

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月17日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20266

研究課題名(和文)RSウイルス下気道炎発症予測のための疾患特異的microRNAの有用性の検討

研究課題名(英文)Usefulness of disease-specific microRNA for respiratory syncytial virus induced lower respiratory tract inflammation

研究代表者

山本 圭佑 (Yamamoto, Keisuke)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50738515

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)：RSV感染症に対する治療として クラリスロマイシン(CAM)、病状評価として 疾患特異的microRNAに着目した。CAMはRSV誘導性type I, III IFNsの産生を抑制した。転写因子活性を検討したところIFN- γ , IRF-3制御下の転写因子活性がCAM処置により抑制された。さらに免疫染色を用いてIRF-3の細胞内局在を検討した結果, CAMはRSV誘導性IRF-3の核移行を抑制することで, RSV誘導性type I, III IFNsの産生を抑制していた。RSV感染特異的に発現上昇する分泌型miRNAを同定した。鼻汁の分泌型miRNAのhousekeeping geneを同定した。

研究成果の概要(英文)：(1)Clarithromycin (CAM) as a treatment of RSV infection and (2) disease-specific microRNA as an index of disease evaluation were examined. CAM treatment led to a significant reduction in RSV-mediated IL-8, CCL5, IFN- γ and - β production. Furthermore, IFN-promoter activity (activated by poly I:C and RSV infection) was significantly reduced after treatment with CAM. CAM also inhibited IRF-3 dimerization and subsequent translocation to the nucleus.

RSV infection-specific secreted miRNAs were identified. Housekeeping gene of nasal secreted miRNA was identified.

研究分野：上気道感染症

キーワード：RSウイルス III型インターフェロン クラリスロマイシン IRF-3 鼻汁 microRNA housekeeping gene

1. 研究開始当初の背景

RS ウイルスは、鼻咽腔から侵入し感染を引き起こすことが知られている。これまでに我々の講座の研究によって、RS ウイルスは鼻粘膜上皮にはじめに侵入して局所で増殖し、その後に出芽したウイルス粒子がより重篤な下気道感染を起こす可能性が示唆されている(1)。RS ウイルスは生後2歳までにほぼ100%の乳幼児が初感染を受け、以後再感染を繰り返す。初感染で30-40%が下気道炎を発症し、1-3%が重症化する。また、細気管支炎からの回復後も喘鳴が遷延することが臨床上しばしば問題となる。このRS ウイルス感染の細気管支炎に代表される下気道炎発症による重症化および、感染に伴う宿主免疫応答の結果と考えられる喘鳴の遷延、気管支喘息の増悪、アレルギー発症への関与の可能性の指摘に対して、現在のところ予測因子が少なく、予防、治療が限られているのが現状である。しかしながら、近年RS ウイルス検査方法、治療薬の向上、開発が急速に進められている。本邦では、RS ウイルスは2011年より迅速検査の保険適応が外来患者にも拡大した。このことによって、外来診療にて即時にRS ウイルス感染を診断することが可能となっている。一方で、米国において新たに開発された合成RS ウイルス治療薬(GS-8506)が成人での phase III 臨床試験を既に終了していることが報告された(2)。この新奇治療薬はピラゾロ[1,5-a]ピリジン骨格を有し、RS ウイルス F 蛋白に対して作用し、鼻汁中のウイルス量の低下を引き起こすと報告されている。他のウイルスに対して認可されている抗ウイルス剤と同様に、感染例全てに投与するという方針は副作用の面から現実的ではなく、特にRS ウイルスに最も罹患しやすい小児での抗ウイルス剤の使用は適応基準をより詳細に定める必要が生じてくる。このような診断的検査の向上、新たな治療薬の開発に伴って、臨床の現場では投薬、入院基準、感染後の治療方針に関する新しい指標が求められることが考えられる。現在、ウイルス感染に対する外来での迅速診断が可能で、ウイルス感染後に投与可能な治療薬の急速な開発が進んでいる状況であるが、今後は、疾患の重症度、予後予測、喘鳴等の合併症発生の可能性を評価できる指標の存在が必要と考えた。そこで、われわれは現在の治療をさらに推し進めるものとして、クラリスロマイシン(CAM)に着目し、病状評価の指標として microRNA に着目した。

