

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390133

研究課題名(和文) 極性上皮細胞における麻疹およびインフルエンザウイルス増殖機構

研究課題名(英文) MECHANISMS FOR REPLICATION OF MEASLES AND INFLUENZA VIRUSES IN POLARIZED EPITHELIAL CELLS

研究代表者

竹田 誠 (MAKOTO TAKEDA)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長

研究者番号：40311401

研究成果の概要(和文)：本研究では、麻疹ウイルスの上皮細胞感染に関与する宿主因子、ならびにインフルエンザウイルスが上皮で効率良く増殖するための宿主因子を明らかにすることを目的とした。

麻疹ウイルスは、伝染力が最も強いウイルスのひとつであるが、これまで免疫系細胞に選択的に感染すると考えられてきた。しかし、最近のわれわれの研究から、麻疹ウイルスが、免疫系細胞に加えてtight junctionを形成する上皮細胞(極性上皮細胞)にも感染する能力を持つことが明らかになった。極性上皮細胞を間葉様の細胞へ変換する転写抑制因子Snailを発現させると、極性上皮細胞の麻疹ウイルスに対する感受性が消失した。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、Snailによって転写レベルが低下する宿主因子が約30種特定できた。

インフルエンザウイルスの増殖には、インフルエンザウイルスのHAタンパク質を開裂するプロテアーゼが必要である。最近の研究から膜タンパク型セリンプロテアーゼであるTMPRSS2は、HAタンパクを開裂することが示された。極性上皮細胞には、TMPRSS2が発現していることを明らかにした。さらにSnailの発現によって、TMPRSS2の発現が低下することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our aims in this study were identification of host factors for efficient replication of measles virus and influenza virus in epithelial cells. Previous studies have revealed that measles virus selectively infects cells of the immune system. However, we recently showed that epithelial cells that form tight junctions (polarized epithelial cells) were also susceptible to measles virus. The transcription repressor Snail causes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). When Snail was expressed, polarized epithelial cells lost the ability to support measles virus infection. Microarray analysis identified about 30 genes, whose expression levels were down-regulated by Snail-induced EMT. For influenza virus, cleavage of its HA protein was critical for replication. Recent studies showed that the transmembrane serine protease TMPRSS2 cleaves the HA protein. We showed that TMPRSS2 was expressed in polarized epithelial cells and supports influenza virus replication, and that its expression was down-regulated by Snail-induced EMT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	0	5,100,000
2010年度	4,400,000	0	4,400,000
総計	15,100,000	1,680,000	16,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学・病原性

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

体表面を覆う「表皮」、管腔臓器の粘膜を構成する「上皮」など、外界と接する組織は tight junction を形成する極性細胞で構成されている。すなわち、ウイルスにとって、極性上皮細胞に感染し、増殖する能力を持つことは、効率よくわれわれの体内に侵入し、さらに増殖した後、再び外界へと出芽・放出し、新たな個体に効率的に伝播・感染するために不可欠な能力である。しかしながら、極性上皮細胞におけるウイルス増殖の機構については、あまり研究が進んでいない。本研究では、社会的にも特に問題となっている麻疹とインフルエンザについて取り上げた。

麻疹は、国際的に小児死亡の大きな比率を占める感染症である。わが国でも、未だ多くの感染者が発生している。麻疹ウイルスは、極めて強い伝播力を持ち、その強い伝播力には、麻疹ウイルスの（特に呼吸器の）上皮系細胞での増殖性が重要な鍵となっていると考えられている。しかし、麻疹ウイルスは、CD150 という免疫細胞の分子を受容体として感染するとされ、CD150 が発現していない上皮系細胞での麻疹ウイルスの増殖のメカニズムは、全く分かっていない。最近われわれは、麻疹ウイルスが、効率よく感染する肺上皮系培養細胞株を同定することに世界で初めて成功した (Takeda et al., 2007)。また、麻疹ウイルスの受容体結合タンパク質 (H タンパク質) の X 線結晶構造解析に成功した (Hashiguchi et al. 2007)。

