

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16184

研究課題名（和文）インフルエンザウイルス免疫応答におけるエピジェネティック制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of epigenetic regulation in immune responses against influenza virus infection

研究代表者

西岡 敬介（Nishioka, Keisuke）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50790713

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）：同一の遺伝的背景を持つ複数の呼吸器上皮細胞株を用いることでインフルエンザウイルス感染におけるエピジェネティックステートの関与を直接評価することができ、特定部位のエピジェネティックステートがインフルエンザウイルス感染に影響することが明らかになった。IFN- β のプロモーター領域の脱メチル化はIFN- β 産生を促進し、ウイルス感染に対する感染防御を誘導した。他にも関与する領域があると考えられ、エピジェネティックステートの変化の誘導が、感染症予防に貢献できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザは毎年ワクチン接種が大規模に行われているものの、冬季には多数の患者が発生し、重症化すると多くのケースで致死率が高い呼吸器疾患を続発する。そのため重症化に関与する因子の解明は重要な課題である。本研究の成果は、生活習慣でも変化するエピジェネティックステートがウイルスに対する感染防御を誘導することが示唆されており、今後特定部位のエピジェネティックステートの変化を誘導することで新規の感染症予防法確立へ貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The involvement of epigenetic states in influenza virus infection was evaluated using multiple respiratory epithelial cell lines with same genetic backgrounds and epigenetic states at specific sites affected influenza virus infection was revealed. Demethylation of the IFN- β promoter region promoted IFN- β production and induced protection against viral infection. Other regions may be involved, suggesting that induction of changes in the epigenetic state can contribute to the prevention of infectious diseases.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは通常は数日で治癒するが、重症化すると下気道の肺炎や、それに続発し致死率 40%に至る急性呼吸促拍症候群を発症する。特に高病原性鳥インフルエンザからは高率で急性呼吸促拍症候群が続発するため、パンデミック発生時に備え重症化メカニズムの解明は急務である。これまでにインフルエンザウイルス(IFV)亜型間の病原性の違いについては盛んに研究が行われており、IFV 自体のシアル酸レセプター結合性の違いや、他の遺伝子のアミノ酸変異が病原性の高さに関与することが見出されている。一方で、同じ亜型でも患者により症状が軽症のまま治癒する場合、重症化する場合がある。これは免疫応答の違いによると考えられるが、患者の遺伝的背景、成育環境、生活習慣が異なるため原因となる関連因子の解明は非常に困難であり、未解明な部分が多い。リスク因子の研究では、肥満や糖尿病が重症化に関与することが示されており、エピジェネティックな変化を誘導する生活習慣が重要であることが示唆されている。実際に、健常者の肺上皮細胞 40 検体における解析では、BMI30 以上のドナーにおいて IFV への感受性が高く、ドナーごとにサイトカイン産生が異なっていることが報告されている(Travanty et al. Journal of Virology 2015)。また、Wu らの報告では、喫煙者の気管支上皮細胞は IFV 感染時の各サイトカイン産生量が非喫煙者と比較し著しく低く、臨床応用されているエピジェネティック薬である 5-aza-2'-deoxycytidine を処理すると、レスキューされることが報告されている(Wu et al. Respiratory Research 2016)。これら報告は、IFV 感染応答におけるエピジェネティック状態の重要性を示しているが、5-aza-2'-deoxycytidine はゲノム全域に DNA 脱メチル化を誘導する薬剤であり、特定の遺伝子のエピジェネティック状態がインフルエンザウイルス感染の免疫応答にどのように関与するかわかっていない。また、患者ごとの遺伝的背景の違いからエピジェネティック状態のみの関与の評価を行うことは困難である。