14 員環マクロライド系抗菌薬の一つであるCAMは抗菌効果以外にも多くの独特の作用が知られており、気道分泌や、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の炎症反応に影響を与えるとされる。われわれはこれまで気道上皮細胞においてRS ウイルスによって誘導された炎症性サイトカインであるinterleukin (IL)-6、IL-8、C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) がCAMによ

って抑制されることを報告した。その作用機序としてERK, NF- κ B, MAPKなどのシグナル伝達を抑制することが考えられるが、詳細なメカニズムはまだわかっていない。マクロライド系抗菌薬であるCAMの抗炎症作用機構を詳細に検討し、その作用点を解明することは極めて重要な意味を持つ。

一方、micro RNAは内在性に存在する20から25塩基ほどの、non-coding RNAである。microRNAは複数の異なるmRNAの遺伝子発現量を同時に調節するという作用から、極めて複雑な生体の生命活動を微細に調節している翻訳後修飾の主要な因子として注目されている。ヒトゲノムには1000以上のmicroRNAがコードされており、癌、自己免疫疾患、生活習慣病、感染症何と様々な疾患と関連していることが多数報告されている。排出されたmicroRNAは自然免疫の中核を担うToll様受容体等を刺激し、生体の免疫応答制御を行っていることも指摘されている。このような分泌型のmicroRNAの挙動を計測、観察することによって、疾患特異的バイオマーカーとしての役割を果たしうることが注目されている。RS ウイルスを始めとする呼吸器感染症ウイルスにおいてのmicroRNAの検討報告は極めて少なく、本研究では、RS ウイルス感染特異的に誘導されるmicro RNAを解析し、ウイルスが初感染を起こし増殖、出芽する鼻粘膜から採取される鼻汁を用い、疾患特異的microRNAの挙動をバイオマーカーとして使用することを見据えた。

2. 研究の目的

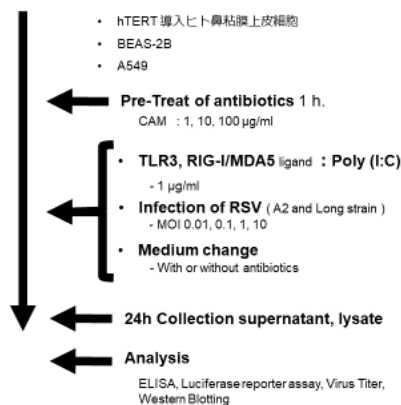
- (1) ヒト気道上皮細胞における呼吸器感染性ウイルスが誘導する pro-inflammatory cytokines に対するCAMの抗炎症効果を確認する。
- (2) CAMのもつ抗炎症作用のメカニズムを探る。
- (3) ウイルス感染培養上皮におけるmicroRNAの挙動を感染細胞、非感染細胞と比較したmicroRNA arrayを用いて網羅的に解析する。
- (4) 培養細胞より得られた上清、感染児より得られた鼻汁を用いて、real-timePCRによる疾患特異的microRNAの検出と、ウイルス感染力価、産生されるIFNなどのサイトカインとの関連を検討する。

3. 研究の方法

- (1)(2)組織使用の同意が得られた患者の鼻科手術において採取した鼻粘膜から作製したhTERT導入鼻粘膜上皮細胞(hTERT-HNEC)、肺胞上皮由来細胞株(A549)、ヒト気道上皮細胞株(BEAS-2B)をヒト気道上皮細胞として検討に用いた。これらの細胞にRSV感染もしくはTLR3の

