

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591259

研究課題名（和文） 2 本鎖 RNA による抗 RS ウイルス作用に関する研究

研究課題名（英文） Antiviral effect of double-stranded RNA on respiratory syncytial virus infection.

研究代表者

永井 和重 (NAGAI KAZUSHIGE)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：503471682

研究成果の概要：RNA ウイルスが感染細胞内で複製する際に 2 本鎖 RNA が形成され、細胞内にはこの 2 本鎖 RNA を認識し抗ウイルス作用を現す受容体が存在する。本研究では呼吸器感染ウイルスである RS ウイルス感染細胞に合成 2 本鎖 RNA(poly(I:C))を添加してその抗 RSV 作用を検討した。結果は、poly(I:C)を RSV 感染 24 時間前、感染直後、及び感染 24 時間後に培養液中に添加したところ、培養液上清中の RSV 量は有意に減少し、2 本鎖 RNA の抗 RSV 作用が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、ウイルス、感染症、免疫学

1. 研究開始当初の背景

RS ウイルス (RSV) はパラミクソウイルス科、ニューモウイルス属に分類されるマイナス 1 本鎖 RNA ウイルスである。RSV は主に冬季に流行する急性呼吸器感染症の代表的な病原ウイルスで、熱帯地域を含めた世界各地での流行が報告されている。1 歳までの

乳児の約半数、そして 2 歳までの乳幼児のほぼ全員が一度は RSV に感染すると言われている。RSV に対する母親由来の移行抗体や RSV 感染後に作られる中和抗体は RSV 感染を完全に阻止することは出来ず、生涯に何度でも感染する。RSV は乳幼児においては細気管支炎や肺炎などの重篤な下気道感染を

起こすことがある。特に低出生体重児や先天性心疾患、慢性肺疾患、免疫不全などの基礎疾患を有する小児が RSV に感染すると症状が重篤化しやすい。また乳幼児期に RSV に感染した小児がその後反復する喘鳴を呈することから、RSV 感染が気管支喘息の発症要因となる可能性が示唆されている。RSV 感染に対して未だに有効なワクチンは開発途上にあり、また RSV 感染予防に実用化されたヒト化抗 RSV モノクローナル抗体（パリビズマブ）は高価で適応に限られるという欠点を持つ。RSV はインフルエンザと並んで冬季に流行する代表的な呼吸器感染ウイルスであり、RSV 感染の病態解明と有効な予防・治療手段の基礎的な研究開発は、小児感染症領域にとって極めて重要な課題である。

病原微生物から生体を守る免疫機構は、自然免疫と獲得免疫の2つに大別される。獲得免疫は T 細胞、B 細胞を中心とした生体の防御機構であるが、これらの細胞が効果を現すには感染から数日を要する。一方自然免疫は病原体の構成成分（パターン）を認識し、感染初期に病原体を排除するという感染防御の最前線に位置している。自然免疫のパターン認識受容体のうち、広範囲に病原微生物を認識する Toll 様受容体（Toll-like receptors: TLRs）が発見され、自然免疫の中心的な役割を担うことが明らかとなった。現在ヒトでは 10 種類の TLRs が見つかっており、細菌、真菌、ウイルスなど各種病原微生物に対応している。

ウイルス核酸を認識する TLRs として TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 が知られている。TLR3 は 2 本鎖 RNA を認識し、I 型インターフェロン(IFN)やサイトカインカスケードを活性化させることで抗ウイルス作用を現すことが想定されている。TLR3 は樹状細胞内のエンドソームや各種器官の上皮細胞表面に発現している。TLR3 が実際に抗ウイルス作用を現すか否かを検討する研究が報告されているが、ウイルスの種類によりその結論は大きく異なる。一方近年細胞質内に存

在する 2 本鎖 RNA を認識する受容体として retinoic-acid-inducible protein I (RIG-I) が同定され、RNA ウイルス感染時に I 型 IFN カスケードを誘導することにより生体の感染防御に関与していることが明らかにされた。

2. 研究の目的

本研究では 2 本鎖 RNA が RSV 感染細胞に対して抗ウイルス作用を現すか、in vitro での実験で検討することを目的とした。具体的には以下の 2 項目について検討行なうこととした。

(1) 上皮系培養細胞における 2 本鎖 RNA 添加による抗 RSV 作用の検討

RSV に感受性のある上皮系細胞である HeLa 細胞に RSV を感染させ、合成 2 本鎖 RNA の polyribonucleosinic:polyribocytidylic acid (polyI:C)を培養上清に添加して培養を継続し、培養上清中の RSV 量が polyI:C 添加群において非添加群よりも減少しているかを定量的に求める。