2. 研究の目的

IFV 感染において、宿主のエピジェネティック状態の関与が示唆されるが不明な部分が多い。当教室では遺伝的背景が同一なヒト呼吸器上皮細胞から IFV への感受性が株間で異なる約 70 クローンの細胞株を樹立している(Daidoji et.al. Journal of Biological Chemistry 2015)。上記の報告では、IFV を高濃度で感染した時の感受性であったが、低濃度での感染においても感受性の違いがみられたことから、株により細胞自体のウイルス増殖抑制能と周囲細胞への感染防御誘導能が異なっていることを示している。そこで本研究では、これら細胞株間での免疫応答の違いとエピジェネティック状態の関与を明らかにすることを目的とした。これまでに同一の遺伝的背景をもつ複数の細胞株においてエピジェネティック制御の関与を調べた報告はなく、これら細胞株を用いることで遺伝子発現変化とエピジェネティック制御の関係を直接評価することができる。

3. 研究の方法

本研究は 1) IFV 感受性試験、2) 遺伝子発現解析、3) プロモーターメチル化解析、4) 脱メチル化処理、5) 脱メチル化処理後細胞の IFV 感受性試験の 5 つのステップにて推進した。

1) IFV 感受性試験 5) 脱メチル化処理後細胞の IFV 感受性試験

樹立した複数の呼吸器上皮細胞株に MOI (multiplicity of infection) = 1 または 0.1 で季節性 IFV (H1N1: A/Beijing/262/95, H3N2: A/Panama/2007/99)を感染した。MOI = 1 で感染した培養細胞は感染 16 時間後に回収し、フローサイトメトリーにて IFV タンパク陽性細胞割合を測定した。MOI = 0.1 で感染した実験系では培養上清を、12, 24, 48, 72, 96 時間後に回収し、上清中に含まれる IFV 遺伝子コピー数を Real-time RT-PCR で定量した。また、サイトカイン測定も行いコピー数の違いがサイトカイン産生量に依存するか評価を行った。

2) 遺伝子発現解析

IFV 感受性に違いが見られた呼吸器細胞株について、ウイルス感染時に応答する主要なウイルスセンサー、転写因子、サイトカインに着目し、それぞれ遺伝子発現量を季節性インフルエンザ感染または非感染時において Real-time RT-PCR にて評価した。

3) プロモーターメチル化解析

発現量が大きく異なっていた遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンシングにて解析した。

4) 脱メチル化処理

5-aza-2'-deoxycytidine を用いてゲノム全体の脱メチル化処理を行った。特異的部位における脱メチル化処理には、CRISPR-Cas9 系を応用した方法を用いた(Liu et al. Cell 2016)。

