

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006 ~ 2008
 課題番号：18591196
 研究課題名(和文) SOCS 遺伝子制御による RSV 感染症の新たな治療法確立の検討
 研究課題名(英文) Establishment of new therapy against RSV infection by SOCS genetic control

研究代表者 橋本 浩一
 (HASHIMOTO KOICHI)
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：50322342

研究成果の概要：

RSV 感染による SOCS1、SOCS3、CIS の発現が JAK-STAT 系の活性化を抑制し、感染初期の抗ウイルス作用から逃れるため、si-RNA による SOCS1、SOCS3、CIS の発現抑制が抗ウイルス効果を誘導すると考えられた。一方、マウス正常肺において SOCS3 は細気管支上皮でのみ発現していた。RSV 感染により細気管支上皮での SOCS3 発現は減少し、一方で肺胞レベルでの発現誘導が観察された。以上の結果は RSV ウイルスの感染初期の抗ウイルス効果からの回避機序、および RSV 感染下気道炎の病態を明らかにする一助となると思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学、RSV、SOCS、si-RNA、マウス、免疫染色

1. 研究開始当初の背景

Respiratory Syncytial ウイルス(RSV)は冬季に流行する乳幼児の細気管支炎の病因の1つである。3歳までに殆どの幼児が感染し、乳幼児全体の約2~10%が重症RSV感染症にて入院し、入院児の約20%が人工呼吸器の装着などの集中治療が必要となる(Am. J. Respir. Crit. Care. Med.; 161(5):

1501-1507, 2000)。また、RSV感染は臓器移植医療における成功率、慢性呼吸器疾患患者、年輩者の感染性急性呼吸不全の予後にも深く関連している(N. Engl. J. Med. 352(17):1749-1759, 2005)。さらに、小児の喘息発症に重症RSV感染症の関与が示唆されている(Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 171(2):137-141 2005, Lancet. 354(9178):

541-545 1999)。しかし有用な薬剤、ワクチンは未だ開発されておらず、RSV の感染病理が明らかにされ治療法の確立が切望されている。

これまでウイルスがいかにヒトの免疫系から回避し、発症を引き起こすかが研究されてきた。JAK/STAT 系はインターフェロン (IFN) およびサイトカインの細胞内シグナル伝達系で中心的な役割を担っているが (Science 296(5573), 1653-1665, 2002)、RSV では感染後、ウイルス遺伝子がコードする非構造蛋白が、細胞の JAK/STAT 系における STAT1、STAT2 のリン酸化を阻害し、IFN / の誘導を抑制し、最終的に感染初期の非特異的抗ウイルス作用から逃れることが明らかになっている (J. Virol. 79(14): 9315-9319 2005, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 30(6):893-900 2004, Nat. Med. 11:56-62 2005)。近年、ウイルスによる JAK/STAT 系の抑制機構だけではなく、宿主側の JAK/STAT 系の抑制機構として SOCS (suppressor of cytokine signaling)ファミリーが発見され (Nat.Rev.Immunol.,3(11), 900-911, 2003) さらに C 型肝炎ウイルス (FASEB. J. 17(3):488-90. 2003.) エンテロウイルス (J. Clin. Invest. 111(4): 469-478. 2003.)、ヘルペスウイルス 1 型 (J. Virol. 78(12):6282-6286. 2004., Virology. 338:173-181. 2005.) のウイルス自身による SOCS 遺伝子発現誘導の報告がある。RSV に関してはこれまで報告はなく、研究代表者の橋本が細胞培養系で RSV 感染後の SOCS ファミリーの発現を初めて検討し、「RSV 感染細胞において SOCS1、SOCS3、CIS の発現が著しく増加し、さらに siRNA (small interfering RNA) による SOCS1、SOCS3、CIS の発現抑制の条件下で RSV の増殖が著しく阻害される。」ことを見いだした (図 1、図 2)。