(2) 2 本鎖 RNA による抗 RSV 作用への I 型 IFN の関与について

PolyI:C による抗 RSV 作用が認められた場合、その作用は polyI:C が I 型 IFN (特に INF-β)を誘導した結果であるかを検討する。RSV 感染細胞内での IFN-β mRNA 発現量を polyI:C 添加群と非添加群で比較する。

3. 研究の方法

(1) RSV 感染上皮細胞に対する poly I:C の抗 RSV 作用の検討

RSV 感染に感受性のあるヒト上皮系培養細胞である子宮頸癌由来 HeLa 細胞を 24 ウェルプレート上に培養し、RSV Long 株を MOI=0.5 で感染させた。RSV 感染 24 時間前、感染直後、及び感染 24 時間後に polyI:C (Amersham)を 20μg/ml の濃度で添加した。RSV 感染 48 時間後に、細胞培養上清より viral RNA を QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen)にて抽出し、感染細胞からは total RNA を RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出した。培養上清中の RSV 量は

TaqMan real-time RT-PCR (Applied Biosystems)にて定量的に求めた。定量化のための標準プラスミド pCR2.1-Long は TOPO TA Cloning (Invitrogen)を使用して作成した。感染細胞中の RSV N 蛋白 mRNA 発現は、GAPDH mRNA 発現を内在コントロールとして 20x GAPDH mixture (Applied Biosystems)を使用し real-time RT-PCR による相対定量法で検討した。

(2) PolyI:C による抗 RSV 作用に対する I 型 IFN の関与について

上記の polyI:C 刺激 RSV 感染 HeLa 細胞における IFN- β mRNA 発現を real-time RT-PCR で定量した。20x IFN- β mixture (Applied Biosystems) と 20x GAPDH mixture を使用し相対定量法にて検討した。

(3) 統計処理

同一のウイルス感染実験を 3 ウェルで行い、2 群間の有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。データは平均 \pm 標準誤差で表した。

4. 研究成果

(1) 2 本鎖 RNA 刺激による抗 RSV 作用

RSV 感染 HeLa 細胞培養上清に polyI:C を A)感染 24 時間前、B)感染直後、そして C)感染 24 時間後に添加して非添加細胞群と比較したところ、それらのいずれにおいても polyI:C 添加群では培養上清中の RSV コピー数が有意に減少していた (図 1 A, B, C)。

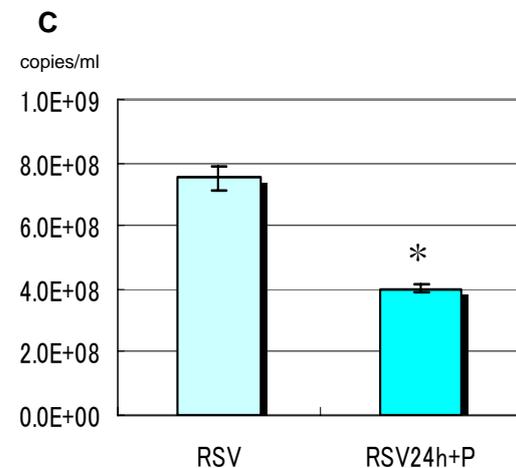
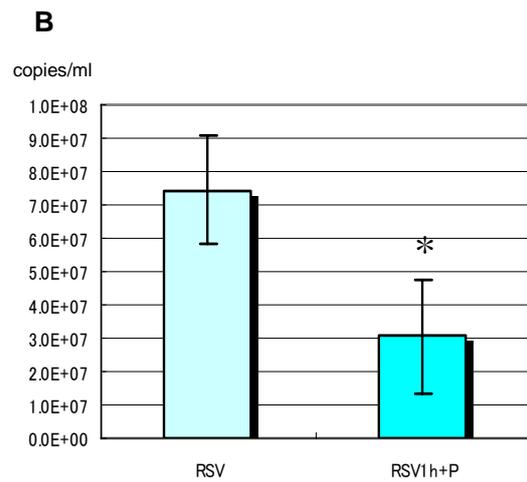
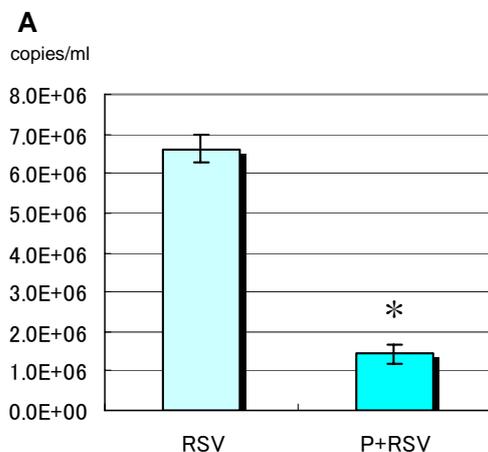


