炎ウイルス感染細胞と、非感染細胞を放射線ラベルしたメチオニンを加えて、新規の蛋白質合成を検討したところ、ウイルス感染において、

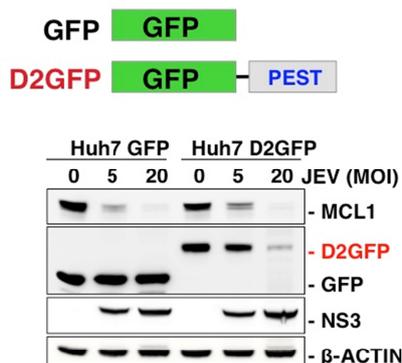


図2. 不安定なタンパク質はフラビウイルス感染で発現量が低下する。GFPにPEST配列を融合させることで、半減期が2時間程度と不安定なタンパク質となる。GFPはフラビウイルス感染細胞でも発現低下しないが、D2GFPはフラビウイルス感染により発現が低下したことから、MCL1だけでなく不安定なタンパク質はフラビウイルス感染により発現が低下することがわかった。

顕著な蛋白質合成の低下が認められた。したがって、ウイルス感染細胞は蛋白質の合成が低下することにより、MCL1 のような半減期のみ時間不安定な蛋白質は新しい蛋白質ができないために発現量が低下するのではないかと考えた。そこで、フラビウイルス感染細胞における MCL1 の蛋白質発現低下の特異性を検討するために、MCL1 の GFP 蛋白質に PEST ドメインをつないだ D2GFP を発現する細胞を作製し、日本脳炎ウイルスを感染させたところ、D2GFP も MCL1 と同様に分解されることがわかった(図2)。

これらの結果から、フラビウイルス感染細胞は宿主の蛋白質合成が抑制され、半減期の短い不安定な蛋白質は新しい蛋白質の合成が抑制されるため、その発現量が低下することが分かった。この現象を確かめるために、MCL1 と同様に半減期に短いことが知られているサイクリン D1 についても検討したところ、フラビウイルス感染によりサイクリン D1 の発現量も低下することが分かった。以上の結果から、フラビウイルス感染により、細胞の蛋白質合成が阻害され、半減期の短い蛋白質は非特異的に新しい蛋白質ができないために発現が低下することが分かった。MCL1 も半減期の短い不安定な蛋白質であるためにフラビウイルス感染細胞ではその発現が低下したものと考察した。

次に、生体内における BCLX 阻害の影響を検討した。BCLX 欠損マウスは胎生致死である

ため、CRISPR により BCLX ヘテロマウスを作製した。このマウスを野生型マウスと共に致死量の日本脳炎ウイルスを感染させると、BCLX ヘテロマウス では有意に生存率が改善された(図3)。この影響は、ウイルス感染を皮下接種したときに観察されたが、脳内に直接ウイルスを感染させた時には差が見られなかったため、末梢組織においてウイルスが増殖する際に BCLX を抑制することが、フラビウイルス感染による病原性の低下に繋がるものと考えられた。また、野生型マウスにおいて BCLX 阻害剤を投与することによっても、生存率の改善が見られたことから、BCLX を阻害する薬剤がウイルス感染での病原性を治療できることを動物実験で明らかにし

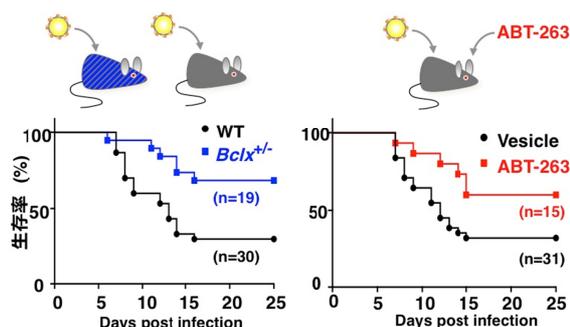


図3. BCLX阻害により致死量のウイルス感染に抵抗性を示す。(A)BCLXヘテロマウスに日本脳炎ウイルス感染に抵抗性を示す。(B)野生型マウスにBCLX阻害剤を飲ませることで、日本脳炎ウイルスの生存率が改善される。