A 型インフルエンザウイルスは、本来は鴨などの水禽類を宿主としているが、ヒトを含む多くの哺乳動物に適応し病原性を発揮する。しかしながら、鴨のウイルスは、ヒトでの増殖性が非常に低く、一方、ヒトに適応したウイルスは、鴨では増殖しないなどインフルエンザウイルスは種特性が強い。にもかかわらず、A 型インフルエンザウイルスの研究は、主にはイヌの腎臓細胞である MDCK 細胞が用いられてきた (ヒトインフルエンザウイルスは、イヌに対しては全く病原性を持たない)。その理由は、単に経験上 MDCK 細胞が様々な株のインフルエンザウイルスに対して高い感受性を示すことが分かっているためであるが、その分子生物学的な理由は不明である。われわれは、ヒトインフルエンザウイルスの解析に相応しいと考えられるヒト極性上皮細胞を見つけ出すために、様々なヒト培養細胞を解析し、ヒトの肺癌由来のある極性上皮細胞株が、ヒトインフルエンザウイルスに対して極めて高い感受性を示すことを見出した。

2. 研究の目的

(1) 麻疹ウイルスが、特定の上皮系細胞株で効率良く増殖する理由 (分子メカニズム) を明らかにする。

(2) 麻疹ウイルスの上皮における増殖を促進する受容体や宿主因子を同定する。

(3) インフルエンザウイルスが、特定の上皮系細胞株で効率良く増殖する理由 (分子メカニズム) を明らかにする。

(4) インフルエンザウイルスの上皮における増殖を促進する受容体や宿主因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 麻疹ウイルスの様々な上皮細胞における増殖能を解析する。

(2) H タンパク質に対する様々なモノクローナル抗体の中和能の解析、ならびに X 線結晶構造解析 (立体構造解析) のデータから上皮細胞への結合に関わる H タンパク質上のアミノ酸残基の同定

(3) 麻疹ウイルスに感受性をもつ上皮細胞の cDNA ライブラリーを用いた受容体同定実験。麻疹ウイルス非感受性細胞に cDNA ライブラリーを導入し、GFP を発現する組換え麻疹ウイルスを感染させることにより、感受性を賦与する cDNA を特定する。

(4) 上皮細胞を間葉系細胞へ転換させる転写抑制因子 Snail による麻疹ウイルス感染性への影響、ならびに上皮細胞の遺伝子発現の変化をマイクロアレイを用いて解析する。

(5) インフルエンザウイルスの様々な上皮細胞における増殖能を解析する。

(6) インフルエンザウイルスの HA を開裂すると言われている TMPRSS2 の各種上皮系培養細胞における発現とインフルエンザウイルスの増殖性との相関を解析する。

(7) 上皮細胞を間葉系細胞へ転換させる転写抑制因子 Snail による TMPRSS2 の発現、ならびにインフルエンザウイルス増殖性への影響を解析する。

4. 研究成果

麻疹ウイルスが、H358 細胞に高い感受性を示すことが明らかになった。H358 細胞は、ヒトの肺癌に由来する腺癌細胞であり、肺組織にある Clara 細胞に特徴的な顆粒を持ち、肺サーファクタントを分泌していることが知られている。マイクロアレイによる遺伝子発現解析から、われわれは、NCI-H358 細胞が、tight junction 形成に関与するいくつかの分子を強く発現していることを見出し、その知見から麻疹ウイルスが、極性を保持したヒト

培養細胞に強い親和性を持つことを見出した（通常の多くの培養細胞が株化の過程で極性を失っている）。われわれは麻疹ウイルスの受容体結合蛋白であるH蛋白に対するモノクローナル抗体を数種作製し、NCI-H358細胞と、さらに、われわれが開発し、今では広く世界中の麻疹ウイルス研究者が利用する至った野生型麻疹ウイルス遺伝子操作技術（Takeda et al. 2000; Takeda et al. 2005; Nakatsu et al.; 2005）で作製したレポーター遺伝子発現ウイルスを用いることにより、麻疹ウイルスのH蛋白が、これまで知られていなかった新しい受容体結合部分を持ち、その結合部位を用いて上皮系細胞に感染することを明らかにした（Takeda et al., 2007）。さらに立体構造のデータ、組換え麻疹ウイルスによる感染実験、モノクローナル抗体のデータを併せて解析することにより、われわれは新規受容体結合に関わるアミノ酸残基の特定に成功した（Tahara et al. 2008）。