図 1. PolyI:C 添加による RSV 感染 HeLa 細胞培養上清中の RSV 産生抑制作用。A, RSV 感染 24 時間前に polyI:C 添加 (P+RSV)、B, RSV 感染直後に polyI:C 添加 (RSV1h+P)、C, RSV 感染 24 時間後に polyI:C 添加 (RSV24h+P)。*, $p < 0.05$ 。

次に上記の各感染細胞における RSV の N 蛋白 mRNA 発現量を real-time RT-PCR にて定量した。結果は培養上清中の RSV コピー数と同様に、いずれの polyI:C 添加パターンにおいても polyI:C 添加により N 蛋白 mRNA 発現量は非添加感染細胞群の 40~60% に低下していた (図 2 A, B, C)。

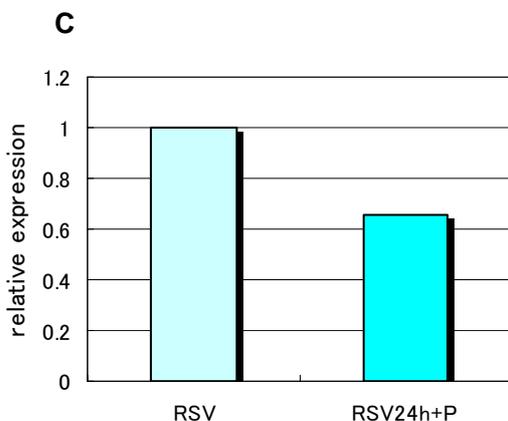
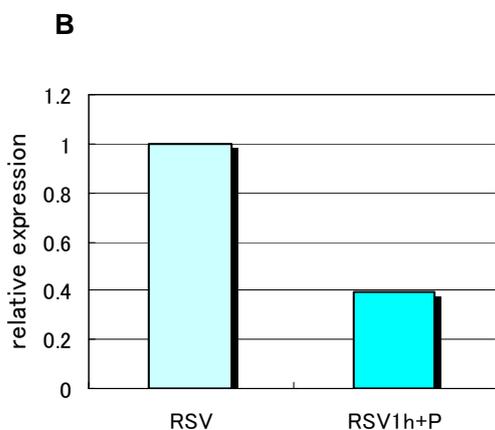
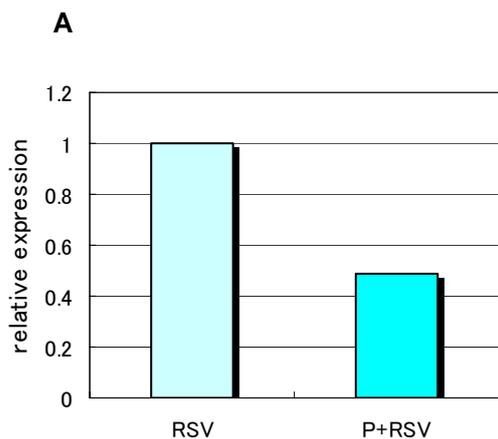
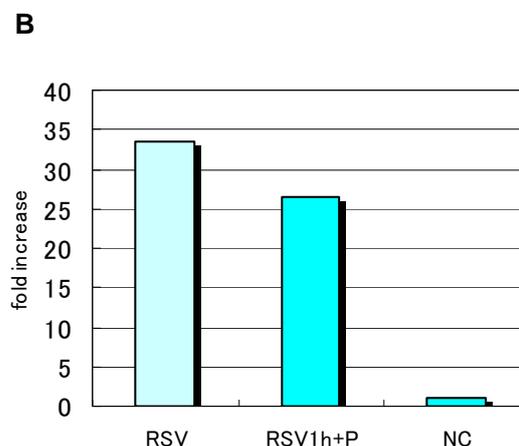
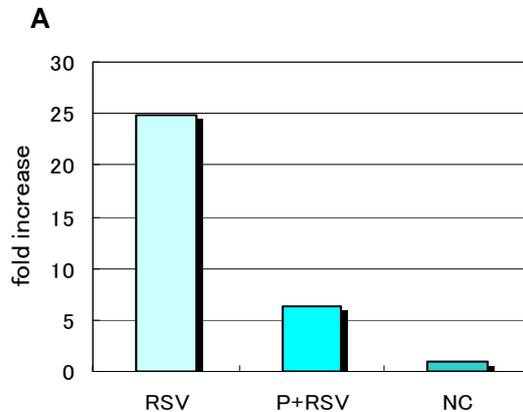


