

平成 23 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591208

研究課題名（和文） インターロイキン 27 と自然免疫応答のクロストークによるウイルス増殖抑制

研究課題名（英文） Suppression of viral replication and the innate immune response of interleukin 27

研究代表者

岸田 綱郎 (Tsunao Kishida)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00370205

研究成果の概要（和文）：

インターロイキン-27 (IL-27) は Th1 誘導に中心的な役割を果たすサイトカインであるが、抗ウイルス自然免疫応答への関与は知られていない。我々は IL-27 が心筋細胞に直接作用して encephalomyocarditis virus (EMCV) の感染および増幅を強力に抑制することを見出した。そのメカニズムとして、IL-27 シグナルが細胞内ウイルスセンサー分子の制御と、感染早期のインターフェロン誘導の増強に寄与することを明らかにした。本研究の成果は、新しいワクチンの開発などにつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Interleukin-17 (IL-27) plays a central role in induction of Th1 immune response, while its contribution to anti-virus innate immunity remains unknown. We found that IL-27 directly acts on cardiomyocytes and strongly inhibits infection and amplification of the encephalomyocarditis virus (EMCV). The antiviral activity of IL-27 is mediated through regulation of virus sensor molecules and acceleration of type I interferon induction. The present results may lead to development of a novel antiviral vaccine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・感染症内科学

キーワード：感染症治療学

1. 研究開始当初の背景

IL-27 は、p28 蛋白と、Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) のヘテロダイマーからなるサイトカインである。そのレセプターは WSX-1 と gp130 によって構成され、ナイーブ CD4 陽性細胞に発現している。IL-27 は Th1 免疫応答に必須の分子であり、ナイーブ CD4 陽性細胞に作用して Th1 分化の最初期段階を誘導すること、IL-12 と協調的にはたらいて IFN- γ の産生を促進することが知られている。また最近になって、IL-27 は Th1 系への影響のみならず、STAT1 依存的に Th-17 細胞を、また非依存的に制御性 T 細胞の分化を抑制することが報告されている。

これらの多彩な生理作用により、IL-27 は発癌、アレルギー、炎症など種々の病態に広く関わっている重要なサイトカインであると考えられている。しかしながら、ウイルス感染症における IL-27 の役割は、これまで報告されていない。

我々は IL-27 の新しい作用として、ウイルス感染に対する防御効果を世界に先駆けて見出した。すなわち、脳心筋炎ウイルス (EMCV) を感染させた C57BL/6 マウスに種々のサイトカイン遺伝子を *in vivo* 導入し、その後のマウスの生存を観察したところ、遺伝子非導入群生存率が有意に亢進した。この抗ウイルス効果の機序として、さまざまな *in vivo*、および *in vitro* の感染実験を行なって検討を加えた。

その結果、IL-27 は、獲得免疫機構を介するのではなく、ウイルス感染した心筋細胞に直接作用することによってウイルス複製を抑制する、非常にユニークなサイトカインであることが分かった。この知見は、IL-27 シグナルが、細胞内の何らかの抗ウイルス自然免疫応答機構とリンクしている可能性を示唆していた。

さらに、研究代表者らは、IL-27 シグナルが心筋細胞内に入力されると、MDA5 と RIG-I の発現が亢進し、ウイルス感染によって惹起される MDA5 パスウェイと RIG-I パスウェイの活性化が増強され、その結果、感染初期からの強力なインターフェロン産生の誘導と、

ウイルス複製の抑制がもたらさる可能性を示した。

2. 研究の目的

これまでの研究において、研究代表者らは最近、IL-27 シグナルが RIG-I/MDA5 の発現を亢進すること、I 型 IFN の産生を誘導すること、抗ウイルス作用を惹起することを見出した。しかしながら、IL-27 レセプターを介するシグナルが如何にして

RIG-I/MDA5 の発現誘導にリンクするのかに関しては、未だブラックボックスである。そこで本研究では、まずこのブラックボックスに関与する可能性が想定しうる既知の分子群について、分子生物学的手法によって解明する。

IL-27 刺激細胞、または非刺激細胞に、非感染、または EMCV を感染させて培養後、RNA と蛋白を調整する。WSX-1、gp130 下流のシグナル分子群である STAT1、STAT3、SOCS3、p38MAPK、T-bet、LFA-1、ERK1/2 の発現量の変化と活性化を、リアルタイム RT-PCR とウェスタンブロッティングをもちいて解析する。さらに、これらの分子をターゲットとした siRNA を、初代培養心筋細胞に導入後、EMCV を感染させることにより、IL-27 の抗ウイルス作用における各分子の貢献度を検証する。それらの結果を総合し、IL-27 が RIG-I/MDA5 を亢進させる細胞内シグナル伝達機構の理解につなげる。