続いて宿主細胞が発現する転写抑制因子Snailを発現するとH358細胞や類似の細胞株であるII-18細胞の麻疹ウイルスに対する感染性が消失することを明らかにした。Snailを、II-18細胞に恒常発現させ、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、細胞接着やtight junction形成に関与する分子（CEACAM6, CD9, CDH1, CLDN3, CLDN7, CLDN8）や膜タンパク質輸送に関与する分子（RAB17, RAB25, RAB38, MAL2等）の発現が、Snailによって制御されていることが明らかになった（Shirogane et al. 2010）。

インフルエンザウイルスをMDCKなどの培養細胞で増殖させる場合には、インフルエンザウイルスのエンベロープ蛋白質HAをふたつのペプチドに開裂するプロテアーゼを添加することが必要であるが、Calu3, Caco-2, T84, HT29細胞など極性をもったヒト培養細胞株では、インフルエンザウイルスが、プロテアーゼの添加なしに極めて効率よく増殖することを証明した（未発表データ）。さらに、インフルエンザウイルスが、Calu3極性上皮細胞で効率よく増殖する理由は（1）プロテアーゼの添加が不要であること、（2）インフルエンザウイルスの遺伝子発現（ウイルス蛋白合成）が極めて効率的に行われるためであることを明らかにした（未発表データ）。これら極性細胞にSnailを発現させると上皮系細胞の性質を一部失い、間葉系細胞の性質を持つようになるが、それに伴い、TMPRSS2の発現が低下し、インフルエンザウイルスの増殖をサポートする能力が低下した。

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7件）

Tahara M, Takeda M, Shirogane Y, Hashiguchi T, Ohno S, and Yanagi Y. (2008) Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. *J Virol.* 82. 4630-4637.

Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro, N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, and Yanagi Y. (2008) Efficient Multiplication of Human Metapneumovirus in Vero Cells Expressing the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J Virol.* 82. 8942-8946.

Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Tsegaye TS, Takeda M, Bugge TH, Kim S, Park Y, Marzi A, and Pöhlmann S. (2009) Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol.* 83. 3200-11.

Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y. (2009) The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J Virol.* 83. 10374-10383.

Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, Ikegame S, Nakamura T, Yanagi Y. (2010) Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus. *J Biol Chem.* 27. 20882-90.

Ayata M, Takeuchi K, Takeda M, Ohgimoto S, Kato S, Sharma LB, Tanaka M, Kuwamura M, Ishida H, Ogura H. (2010) The F gene of the osaka-2 strain of measles virus derived from a case of subacute sclerosing panencephalitis is a major determinant of neurovirulence. *J Virol.* 84. 11189-99.

Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. (2010) Efficient activation of SARS coronavirus spike protein by the transmembrane protease, TMPRSS2. *J Virol.* 84. 12658-64.

〔学会発表〕(計16件)

Takeda M, Hashiguchi T, Tahara M and Yanagi Y. (2008 September. Awaji Island, Hyogo, Japan) Measles virus has an intrinsic ability to infect both immune and polarized epithelial cells via two distinctive mechanisms. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity.

Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro, N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, and Yanagi Y. (2008 September. Awaji Island, Hyogo, Japan) Human metapneumovirus grows efficiently in Vero cells expressing transmembrane serine protease TMPRSS2. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity.

Hashiguchi T, Takeda M, Maenaka K, and Yanagi Y. (2008 July. Ithaca, New York) Crystal structure of the measles virus hemagglutinin sheds light on its interaction with cellular receptors and antibodies. 27th Annual Meeting of American Society for Virology.

Takeda M, Shirogane Y, Tahara M, Hashiguchi T, Ikegame S, Iwasaki M, Nakamura T, Maenaka K, and Yanagi Y. (2010 June 21-25. Brugge, Belgium) Measles virus infects epithelial cells. Negative Strand Virus Meeting 2010.