図2. PolyI:C 添加による RSV 感染 HeLa 細胞における RSV N 蛋白 mRNA 発現抑制。A, RSV 感染 24 時間前に polyI:C 添加 (P+RSV)、B, RSV 感染直後に polyI:C 添加 (RSV1h+P)、C, RSV 感染 24 時間後に polyI:C 添加 (RSV24h+P)。

(2) 2 本鎖 RNA 刺激による RSV 産生抑制と IFN- β の mRNA 発現

RSV 感染細胞に 2 本鎖 RNA を添加することにより RSV の産生が抑制されたことから、2 本鎖 RNA を認識した受容体のシグナル伝達により I 型 IFN が誘導されて抗 RSV 作用が現れたことが推定された。これまでの報告や我々の実験から、RSV 感染上皮系細胞からは I 型 IFN の中でも主に IFN- β が産生されることが明らかとなっている。そこで上記のプロトコールに従い polyI:C 添加を添加した RSV 感染 HeLa 細胞における IFN- β mRNA 発現量の差異を real-time RT-PCR により定量して検討した。

結果は、予想に反して、いずれの polyI:C 添加群においても非添加群に比べて明らかに IFN- β mRNA 発現量が低下していた (図 3 A, B, C)。ただし RSV 非感染 polyI:C 非添加細胞 (NC) 群との比較では polyI:C 添加群の IFN- β mRNA 発現量は 10 倍以上の増大を示していることから、これらの IFN- β mRNA 発現量は細胞に感染している RSV 量に依存している可能性が考えられた。



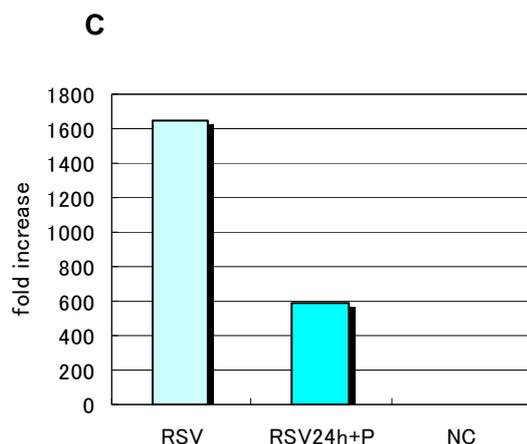


図3. PolyI:C 添加による RSV 感染 HeLa 細胞における IFN- β mRNA 発現量の比較。A, RSV 感染 24 時間前に polyI:C 添加 (P+RSV)、B, RSV 感染直後に polyI:C 添加 (RSV1h+P)、C, RSV 感染 24 時間後に polyI:C 添加 (RSV24h+P)。NC, RSV 非感染 polyI:C 非添加細胞。

今回の研究で上皮系培養細胞において 2 本鎖 RNA が RSV 感染に抑制的に作用することが明らかとなった。この 2 本鎖 RNA の抗 RSV 作用への IFN- β の関与を更に詳細に検討するには、今後 RSV 感染早期における経時的な IFN- β 発現量の変化を調べる必要がある。更にこの 2 本鎖 RNA を認識する受容体のいずれがこの抗 RSV 作用を媒介しているか、詳細なシグナル伝達機構を解明することが今後の課題である。

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 4 件)

- ① 永井和重、RS ウイルスと経路別予防策の考え方、感染対策 ICT ジャーナル、3 巻、180-184 頁、2008 年、査読無
- ② 永井和重、RS ウイルスの施設内伝播予防策、小児感染免疫、20 巻、503-506 頁、2008 年、査読有
- ③ 永井和重、インフルエンザウイルスと抗インフルエンザ薬、小児看護、31 巻、28-34 頁、2008 年、査読無
- ④ 永井和重、堤裕幸、RS ウイルス感染症総論、小児科診療、70 巻、2237-2241 頁、2007 年、査読無

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 渡辺一人、RS ウイルス感染に対する TLR 3 の感染防御作用、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 27 日、岡山市
- ② 渡辺一人、永井和重、堤裕幸、RS ウイルス感染に対する TLR 3 の感染防御作用、第 40 回日本小児感染症学会総会学術集会、2008 年 11 月 15 日、名古屋市
- ③ 永井和重、RS ウイルス感染症の病態像、第 48 回日本臨床ウイルス学会、2007 年 6 月 2 日、富山市

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 永井和重、(株) 臨床医薬研究協会、こどもの感染症の診かた、2009 年、144-145 頁
- ② 永井和重、中外医学社、保護者に伝えたいこどもの病気・検査ポイント、2007 年、77-78 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 和重 (NAGAI KAZUSHIGE)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50347168

(2) 研究分担者

堤 裕幸 (TSUTSUMI HIROYUKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80217348

(3) 連携研究者

なし