3. 研究の方法

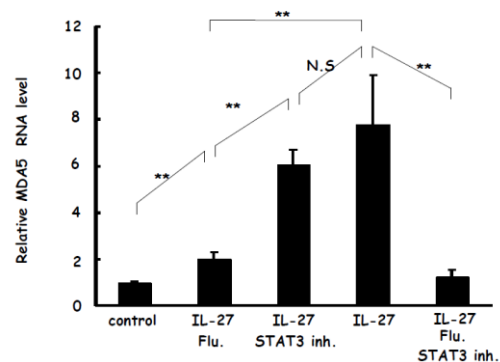
(動物) C57BL/6 マウス、SCID マウスは清水実験材料より購入し。京都府立医科大学の実験動物規定に基づいて SPF 環境で飼育した。(心筋細胞の採取) 妊娠 16 日目の C57BL/6 マウスから胎仔を採取。実体顕微鏡下で胎仔の心臓を摘出したのちトリプシン、ディスパーゼ処理して心筋細胞を回収した。(ウェスタンブロッティング) 総たんぱく質を Qproteome Mammalian Protein Prep Kit (Qiagen, Hilden, Germany). を用いて回収して、10% SDS ポリアクリルアミドゲルを用い

て電気泳動をおこなった。ゲル内のタンパクを PVDF メンブラン上にブロットしたのち抗マウス STAT1 抗体, 抗マウス pSTAT1 抗体 (pY701), 抗マウス STAT3 抗体, 抗マウス pSTAT3 抗体 (pS727) (BD Pharmingen, San Diego, CA). を用いて標識したのち、Chemiluminescent Western blot immunodetection kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), をもちいてシグナルを検出した。**(リアルタイム RT-PCR)** 細胞から totalRNA あるいは EMCV ウイルス RNA を Quick Gene SP kit (FujiFilm Tokyo Japan) を用いて回収した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied biosystems, Carlsbad, USA) を用いて逆転写反応を行い DNA を合成した。合成した DNA を鋳型として TaqMan プローブ (Applied biosystems) mMDA5 (Mn00459183_m1)、mIFN β (Mn00459183Mn00439546_s1)、EMCV (EMCV-ANY Lot516181) β -actin (Mm00607939-m1) と 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った。**(リコンビナント蛋白・代謝阻害試薬・抗体)** リコンビナントマウス IL-27 (R&D Systems, Inc Minneapolis, MN, USA) リコンビナントマウス IFN β (PBL Interferon Souse, Piscatway, USA)、Fludarabine (LKT Laboratories, Inc)、STAT 3 inhibitor (Carbiochem, La Jolla, USA)、抗 mouse IFN- α/β R2 抗体 (R&D Systems) **(ELISA アッセイ)** mouse IFN β ELISA kit (PBL Interferon Souse) を用いて、プロトコールに従って行った。**(siRNA の導入)** mMDA5 FlexiTube siRNA No. 1-No. 3 (Qiagen) をもちいて RNAiFect™ Transfection Reagent (Qiagen) を用いて細胞内に導入した。**(ブランクアッセイ)** EMCV を感染させた細胞を凍結融解したのち遠心上清を回収。上清を段階希釈し HeLa 細胞に添加。1%メチルセルロー

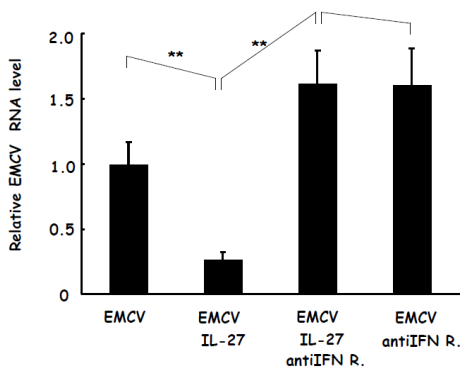
スを含む MEM 培地で 2 日間培養し、クリスタルバイオレットで染色してプラーク数をカウントした。