Takeda M. (2010 July 12-13. Osaka, Japan) Molecular basis for efficient transmission of measles virus. International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology.

竹田誠、岩崎正治、池亀聡、田原舞乃、柳雄介、麻疹ウイルスの極性上皮細胞からの出芽機構、第45回 日本ウイルス学会九州支部総会、2008年10月、熊本

竹田誠、橋口隆生、田原舞乃、岩崎正治、池亀聡、柳雄介、麻疹ウイルスの極性細胞侵入および出芽機構、第56回 日本ウイルス学会、2008年10月、岡山

白銀勇太、竹田誠、岩崎正治、石黒信久、竹

内宏樹、中津祐一郎、田原舞乃、菊田英明、柳雄介、膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 はヒトメタニューモウイルスの多段階増殖を促進する、第56回 日本ウイルス学会、2008年10月、岡山

橋口隆生、竹田誠、田原舞乃、池亀聡、大野真治、柳雄介、麻疹ウイルスHタンパク質による受容体認識の構造基盤、第56回 日本ウイルス学会、2008年10月、岡山

竹田誠、柳雄介、麻疹ウイルス：病原性発現の分子基盤、第57回 日本ウイルス学会、2009年10月、東京

白銀勇太、竹田誠、橋口隆生、田原舞乃、中村崇規、柳雄介、上皮間葉転換の誘導によって極性上皮細胞の麻疹ウイルスに対する感受性がなくなる、第57回 日本ウイルス学会、2009年10月、東京

橋口隆生、尾瀬農之、上敷領淳、竹田誠、前仲勝実、柳雄介、麻疹ウイルスHタンパク質と受容体 SLAM の複合体の結晶構造と麻疹ウイルスの細胞侵入機構、第57回 日本ウイルス学会、2009年10月、東京

竹田誠、岡村晃資、白銀勇太、池亀聡、柳雄介、ワクシニアウイルスフリーの高効率麻疹ウイルス回収系、第57回 日本ウイルス学会、2009年10月、東京

竹田誠、白銀勇太、田原舞乃、中津祐一郎、橋口隆生、柳雄介、麻疹ウイルスの上皮細胞感染機構、第58回 日本ウイルス学会、2010年11月、徳島

關文緒、染谷健二、田原舞乃、中津祐一郎、駒瀬勝啓、竹田誠、麻疹ウイルスHタンパク質アミノ酸546番目のグリシン変異における上皮細胞への感染性および機能変化、第58回 日本ウイルス学会、2010年11月、徳島

中津祐一郎、鈴木忠樹、馬学旻、關文緒、駒瀬勝啓、柳雄介、竹田誠、イメージング技術を用いた麻疹ウイルスLタンパク質の細胞内動態の解析、第58回 日本ウイルス学会、2010年11月、徳島

〔図書〕(計5件)

Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, and Hashiguchi T. (2009) Measles virus receptors. Griffin,

D. E. and Oldstone, M. B. A. ed. Current Topics in Microbiology and Immunology 329. Measles history and basic biology. 13-30.

竹田誠、柳雄介（2009）パラミクソウイルス科、高田賢蔵（編）医科ウイルス学（改訂3版）南江堂、342-352。

竹田誠、柳雄介（2009）麻疹ウイルスの受容体とトロピズム、光山正雄、北潔、野本明男（編）感染症-ウイルス・細菌・寄生虫の感染戦略、羊土社、実験医学 27、128-134。

竹田誠、柳雄介（2009）感染現象 麻疹ウイルスの増殖戦略、木下タロウ、熊之郷淳、竹田潔、松浦善治、川端重忠（編）感染現象 その理解の深化から疾患制御への展望、共同出版、蛋白質核酸酵素 54、908-912。

關文緒、竹田誠（2010）麻疹ウイルス、分子予防環境医学研究会（編）改訂版 分子予防環境医学 生命科学研究の予防・環境医学への統合、本の泉社、210-217。

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 誠 (TAKEDA MAKOTO)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長
研究者番号：40311401

(2) 研究分担者
該当無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
該当無し ()

研究者番号：