リガンドである PolyI:C 処置を行い、誘導される pro-inflammatory cytokines に対する CAM の影響を検討した。IL-6, Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), IFN- β , IFN- λ 1-3 の細胞培養液中濃度は ELISA 法で測定した。さらに CAM による RSV 誘導性サイトカイン産生の抑制機序を明らかにするために、それらサイトカインの産生を制御している転写因子の活性をルシフェラーゼレポーター遺伝子法により検討した。ウイルス量はプラーク法により検討し、IRF-3 の活性化、シグナル伝達経路の評価をウエスタンブロット法(WB 法)によるリン酸化の定量、native PAGE を用いた二量体形成の有無、免疫染色による核染色を解析し検討した。

図2



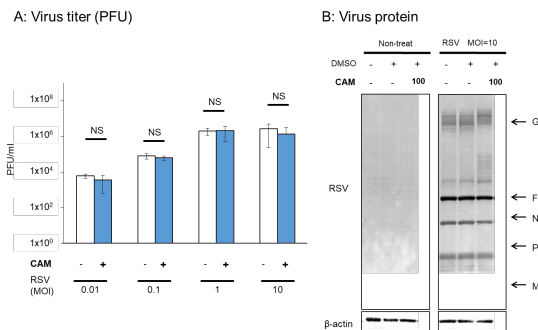
(3)(4) 培養ヒト正常鼻粘膜上皮細胞を用い、RSV 感染と未処置細胞を比較した microRNA array を行った。鼻汁等の臨床検体を用いた解析の予備検討として処置、未処置の気道上皮および鼻粘膜上皮細胞の培養上清から total RNA 抽出を行い、real-time PCR 法による定量的発現解析が可能か検討した。さらに小児鼻汁検体を用いて microRNA array で上昇を認められた microRNA について検討を行った。

4. 研究成果

4-1-1. CAM は RSV 誘導性 type I IFN の産生を抑制する。

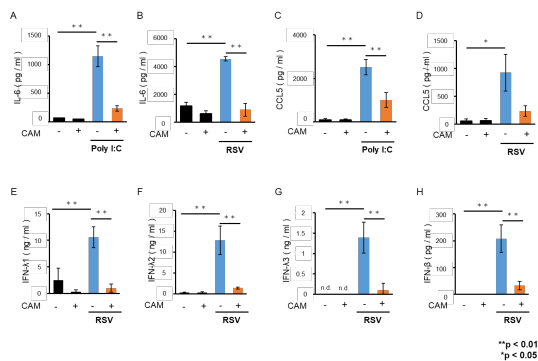
ヒト上気道上皮細胞に RSV を multiplicity of infection(MOI) \times 0.01, 0.1, 1, 10 で感染させ、CAM 処置の有無によるウイルス量の変化(24時間)をプラーク法で定量した(図 1A)。上皮細胞から産生されたウイルス量において CAM 処置による増減は見られなかった。続いて、上皮細胞内の RSV 構造タンパクの発現を比較した(図 1B)。WB 法による RSV 構造タンパクの発現量は CAM 処置による変化を認めなかった。以上より検討した範囲の MOI, 感染時間では CAM 処置は RSV の増殖に影響を与えないことがわかった。

図1



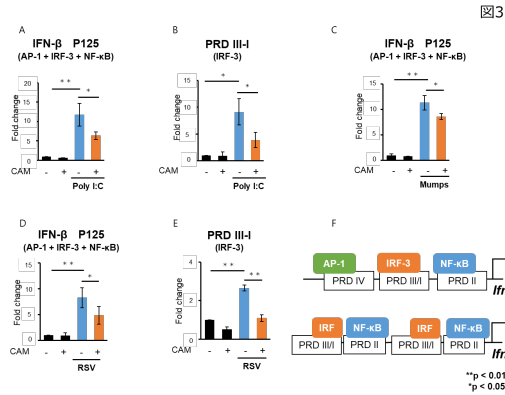
続いて hTERT-HNEC, A549 において PolyI:C 処置もしくは RSV 感染を行い、CAM 処置による IL-6, CCL5, type I, III IFN (IFN- β , - λ 1,2,3), の産生量の変化を計測した(図 2)。RSV 感染によって誘導される IL-6, CCL5, type I, III IFNs 産生は CAM 処置によって有意に抑制された(図 2A-H)。以上のことから、CAM は自然免疫にかかわるサイトカイン産生を抑制していることが判明した。

