

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02344

研究課題名(和文)植物由来RNAを用いた免疫応答の誘導によるウイルス感染症の新規予防・治療法

研究課題名(英文) New prognostic and therapeutic treatment for viral infection using plant-derived double stranded RNA

研究代表者

藤田 尚志 (Fujita, Takashi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・客員教授

研究者番号：10156870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：二重鎖RNA(dsRNA)は自然免疫を活性化し、インターフェロン産生を始めとする抗ウイルス応答を誘導する。植物にはウイルス様のdsRNAを共生するものがある。本研究ではこのdsRNAをマウスに経鼻投与することにより季節性インフルエンザウイルス(H1N1)の感染を防ぐ効果を確認した。さらにこの効果は高病原性(H5N1)インフルエンザウイルスでも確認された。さらにこのdsRNAを不活化H5N1粒子とともに皮下接種することにより強力なワクチン効果を認め、dsRNAのワクチンアジュバントとしての有効性が示された。天然dsRNAを用いたウイルス感染予防、治療の可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食用植物由来の二重鎖RNAは生体にとって安全であると考えられている。マウスへの経鼻投与と実験で、このRNAは呼吸器感染を引き起こすインフルエンザウイルスの感染を防ぐ効果があることを示した。季節性インフルエンザの流行、あるいは10年単位で繰り返される大流行に対抗する有効な手段となる可能性が示された。また、このRNAはウイルスの種類にかかわらず有効であることから、100年単位で起きる世界規模のウイルス感染パンデミック(スペイン風邪、新型コロナウイルス)、さらに将来の未知のウイルスに対しても効果が期待されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Double-stranded RNA (dsRNA) is well characterized as an inducer of antiviral interferon responses. We found that the systemic immune-activating capacity of the plant-derived dsRNA protected mice from infection by H1N1 strain of the Influenza A virus. Further, this dsRNA exhibited protective effect against a highly virulent H5N1 strain of the Influenza A virus. In addition, subcutaneous inoculation of the dsRNA together with inactivated virion of the H5N1 strain of the Influenza A virus suppressed the lethality by the viral infection as compared with individual inoculation of either dsRNA or HA protein, suggesting its potential usage as a vaccination adjuvant. Moreover, intraperitoneal inoculation of the dsRNA limited the growth of B16-F10 melanoma cells through the activation of NK cells in murine models. Taken together, this study demonstrated the systemic immune-modulating capacity of a plant-derived dsRNA and its potential for nucleic acid-based clinical applications.

研究分野：抗ウイルス自然免疫

キーワード：二重鎖RNA 植物性 インターフェロン アジュバント 抗ウイルス ワクチン 実験マウス インフルエンザ

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおけるウイルス感染のパンデミックや家畜のウイルス感染は時として甚大な経済的被害を引き起こす。自然免疫機構はウイルス感染を最初に感知し抗ウイルス応答を惹起して感染防御の初期反応を担当している。ウイルス感染の感知はウイルス由来の RNA の二重鎖構造を認識することによって行われる。二重鎖 RNA は特定のセンサー分子によって認識され、インターフェロンが産生され、さらにインターフェロンの作用によって多くのインターフェロン誘導遺伝子が活性化され、これによって抗ウイルス効果を発揮する。ピーマンやイネなどの植物にはエンドルナウイルス由来の二重鎖 RNA が含まれており、これを用いて宿主（ヒトや家畜）に抗ウイルス効果を誘導することが可能であることが先行研究で明らかとなっていた。自然免疫応答はウイルス特異性がなく、幅広いウイルス感染に対して予防効果が期待される。

2. 研究の目的

植物由来の非感染性二重鎖 RNA を用いて宿主に自然免疫応答を誘導できれば、ウイルス感染症の予防やその重症化防止の効果が期待される。植物からの安価、高効率での二重鎖 RNA の抽出法を確立すること、マウスを用いたウイルス感染で植物由来の二重鎖 RNA の抗ウイルス効果を確立することを本研究の目的とする。抗ウイルス効果としては、呼吸器系の感染を引き起こすインフルエンザウイルス、脳心筋炎を引き起こすウイルスを用いることで多様な作用を明らかにすることを目指す。また二重鎖 RNA は抗腫瘍効果が報告されており、実験的な腫瘍移植の系での効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 食用に用いるピーマン、イネにはエンドルナウイルスが共生している品種があり、それらを特定して二重鎖 RNA の効率的な抽出方法を検討する。