4. 研究成果

同一の遺伝的背景をもつ複数の細胞株を用いて IFV 感受性試験を行ったところ、MOI = 0.1 で感染させた IFV 感受性試験では、ウイルス複製割合が異なり多様な感受性を示した。遺伝的背景が同一のため遺伝子発現様式がエピジェネティックステートに依存するこれらの細胞株のうち高感受性細胞株 1A5 細胞と低感受性株の 28E10 細胞の 2 種の細胞を選定し以降の実験に用いた。これら 2 種の細胞株はウイルス複製割合は異なるものの、MOI = 1 で感染させた際には IFV タンパク陽性細胞割合に差がなく、感受性の差は 2 次感染以降であることが考えられた。初期感染時に呼吸器上皮細胞から産生されるサイトカイン測定の結果、1A5 細胞は IFN- β 産生が 28E10 細胞に対して著しく低いことがみられ、これが感受性の違いの一因であることが示唆された。続いてこれら細胞にゲノムワイドに脱メチル化処理を行うと、複製ウイルスが抑制されることが見られた。この脱メチル化は IFN- β 産生を誘導し 1A5 細胞においても、その産生量は感染防御能を誘導するのに十分な量だった。これら結果はウイルス感染後、IFN- β 産生までのシグナル伝達強度の差が、これら細胞株間の感受性の差に影響することを示しており、脱メチル化は感染防御能の誘導に有効であることが示唆された。そこで、これらシグナルパスウェイにおけるウイルスセンサー、転写因子、サイトカインの発現量を評価したところ、*TLR3*, *IRF7*, *IL-1 β* , *IL-6*, *IFN- β* 遺伝子発現が 28E10 細胞で大きく高いことが見られた。そのため、これら遺伝子のプロモーター部の DNA メチル化ステートを解析した。1A5 細胞と 28E10 細胞で比較したところ、IFN- β の-270、IRF7 の-411 に位置する CpG メチル化割合が 1A5 細胞で高いことがみられた。また IFN- β の+21, +54, +64、IRF7 の-578--316 の CpG ではどちらの細胞も高メチル化状態であることが観察された。その他の遺伝子に関しては低メチル化状態であり、メチル化ステートに差はなかった。CpG メチル化ステートは両細胞間ではほとんど同様であることが見られた。次に、差がみられた IFN- β の-270、IRF7 の-411 に位置する CpG および高メチル化状態の IFN- β の+21, +54, +64、IRF7 の-578--316 の CpG を標的とした脱メチル化処理を CRISPR-Cas9 系を用いて行った。gRNA 濃度に依存して、IFN- β の+21, +54, +64 で脱メチル化がみられ、処理後には IFN- β mRNA の発現上昇が見られた。この脱メチル化は最大で 30 %程度誘導されたが、gRNA のトランスフェクションにおける細胞毒性が強く、高濃度の使用は困難であることが観察された。しかしながら特定部位の脱メチル化処理が IFN- β 産生を誘導したため、インフルエンザ感染防御能を向上させる可能性が見られた。そこで、細胞毒性を抑えるために核酸の導入量を抑えたところ、IFN- β の+21, +54, +64 への脱メチル化の程度は減弱し高々 5 %程度の低下に留まったが、脱メチル化処理後の IFN- β mRNA 発現は上昇し、インフルエンザウイルス感染後の複製ウイルスコピー数の低下が見られた。ウイルス感染 24 時間後の IFN- β mRNA 発現量は 1A5 細胞では対照群と差がなく、28E10 細胞では脱メチル化処理群で低下した。一方、IFN- β タンパク発現量は 1A5 細胞では対照群と比較し増加し、28E10 細胞では低下した。また、脱メチル化処理後、ウイルスを感染せずに 3 日間培養を行ったところ、28E10 細胞では mRNA 発現上昇が維持されており、上清中のタンパク質も検出された。以上から、IFN- β の+21, +54, +64 への脱メチル化は、感染前後におけるタンパク質発現誘導へ寄与することが示唆された。またこれらと同様の実験を遺伝的背景が異なる呼吸器上皮細胞株の A549 細胞、HEp-2 細胞においても行った。A549 細胞では複製ウイルス数は増加したが、HEp-2 細胞では抑制が見られた。遺伝的背景が異なる一部の細胞でも同様の反応が見られたことから、特定の CpG メチル化ステートの変化により、ウイルス感染防御が誘導されることが示唆された。1A5 細胞と 28E10 細胞はウイルス感染防御に関する遺伝子群の多くで発現が異なっており、他にも同様の影響を示す部位があると考えられる。これら結果から、承認が進んでいるエピジェネティック薬を用いることでウイルス感染症の増悪を抑制できる可能性や、CRISPR-Cas9 系を用いた宿主の免疫防御能の向上の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishioka Keisuke, Kyo Michihito, Nakaya Takaaki, Shime Nobuaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Proteins produced by Streptococcus species in the lower respiratory tract can modify antiviral responses against influenza virus in respiratory epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 104764 ~ 104764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micinf.2020.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kyo Michihito, Nishioka Keisuke, Nakaya Takaaki, Kida Yoshiko, Tanabe Yuko, Ohshimo Shinichiro, Shime Nobuaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Unique patterns of lower respiratory tract microbiota are associated with inflammation and hospital mortality in acute respiratory distress syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-019-1203-y	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 -

1. 著者名 Nishioka Keisuke, Daidoji Tomo, Nakaya Takaaki	4. 巻 520
2. 論文標題 Demethylation around the transcriptional start site of the IFN- gene induces IFN- production and protection against influenza virus infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 269 ~ 276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.09.136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西岡 敬介
2. 発表標題 インフルエンザウイルス免疫応答に関与するエピジェネティック状態の解析
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------