4. 研究成果

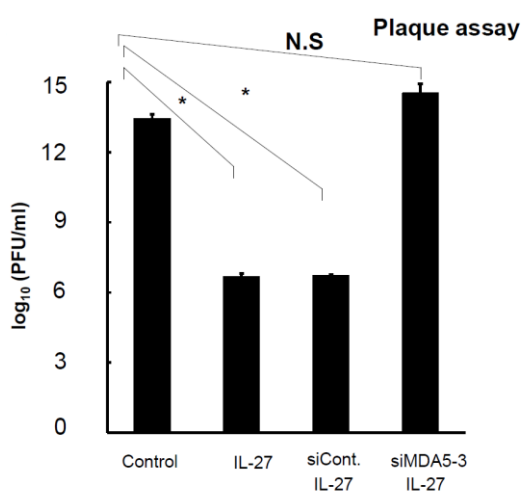
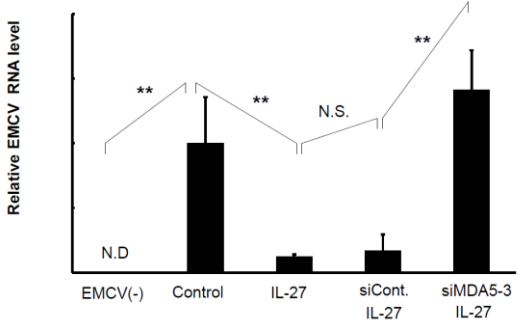
マウス・プライマリー心筋細胞をリコンビナントマウス IL-27 で刺激したのち MDA5 の発現をリアルタイム PCR を行った。その結果 MDA5 の発現が約 8 倍に亢進していた。さらに同様の系に 50 μ M の Fludarabine あるいは 50 μ M の STAT 3 inhibitor を添加した。その結果、Fludarabine を添加した群においては MDA5 の亢進が抑制されており、この事より IL-27 による MDA5 の亢進作用が STAT1 のリン酸化が必要であることが示された。



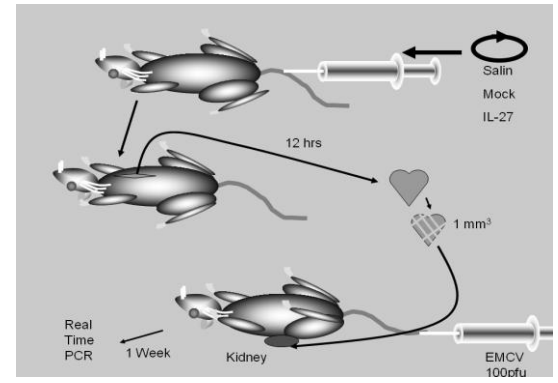
次に IL-27 によるウイルス抑制効果に対して I 型 IFN が関与しているか否かを検証する目的で IL-27 で刺激した心筋細胞を抗 mouse IFN- α/β R2 抗体存在下、あるいは非存在下において EMCV を 1.0moi の濃度で感染し 48 時間後にウイルスの濃度をリアルタイム RT-PCR を行って検証した。その結果抗 mouse IFN- α/β R2 抗体を添加した群では IL-27 によるウイルス増殖抑制効果は解除されていた。その結果より IL-27 の抗ウイルス効果は、I 型 IFN がメディエーターであることが示された。



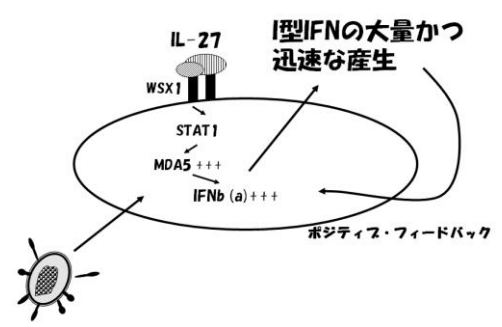
さらにIL-27のウイルス増殖抑制効果がMDA5を介しているか否かを検証する目的で、MDA5をターゲットとするsiRNAを設計し、その効果を検討した。MDA5をターゲットとするsiRNAを導入した心筋細胞をIL-27で刺激したのちEMCVを感染させ、48時間後にリアルタイムPCRとプラークアッセイを行った。その結果、IL-27のウイルス増殖抑制効果は解除されていた。それらの結果よりIL-27の抗ウイルス効果はMDA5を介していることが示された。



そこで、IL-27をマウスに投与したのち心臓を摘出し、細切し1mm³の組織片をドナーマウスの腎臓被膜下に移植した。その後ドナーマウスにEMCVを100pfuを尾静脈から感染させて移植した心筋片とドナーマウスの心臓のEMCVの増殖をリアルタイムRT-PCRで検討した。その結果、ドナーマウスの心筋と比較して移植片ではウイルス増殖抑制が認められた。この事よりIL-27の抗ウイルス効果は、免疫を介さなくてもIL-27が心筋細胞を直接刺激することによって発揮されることが示された。



MDA5はIL-27シグナルによって発現誘導され、ウイルス感染によって惹起されるMDA5パスウェイの活性化の増強につながることで、その結果、感染初期からの強力なI型インターフェロン産生の誘導と、ウイルス複製の抑制がもたらされることを明らかにした。



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 11 件)