(2) マウスに植物由来二重鎖 RNA を投与して各組織におけるインターフェロン、インターフェロン誘導遺伝子群の誘導を検討する。

(3) マウスに植物由来二重鎖 RNA を投与し、ウイルス感染による攻撃試験を行い、マウスの体重変化、生存率を検討する。攻撃試験には呼吸器感染を起こす季節性インフルエンザウイルス、高病原性インフルエンザウイルス、脳心筋炎ウイルス（EMCV）を用い、異なる病原性、組織特異性を持つウイルスへの効果を検討する。

(4) 自然免疫応答は獲得免疫の成立を促進する、アジュバント効果を担っていることが明らかとなっている。植物由来二重鎖 RNA のアジュバント効果を検討する。高病原性インフルエンザウイルスの不活化粒子を抗原としたワクチンをモデルとして免疫時における植物由来二重鎖 RNA の効果を検討する。

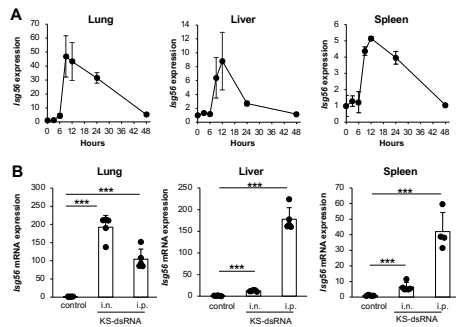
(5) B16 メラノーマ細胞を C57BL/6J マウスに移植する系を用いて植物由来二重鎖 RNA の抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1) ピーマン、米糠からの二重鎖 RNA 抽出プロトコルを確立した (文献 1)。

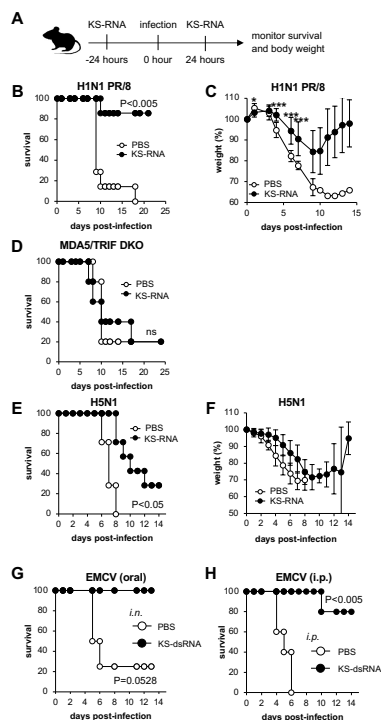
(2) マウスにピーマン二重鎖 RNA を経鼻投与し、肺、肝臓、脾臓でのインターフェロン誘導遺伝子 ISG56 の誘導を調べた。その結果、投与後 12 時間前後に一過性の誘導を認めた (Fig. 1A)。投与方法を経鼻、腹腔内でそれぞれ行い、肺、肝臓、脾臓でのインターフェロン誘導遺伝子 ISG56 の誘導を調べた。肺では経鼻投与が効率良く誘導が起きていたが、肝臓、脾臓では腹腔内投与の方が誘導効率は高かった (Fig. 1B)。以上よりマウスに植物由来の二重鎖 RNA を投与することにより自然免疫応答が誘導されることが明らかとなった。

Fig.1



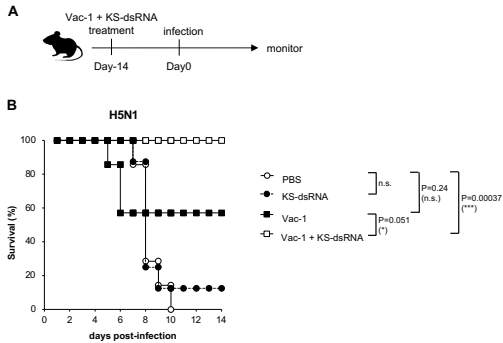
(2) 植物二重鎖 RNA を投与したマウスにウイルス感染による攻撃試験を Fig. 2A に示す方法で行った。二重鎖 RNA を経鼻投与し、季節性インフルエンザウイルス (H1N1) を感染させ生存率 (Fig. 2B) 及び体重変化 (Fig. 2C) を検討した。二重鎖 RNA 投与により劇的な抗ウイルス効果が誘導されたものと考えられた。二重鎖 RNA センサーである MDA5 及び TRIF のノックアウトマウスでは防御効果が見られなかった事から、これらのセンサーが機能していると考えられた (Fig. 2D)。同様に抗病原性トリ由来インフルエンザウイルス (H5N1) を用いた攻撃試験では効果はやや弱いものの、明らかな防御効果が見られた (Fig. 2E, F)。EMCV を用いた攻撃試験では二重鎖 RNA を警備投与、ウイルスは経口感染 (Fig. 2G) または二重鎖 RNA、ウイルス共に腹腔内で投与した場合 (Fig. 2H) で生存率において劇的な防御効果が見られた。特に経鼻投与した二重鎖 RNA は異なる場所からのウイルス感染である経口感染を防ぐことが示された。