図2

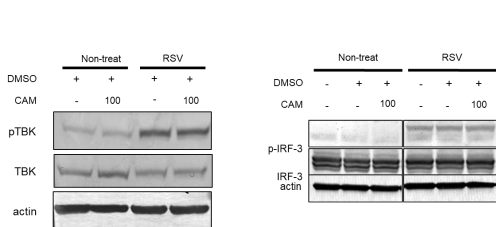


4-1-2. CAM は IFN- β のプロモーター領域の転写因子活性を抑制する。

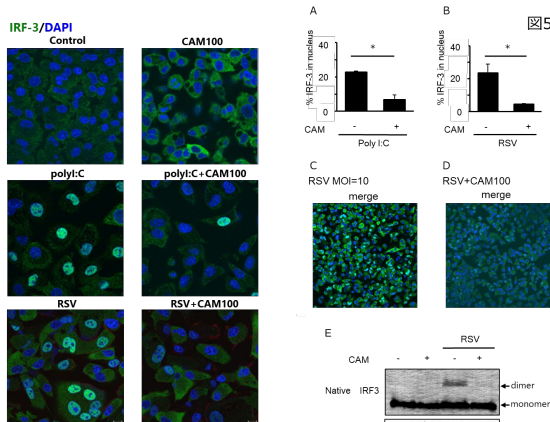
CAM によるサイトカイン産生抑制効果の作用機序を検討するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子法を用いて転写因子活性を検討した。IFN- β プロモーター領域 (IFN- β P125) には AP1, NF- κ B, IRF が結合する positive regulatory domain (PRD) があり(3)、その中でも PRD III, PRD I は IRF-3 の結合領域である(4)。われわれは IFN- β P125 もしくは PRD III-I 領域の転写活性の検討を行った(図 3F)。A549 に PolyI:C 処置を行うと、IFN- β P-125 と PRD III-I の制御下のレポーター遺伝子は活性化され、その活性は CAM 処置により抑制された(図 3A, B)。同様に RSV 感染により活性化された IFN- β P-125 と PRD III-I 制御下のレポーター活性も CAM 処置により有意に抑制された(図 3D, E)。さらに CAM はムンプスウイルス感染により活性化された IFN- β P-125 のレポーター活性も有意に抑制した(図 3C)。



IFN-β のプロモーター領域のうち、CAM 投与によってNF-κBおよびAP-1の活性が抑制されることについては報告、推測されていたが[1], IRF-3 の関与の報告はこれまでになく、我々はさらにIRF-3の活性化抑制機構について詳細に検討した。TBK1とIRF-3はRSV感染により強くリン酸化されたが、CAM処置はそれらのリン酸化に影響を与えなかった(図4)。

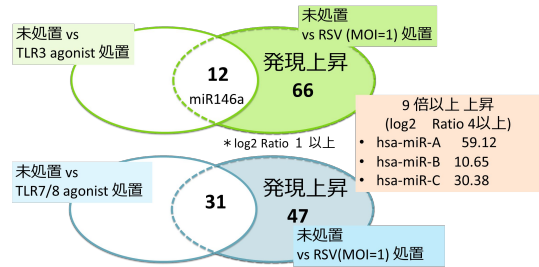


IRF-3の細胞内局在を免疫染色で検討したところPolyI:C処置、RSV感染によりIRF-3は細胞質から核へ移行するが、CAM処置によりIRF-3の核移行が有意に阻害された(図7A-D)。さらにわれわれは、BEAS-2Bを用いてNativePAGEによるIRF-3の二量体形成を検討した。RSV感染により二量体形成の誘導が見られたが、CAM処置により量体形成は抑制されていた(図7E)。これらの結果から、CAMはRSVにより誘導されるIRF-3の二量体形成を抑制することで、シグナル伝達経路を止めていることが示された。