- 1) Tamagawa-Mineoka R, Kishida T, Mazda O, Katoh N. IL-21 Reduces Immediate Hypersensitivity Reactions in Mouse Skin by Suppressing Mast Cell Activation or IgE Production. *J Invest Dermatol.* (in press) (査読有)
- 2) Yoshimoto K, Kishida T, Nakano Hi, Matsui M, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Takeuchi M, Hisa Y, Mazda O*. Interleukin-28B acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck squamous cell carcinoma. *J Immunother.* 34 (2): 139-148, 2011. (査読有)
- 3) Hiraoka N*, Takahashi KA, Arai Y, Sakao K, Mazda O, Kishida T, Honjo K, Tanaka S, Kubo T. Intra-articular injection of hyaluronan restores the aberrant expression of matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritic subchondral bone. *J Orthop Res* 29 (3): 354-360, 2011. (査読有)
- 4) Nakai N, Kishida T, Hartmann G, Katoh N, Imanishi J, Kishimoto S, Mazda, O.* Mitf silencing cooperates with IL-12 gene transfer to inhibit melanoma in mice. *Int Immunopharmacol.* 10 (4): 540-545, 2010. (査読有)
- 5) Shinoda M, Shin-Ya M*, Naito Y, Kishida T, Ito R, Suzuki N, Yasuda H, Sakagami J, Imanishi J, Kataoka K, Mazda O*, and Yoshikawa T. Early-stage blocking of Notch signaling inhibits the depletion of goblet cells in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Gastroenterol.* 45 (6): 608-617. 2010. (査読有)
- 6) Nakai N*, Katoh N, Germeraad WT, Kishida T, Ueda E, Takenaka H, Mazda O, Kishimoto S. Immunohistological analysis of peptide-induced delayed-type hypersensitivity in advanced melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination. *J. Dermatol. Sci.* 53 (1): 40-47, 2009. (査読有)
- 7) Inoue A, Takahashi KA*, Mazda O, Arai Y, Saito M, Kishida T, Shin-Ya M, Morihara T, Tonomura H, Sakao K, Imanishi J, Kubo T. Comparison of anti-rheumatic effects of local RNAi-based therapy in collagen induced arthritis rats using various cytokine genes as molecular targets. *Mod Rheumatol.* 19 (2): 125-133, 2009. (査読有)
- 8) Sakao, K., K.A. Takahashi*, Y. Arai, M. Saito, K. Honjo, N. Hiraoka, H. Asada, M. Shin-Ya, J. Imanishi, O. Mazda, and T. Kubo. Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8 and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis. *J Bone Miner Metab.* 27 (4): 412-423, 2009. (査読有)
- 9) Matsui M, Kishida T, Nakano H, Yoshimoto K, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Yoshimoto T, Hisa Y, Mazda O.* Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* 69 (6): 2523-2530. 2009. (査読有)
- 10) Hasegawa U, Sawada SI, Shimizu T, Kishida T, Otsuji E, Mazda O, Akiyoshi K*. Raspberry-like assembly of cross-linked nanogels for protein delivery. *J Control Release.* 140 (3): 312-317, 2009. (査読有)
- 11) Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Iwakura Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Kataoka K, Mazda O.* Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 377 (1): 12-16. 2008. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Kishida T, Nakai N, Matsui M, Yoshimoto K, Nakano H, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Hisa Y, Katoh N, Mazda O. Gain-of-function and loss-of-function analyses in vivo of transcriptional factor and cytokine genes using Epstein-Barr virus-based episomal vectors, and their implication to novel strategies of gene therapy and regenerative medicine. 2010 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) (Nagoya), Nov 8-9, 2010.
- 2) 岸田綱郎、菅井 学、清水 章、今西二郎、横田義史、松田 修. IL-21 の多彩な in vivo 生理活性と分子病態制御への応用. 免疫カンファレンス (京都), 2009 年 11 月 21 日.
- 3) 岸田綱郎、菅井 学、清水 章、今西二郎、横田義史、松田 修. IL-21 は B 細胞に inhibitor of differentiation 2 発現を誘導してアレルギーを抑制する 第 38 回日本免疫学会 (京都), 2008 年 12 月 1-3 日.
- 4) 広村弥生、岸田綱郎、安田 誠、濱雄光、松田 修、久 育男. IL-21 によるマウスにおけるアナフィラキシー抑制効果. 第 57 回日本アレルギー学会 (東京), 2008 年 11 月 28 日.
- 5) Hiromura Y, Kishida T, Nakano H, Hama T, Mazda O, Hisa Y. IL-21 administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis. The 12th Japan-Korean joint meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. (Nara) April 5, 2008.
- 6) 広村弥生、岸田綱郎、中野 宏、濱雄光、松田 修、久 育男. IL-21 の経鼻的投与によるアレルギー性鼻炎の抑制. 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会 (大阪), 2008 年 5 月 16 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸田 綱郎 (Kishida Tsunao)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 00370205