Fig.2



(3) 高病原性インフルエンザウイルスの不活化粒子 (Vac-1) をワクチンとして用いた場合の二重鎖 RNA のアジュバント効果について検討を行なった。実験は Fig. 3A に示す方法で行った。処理は PBS、二重鎖 RNA 単独、Vac-1 単独、Vac-1 と二重鎖 RNA の混合で行い、2 週間後に高病原性インフルエンザウイルスの感染を行なった。その結果、Vac-1 と二重鎖 RNA の混合に最も強い防御効果が認められ、アジュバントとして有効であることが示された (Fig. 3B)。

Fig.3

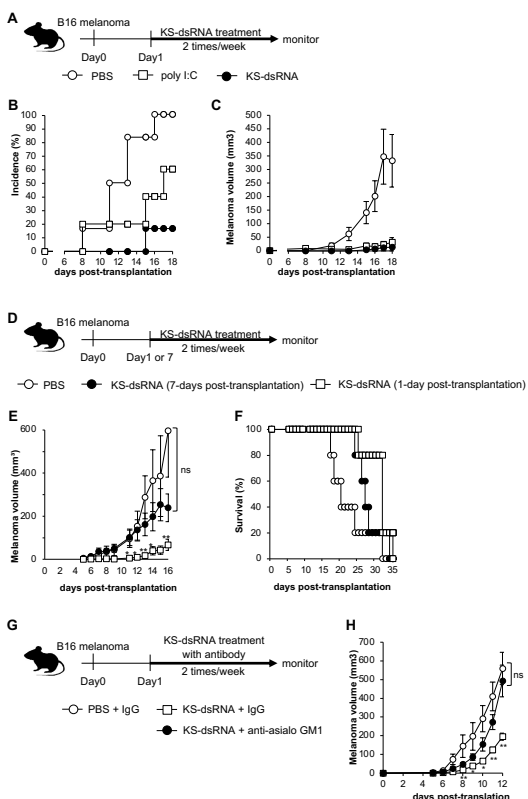


(4) B16 メラノーマ細胞の増殖への二重鎖 RNA の効果を検討した。Fig. 4A に示すように腫瘍の移植後 1 日目より二重鎖 RNA を投与開始し、腫瘍の生着 (Fig. 4B) 及び腫瘍の体積 (Fig. 4C) について検討した。その結果、植物由来二重鎖 RNA は抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。その効果は合成二重鎖 RNA である poly I:C より強い傾向が認められた。

次に腫瘍の移植後 1 日及び 7 日からの二重鎖 RNA の投与の効果について検討した (Fig. 4D)。抗腫瘍効果は移植 1 日後からの二重鎖 RNA 投与が強く、移植後 7 日からの投与では効果が弱くなることを示された (Fig. 4E, F)。

二重鎖 RNA の抗腫瘍効果を腫瘍抗原に対する抗体である anti-asialo GM1 との比較試験を行なった (Fig. 4G)。二重鎖 RNA の抗腫瘍効果は腫瘍に対する抗体よりも強いことが認められた (Fig. 4H)。

Fig.4



以上の結果は植物由来の二重鎖 RNA は抗ウイルス効果、ワクチンアジュバント効果、抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。本研究の成果によって、非感染性の二重鎖 RNA を応用したウイルス感染の予防法への応用の可能性が強く示された。

<引用文献>

Hajake, T. et al. (2019). Broad and systemic immune-modulating capacity of plant-derived dsRNA. *International Immunology* 31, 811. doi:10.1093/intimm/dxz054

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hajake T, Matsuno K, Kasumba DM, Oda H, Kobayashi M, Miyata N, Shinji M, Kogure A, Kasajima N, Okamatsu M, Sakoda Y, Kato H, Fujita T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Broad and systemic immune-modulating capacity of plant-derived dsRNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 811-821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------