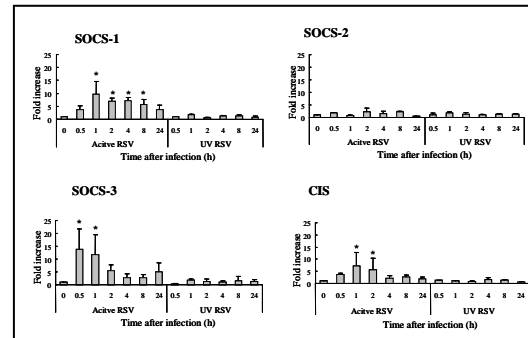


図 1 . RSV 感染後の Hep-2 細胞における SOCS 遺伝子発現の定量 PCR による検討。(UV RSV : 紫外線不活化 RSV)

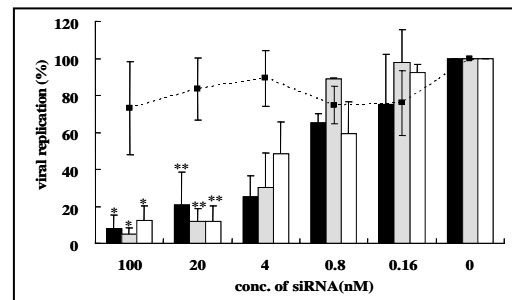


図 2 . 各 SOCS に対する si-RNA の Hep-2 細胞における RSV ウイルス増殖への影響。(破線:陰性コントロール si-RNA、■:si-SOCS1、■:si-SOCS3、□:si-CIS)

2 . 研究の目的

本研究では細胞培養系で抗 RSV 効果の認められた SOCS1、SOCS3、CIS の発現を抑制する siRNA (si-SOCS) の抗 RSV 感染症効果の機序を明らかにし、さらに RSV マウス感染モデルを用い、免疫組織学的に気道上皮局所における RSV 感染細胞と CIS、SOCS1、SOCS3 の発現の動向を明らかにする。

3 . 研究の方法

(1) 細胞培養系での検討。

ヒト咽頭癌細胞株、Hep-2 細胞へ遺伝子導入試薬を用い si-RNA を導入し、24 時間後に RSV を感染させた。感染後、細胞を回収し、STAT-1、-2、およびそれぞれのリン酸化蛋白の発現をウェスタンブロットで検討した。

(2) マウスでの検討。

8週齢メスの BALB/c のマウスを用い定常状態（非感染）での肺における SOCS3 の発現を免疫組織学的に検討した。マウス肺は 4%パラホルムアルデヒドで固定し、SOCS3 に対する抗体は IBL の抗 SOCS3 抗体(C204) を用いた。

蛍光(Cy3)標識した siRNA を用い siRNA の肺組織への取り込みについて検討した。

RSV 感染後の肺における SOCS3 の発現を免疫組織学的に検討した。

si-SOCS を遺伝子導入試薬無しに経鼻にて肺へ吸入させ、定常状態での肺における SOCS3 の発現を免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1)RSV 感染下での si-RNA による SOCS1,SOCS3,CIS 遺伝子発現抑制の STAT1, STAT2 のリン酸化への影響。

ヒト咽頭癌細胞 HEP-2 細胞へ siRNA(20nM) 導入 24 時間後に RSV を moi 1 で感染させた。感染直後、感染後 1 時間、2 時間、4 時間における STAT1、STAT2 のリン酸化についてウェスタンブロットで検討した。siRNA の陰性コントロールとして si-GFP を、また陽性コントロールとして Poly I:C (2.8 µg/100ul) を用いた。SOCS 遺伝子それぞれの si-RNA の si-SOCS1、si-SOCS3、si-CIS で処理した群は感染直前でも STAT1、STAT2 のリン酸化がみられた。陰性コントロール siRNA の si-GFP で処理した群では、いかなる時間経過でも STAT1、STAT2 のリン酸化を示すシグナルは検出されず、また時間経過と共に STAT2 の発現が減少した。また si-SOCS1、si-SOCS3 で処理した群は感染後更なる STAT1 のリン酸化がみられた。si-CIS で処理した群では STAT2 のリン酸化の増加がみられた。これらの結果は

