

令和元年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15698

研究課題名(和文) ヒトサイトメガロウイルス感染により活性化される新規自然免疫応答活性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of innate immune signaling during human cytomegalovirus infection

研究代表者

山田 大翔 (Taisho, Yamada)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：10779333

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)：ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)に対する自然免疫センサー及びシグナル経路の解析を行った。HCMV感染時に宿主インターフェロン(IFN)応答が確認され、その応答に関わる宿主自然免疫センサー分子を見出した。さらに、このセンサー分子が認識するHCMV粒子中に存在する因子を同定した。これらの新規に見出したシグナル活性化機構が実際のHCMV感染時に起こるかを変異HCMVを作製することで確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCMVは、世界の殆どの人が感染しており、とくに免疫不全の患者で致死的な感染症を引き起こすことが臨床的に問題となっている。HCMV感染症の治療には、長期にわたる抗HCMV薬の投与が必要であるが、一方で副作用や薬物耐性株の出現が問題視されており、HCMV感染症の克服には免疫学的なアプローチも重要であると考えられる。本研究では、HCMV特異的な因子に着目して自然免疫応答活性化の分子機構を見出したことで、HCMV感染細胞特異的に作用する生体メカニズムを見出すにいたり、副作用の少ない治療への応用に発展する可能性を秘めていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed innate immune sensor and signal pathway for human cytomegalovirus (HCMV). The host interferon (IFN) response was observed during HCMV infection, and a host innate immune sensor molecule involved in the response was found. Furthermore, we identified the factors present in the HCMV particles that this sensor molecule recognizes. We also checked whether these newly found signal activation mechanisms occur during actual HCMV infection, by generating mutant HCMV.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

微生物が感染した際に、最前線において微生物を認識する機構は感染防御応答を惹起する上で最も初めの重要なプロセスである。その認識は、糖や脂質、核酸といった微生物特有の保存された構成分子の構造 (pattern-associated molecular patterns ; PAMPs) を宿主の遺伝子にコードされている受容体 (pattern recognition receptors ; PRRs) を介して行われる。その後、下流にシグナルが伝達されることで、 $\alpha$  型 IFNs や各種サイトカインの遺伝子発現が誘導され、抗ウイルス効果を発揮する。ウイルス感染においては、ウイルス由来の核酸が主要な PAMPs となることが知られている。

一方、健常人に広く潜伏感染し、特に臓器移植患者などで致死的な感染症を引き起こす DNA ウイルスであるヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、日和見病原体として臨床では大きな問題となっているが、その自然免疫認識機構についてはまだ十分に明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

HCMV に対する自然免疫認識機構について詳細に検討することを目的とする。特に、我々が見出した宿主センサー分子 IFI16 とその会合因子としての HCMV 構造タンパク質 pp65 について着目する。予備的な実験で、HCMV pp65 が IFI16 によって認識されることが示唆されており、pp65 に対する自然免疫活性化に関わる分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) HCMV 感染や pp65 発現により活性化されるシグナル伝達経路を詳細に検討する。
- (2) 宿主センサー IFI16 と pp65 間の会合特性について解析する。
- (3) 実際の HCMV 感染時において、pp65 認識による自然免疫応答の活性化が認められるかを pp65 を欠損させた変異型 HCMV を作製して解析する。

## 4. 研究成果

- (1) pp65 発現や HCMV 感染により活性化されるシグナル伝達経路を詳細に検討する：  
申請者らの予備的な実験において、HCMV 感染後の I 型 IFNs の誘導を確認している。また、HCMV 感染時にみられる IFN- $\beta$  の発現誘導には TANK-binding kinase (TBK1) や Interferon regulatory factor-3 (IRF-3) の活性化が関与することが知られていることから、ヒト肺線維芽細胞 (HELFs) においても HCMV 感染時に活性化されるシグナル経路が同様に TBK1-IRF-3 経路なのか検討するため、siRNA を導入するノックダウンの実験を行い、誘導される IFN- $\beta$  に対する qRT-PCR や ELISA で解析を行った。その結果、HCMV 感染時には TBK1 および IRF-3 依存的に IFN- $\beta$  が誘導されることが明らかとなった。さらに TBK1 や IRF-3 の活性化の指標となるリン酸化も Western blot で確認された。これらと同様の結果が、pp65 発現時に誘導される自然免疫応答でも確認された。そこで、HCMV 感染時の自然免疫応答に関与するセンサー分子 IFI16 を介した自然免疫シグナルが HCMV に対する抗ウイルス応答に関与するかを HELFs において IFI16 およびその下流のアダプター分子 STING をノックダウンさせる実験系で検討した。その結果、IFN 応答に IFI16、STING が関与することが明らかとなった。さらに、TCID<sub>50</sub> 解析による HCMV 量の測定を行うと IFI16、STING は抗ウイルス応答に重要であることも確認された。これらの結果をまとめると、pp65 が自然免疫シグナル伝達経路を活性化すること、さらに HCMV 感染時に IFI16-STING-TBK1-IRF-3 経路が活性化することが明らかとなった。

- (2) 今回着目する核酸センサーと pp65 間の会合特性や細胞内局在性を検討する：

申請者らはこれまでに、IFI16 が pp65 に会合することを見出している。よって IFI16 が pp65 センサー分子として作用する可能性を検討した。まず、両者の会合が直接的であるか、あるいは DNA 依存的な会合であるのかを DNase を用いた免疫共沈降やリコンビナントタ

ンパク質を使って解析したところ、DNA 非依存的に直接会合することが確認された。  
。さらに、この IFI16 と会合しない pp65 の deletion mutants を HELFs に発現させ IFN-β誘導を検討すると、IFN-β誘導が認められなかったことから、IFI16-pp65 間の会合が IFN-β誘導に重要であることが明らかとなった。また、蛍光イメージングによる共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行った結果、IFI16 と pp65 は主に核で共局在をすることが明らかとなった。これらの結果をまとめると、IFI16 は pp65 と直接会合し、IFN 応答を誘導することが確認された。

(3) HCMV 感染時における自然免疫応答活性化に対する pp65 の関与を検討する：

この項目では、実際の HCMV 感染時の pp65 に対する自然免疫応答が抗ウイルス作用を持つか検討した。そのアプローチとして pp65 を欠損させた変異型 HCMV を作製することで解析した。この変異ウイルスを感染させると、I 型 IFNs や炎症性サイトカインの発現誘導が抑制され、それと一致してウイルス量の増加が認められた。この結果より、HCMV 感染時に pp65 は自然免疫シグナルを活性化させることが明らかとなった。

これらの結果をまとめると、IFI16 は HCMV pp65 を認識し、自然免疫応答を活性化していることが明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者は下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 3 件 )

1. Takaoka A. and Yamada T. Regulation of signaling mediated by nucleic acid sensors for innate interferon-mediated responses during viral infection. *Int. Immunol.*, dxz034 (2019), 査読あり
2. Yamada T. and Takaoka A. *In vitro* Treatment of Mouse and Human Cells with Endogenous Ligands for Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Bio-protocol*, 7 (1), e2097 (2017), 査読あり
3. Yamada T. and Takaoka A. FICZ Exposure and Viral Infection in Mice. *Bio-protocol*, 7 (1), e2096 (2017), 査読あり

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

ホームページ等

## 6 . 研究組織

研究協力者

[ 主たる渡航先の主たる海外共同研究者 ]

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。