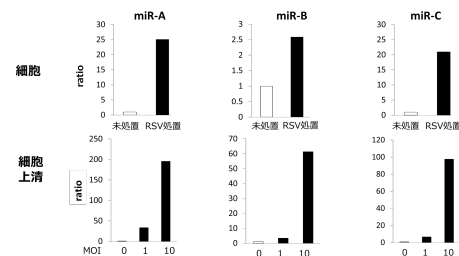
4-2-1. microRNA array による miRNA の探索

RSウイルス感染に伴い、発現上昇するmiRNAのスクリーニングのためにmicroRNA arrayを行った。RSV感染細胞において発現上昇が見られたmicroRNAは47種類みられた。その中から9倍以上(log2 ratio > 4)発現上昇が見られたものが3種類見られた。これらについて疾患特異的のマーカとなり得る候補miRNAとして検討を行うこととした。



4-2-2. 培養細胞・上清における miRNA

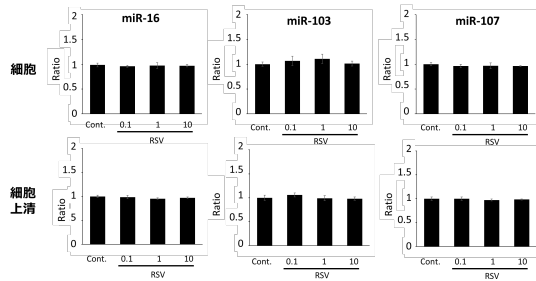
Micro array 解析から予測されたRSV感染に伴って変動するmicroRNAの細胞外への放出を培養細胞で確認することとした。ウイルス処置を行った気道上皮細胞と細胞上清を用いてreal-time PCR法を行った。候補miRNAはRSV感染気道上皮細胞において細胞外への放出が確認され、これらはMuV感染において検出されなかったため、RSV感染特異的に放出されるmicroRNAである可能性が示唆された。



* MuV(ムンプスウイルス)による処置では上記microRNAは検出されなかった。

4-2-3. housekeeping gene

鼻汁の分泌型miRNAの定量において、内在性コントロールは定まっていない。そこで内在性コントロールとして用いられることのあるmiR-16, 103, 107が候補としてRSV感染細胞、非感染細胞、その培養上清を用いてreal-time PCRを行った。いずれのmiRNAも感染の有無、MOIを問わず一定の発現が見られることが示された。従ってこれらのmiRNAは鼻汁検体におけるハウスキーピングmiRNAとして使用することができることが示された。



現在対象 miRNA を小児鼻汁臨床検体での測定、ウイルス量との相関関係などについて検討中である。今後さらなる検討を行い、学会発表を重ねて論文として投稿を目指している。

<引用文献>

- 1) 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: 2144-56.
- 2) King TE Jr, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, et al; A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *N Engl J Med.* 2014; 370: 2083-92.
- 3) R.K. Durbin, S.V. Kotenko, J.E. Durbin; Interferon induction and function at the mucosal surface, *Immunol. Rev.* 2013; 255: 15.
- 4) M.G. Wathelet, C.H. Lin, B.S. Parekh, et al; Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN- β enhancer in vivo, *Mol. Cell* 1998; 1: 11.