SOCS1、SOCS3、CIS の発現抑制は RSV 感染における STAT1、STAT2 のリン酸化を誘導し、さらに si-SOCS1,si-SOCS3 は STAT1、STAT2 のリン酸化の誘導により RSV の増殖を抑制し、si-CIS は STAT2 のリン酸化の誘導により RSV の増殖を抑制することを示唆した(図3)。

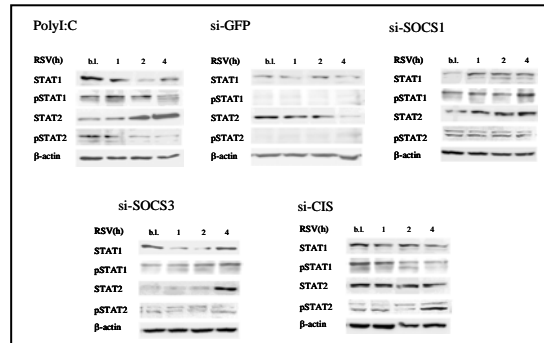


図3 si-RNA 遺伝子導入 HEP-2 細胞における、RSV 感染後の STAT1、STAT2 リン酸の検討。

(2)正常肺における SOCS の発現。

マウスの正常肺組織を用いて、SOCS1、SOCS3 の発現について免疫組織学的に検討した。パラフィン包埋した肺標本を抗 SOCS1 抗体、抗 SOCS3 抗体を用いて染色した。線毛上皮、非線毛上皮を問わず細気管支上皮では SOCS 1、SOCS3 の陽性シグナルが認められた。しかし、肺胞気管支、また扁平上皮化生を認める主気管支レベルでの SOCS 1、SOCS3 のシグナルは観察されなかった。

(3)肺での siRNA の取り込みについて。

蛍光(Cy3)標識した siRNA を用い siRNA の肺組織への取り込みについて検討した。全身麻酔したマウスに 500nM の Cy3-siRNA100ul(50pmol) を鼻より自発呼吸により吸飲させた。投与 4 時間後、24 時間後に肺を摘出し、パラフィン包埋した肺標本を用い siRNA 取り込みの局在、siRNA 投与の際の遺伝子導入薬存在の必要性、蛍光シグナルの持続時間について蛍光顕微鏡を用い検討した。siRNA の蛍光シグナルは全肺野の 80% に認められ、局在としては気道上皮、肺胞上

皮に観察された。また遺伝子導入薬を用いなかった場合、投与4時間後に蛍光シグナルは認められたが非常に微弱であった。一方、蛍光の局在は遺伝子導入薬存在の有無には関係なかった。さらに、遺伝子導入薬を用いた場合 siRNA 投与 24 時間後も蛍光シグナルは認められ、遺伝子導入薬を用いなかった投与4時間後より強いシグナルが観察された。

(4)RSV 感染後の SOCS3 の経時的発現についての免疫組織学的で検討。

8 週齢の雌の Balb/c マウスに RSV 感染細胞培養上清 (RSV-A2 株) を経鼻より 10^7 pfu 感染させ、感染後 2 時間、24 時間、4 日目、8 日目に肺を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した肺標本を抗 SOCS3 抗体を用いて染色した。ウイルスは非処理 RSV(alive RSV) と紫外線不活化 RSV(UV-RSV)を用いた。alive-RSV 感染において SOCS3 の発現は感染前を 100%とした場合、感染 2 時間では 50-70%、感染 24 時間では 10-30%、感染 4 日目では 30%、感染 8 日目では 10-30%であった。UV-RSV を用いた実験では、感染後 2 時間から 4 日目までの発現は同様であったが、8 日目の時点では 70-80%に回復していた (図 4)。