た。

次にさらに詳細な BCLX 阻害における病原性の改善のメカニズムを検討するため、感染部位での炎症性サイトカイン量やウイルス RNA 量を定量した。その結果、BCLX 阻害することで感染部位での炎症性サイトカイン量やウイルス RNA 量は顕著に低下していた。これらの結果から、BCLX を阻害することにより、感染部位でのウイルス増殖の低下や、サイトカイン産生能の低下を誘導することで、ウイルスの増殖を抑制できたことが分かった。そこで、BCLX 阻害によるフラビウイルス感染細胞に細胞死を誘導する生理学的意義を考察するために、日本脳炎ウイルス感染細胞とマクロファージとの共培養による貪食の影響を検討した。その結果、BCLX を阻害することによりマクロファージの貪食が有意に亢進することがわかった。亢進したマクロファージの貪食により、ウイルス感染細胞からの感染性ウイルスの放出が抑えられ、マクロファージが産生するサイトカインやケモカイン量も低下することが分かった。一方で、無処理の Huh7 細胞では貪食の亢進が見られなかったことから、BCLX を阻害することにより Eat Me シグナルが提示され、貪食が亢進したと考えた(図4)。

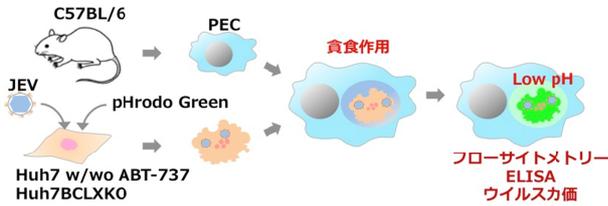


図4: in vitro 貪食作用の検討
ウイルス感染細胞をBCLX欠損細胞や、BCLX阻害剤処理したウイルス感染細胞と腹腔内マクロファージ(PEC)と共培養し、フローサイトメトリーにより貪食効果を計測した。また、上清中のウイルスカラムやELISAによるサイトカイン量を測定し、ウイルス感染細胞と貪食作用の影響を検討した。

これらの結果からフラビウイルス感染細胞では、宿主の蛋白質合成が抑制され、MCL1の発現が低下しており、BCLXを阻害することでウイルス感染細胞にアポトーシスを誘導することで、Eat Me シグナルを効率良く提示させることによりマクロファージによる貪食を促進させ、ウイルス感染の拡大を防ぐことができることがわかった(図5)。したがって、BCLXを阻害できる化合物は広範囲なフラビウイルスに対する治療薬としての可能性を見出した。

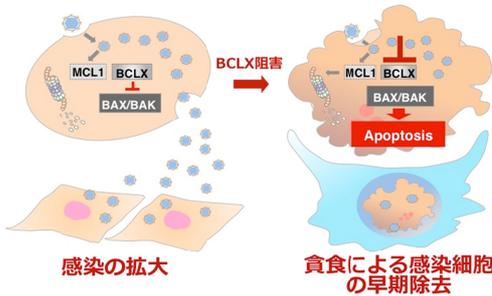


図5: 貪食作用によるウイルス伝播の抑制
通常の細胞にフラビウイルスが感染すると、MCL1は減少するがBCLXがあるためにアポトーシスは抑制されるためウイルスは十分増殖され、感染が広がる。一方で、BCLXを阻害すると速やかにアポトーシスが実行するため、「Eat me」シグナルによりマクロファージがウイルス感染細胞を貪食することでウイルスの感染拡大を防いでいるのではないかと考えている。

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)

Okamoto T, Suzuki T, Kusakabe S, Tokunaga M, Hirano J, Miyata Y, Matsuura Y. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. Viruses 9(9), E241, 2017.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

岡本 徹 (TORU OKAMOTO)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：80628595

(2)研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()