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 4 件)

Yamamoto K, Yamamoto S, Ogasawara N, Takano K, Shiraishi T, Sato T, Miyata R, Kakuki T, Kamekura R, Kojima T, Tsutsumi H, Himi T, Yokota S. Clarithromycin prevents human respiratory syncytial virus-induced airway epithelial responses by modulating activation of interferon regulatory factor-3. *Pharmacol Res.* 2016; 111: 804-816

Yamamoto S, Ogasawara N, Yamamoto K, Uemura C, Takaya Y, Shiraishi T, Sato T, Hashimoto S, Tsutsumi H, Takano K, Himi T, Yokota SI. Mitochondrial proteins

NIP-SNAP-1 and -2 are a target for the immunomodulatory activity of clarithromycin, which involves NF- κ B-mediated cytokine production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 483: 911-916

Hashimoto S, Yamamoto S, Ogasawara N, Sato T, Yamamoto K, Katoh H, Kubota T, Shiraishi T, Kojima T, Himi T, Tsutsumi H, Yokota S. Mumps Virus Induces Protein-Kinase-R-Dependent Stress Granules, Partly Suppressing Type III Interferon Production. *11, PlosOne.* 2016; 1-18

Yamamoto K, Ogasawara N, Yamamoto S, Takano K, Shiraishi T, Sato T, Tsutsumi H, Himi T, Yokota S. 60, *Microbiol Immunol.* 2018; 90-98

[学会発表](計 6 件)

第 16 回 日韓耳鼻咽喉科・頭頸部外科学会. 平成 28 年 5 月 28 日 ~ 30 日, 東京 (日本): Keisuke Yamamoto, Soh Yamamoto, Noriko Ogasawara, Kenichi Takano, Tsuyoshi Ohkuni, Takashi Kojima, Hiroyuki Tsutsumi, Shin-ichi Yokota, Tetsuo Himi. Clarithromycin regulates production or induction of interferon and proinflammatory cytokines production by RSV infection in human airway epithelial cells via modulating nuclear translocation of interferon regulatory factor-3.

第 23 回マクロライド新作用研究会(平成 28 年 7 月 29 日、東京): 山本圭佑、小笠原徳子、山本聡、堤裕幸、氷見徹夫、横田伸一: クラリスロマイシンは気道上皮細胞で RS ウイルスによって誘導されるインターフェロンの産生を IRF-3 を介して調整する。

第 64 回日本ウイルス学会学術総会(平成 28 年 10 月 23 ~ 25 日, 札幌): Keisuke Yamamoto, Hiroyuki Tsutsumi, Tetsuo Himi, Shin-ichi Yokota: Clarithromycin prevents human respiratory syncytial virus-induced airway epithelial responses by modulating activation of interferon regulatory factor-3

第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(平成 29 年 4 月 14 日、旭川): 山本圭佑、小笠原徳子、高野賢一、氷見徹夫: クラリスロマイシンは気道上皮で RSV によって誘導されるインターフェロンを IRF-3 を介して調整する

第 118 回 日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会(平成 29 年 5 月 17 日 ~ 5 月 20 日、広島): クラリスロマイシンは気道上皮で RSV によって誘導されるイ

インターフェロンを IRF-3 を介して調整する：山本圭佑，小笠原徳子，高野賢一，宮田遼，角木拓也，亀倉隆太，氷見徹夫

第 56 回日本鼻科学会総会・学術講演会（平成 29 年 9 月 28 日-30 日、山梨）：ウイルス感染症での鼻粘膜上皮における細気管支炎・喘鳴の発症予測因子としての鼻汁 microRNA の可能性：山本圭佑，小笠原徳子，大國毅，高野賢一，堤裕幸，氷見徹夫

〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕
〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 圭佑 (Keisuke Yamamoto)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：50738515

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

氷見 徹夫 (HIMI Tetsuo)
札幌医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号：90181114

横田 伸一 (YOKOTA Shin-ichi)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：10325863

高野 賢一 (Kenichi Takano)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70404689

黒瀬 誠 (KUROSE Makoto)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：60404696

亀倉 隆太 (KAMEKURA Ryuta)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：70404697

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

小笠原 徳子 (OGASAWARA Noriko)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：00438061

山本 聡 (YAMAMOTO Soh)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：10588479