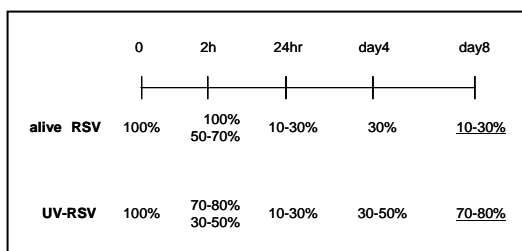


図 4 . RSV 感染後の肺における SOCS3 発現の免疫組織学的検討。

(5)精製 RSV を用いてのマウス肺における SOCS3 の発現。

培養上清に含まれる生理活性物質による SOCS3 発現への影響が考えられるため、超遠心による精製 RSV を用いマウスに感染させ、

肺における SOCS3 の発現を検討した。感染後 2 時間、4 時間、8 時間、24 時間、2 日目、4 日目、8 日目、14 日目に肺を採取し、抗 SOCS3 抗体を用い免疫染色した。細気管支上皮での SOCS3 の発現は、感染後では感染前を 100%とした場合、alive-RSV、UV-RSV とともに感染 24 時間で 30-40%まで減少し、alive-RSV では感染後 48 時間まで発現減少が遷延し、感染 4 日目で感染前に回復した。II 型肺胞上皮では UV-RSV、alive-RSV とともに SOCS3 の誘導がみられたが、特に alive-RSV は感染 8 時間以内において UV-RSV に比較し強く誘導が観察された。

(6)si-SOCS3 投与後の肺における SOCS3 の発現。

既報の論文を参考に SOCS3 に対する siRNA を連日 4 日間投与したが、肺の免疫組織学検討では SOCS3 の発現抑制効果は観察されなかった。

以上の結果は RSV ウイルスの感染初期の抗ウイルス効果からの回避機序、および RSV 感染下気道炎の病態を明らかにするとともに、RSV 感染重症化や RSV 感染後の気道過敏症の有効な予防・治療法確立の一助となると思われる。

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 5 件)

Hashimoto K, Ishibashi K, Ishioka K, (他 11 名, 1 番目, 13 番目). RSV Replication Is Attenuated by Counteracting Expression of the Suppressor of Cytokine Signaling

(SOCS) Molecules. Virology, 査読あり;
2009, in press.

Hashimoto K, Mori S, Hashimoto Y, (他
8名, 1番目, 3番目, 10番目). DSCG
reduces RSV-Induced Illness in
RSV-infected mice. J Med Virol, 査読
あり; 81:354-361, 2009.

橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮. 総説:
RSウイルスと気管支喘息. 臨床免疫・ア
レルギー科, 査読無し(依頼投稿), 50
巻3号, 288-294頁, 2008年.

橋本浩一, 細矢光亮. 総説:RSV感染と気
道過敏性. アレルギー・免疫, 査読無し
(依頼投稿), 15巻8号, 28-34頁, 2008
年.

Hashimoto K, Ishibashi K, Gebretsadik
T, (他12名, 1番目, 13番目).
Functional Polymorphism of the
Promoter Region of the Prostacyclin
Synthase Gene and Severity of RSV
Infection in Hospitalized Children. J
Med Virol, 査読あり;80(11):2015-2022,
2008.

[学会発表](計2件)

橋本浩一. RSV感染におけるSOCS発
現の経時的変化と機能の検討. 日本
ウイルス学会学術集会, 平成20年10
月26日, 岡山市.

Hashimoto K. RSV Replication Is
Attenuated by Counteracting
Expression of the Suppressor of
Cytokine Signaling (SOCS) Molecules.

RSV 2007 Symposium, 平成19年10月
25-28日, 米国フロリダ.

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 浩一 (HASHIMOTO KOICHI)
公立大学法人福島県立医科大学・
医学部・講師
研究者番号: 50322342

(2)研究分担者

細矢 光亮 (HOSOYA MITSUAKI)
公立大学法人福島県立医科大学・
医学部・教授
研究者番号: 80192318

橋本 優子 (HASHIMOTO YUKO)
公立大学法人福島県立医科大学・
医学部・講師
研究者番号: 60305357

(3)連携研究者

なし。