

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790356
 研究課題名 (和文) RS ウイルス感染による自然免疫応答攪乱機序とその修復化合物の探索
 研究課題名 (英文) The disruption mechanism of innate immune system in RSV infected epithelial cells and search of its restoration compound.
 研究代表者 岡林 環樹 (Okabayashi Tamaki)
 札幌医科大学・医学部・講師
 研究者番号：10359995

研究成果の概要 (和文)：

RS ウイルス (RSV) は小児の呼吸器疾患における主要な原因である。侵入門戸となる鼻粘膜上皮細胞では、RSV 感染に対して I 型 IFN よりも III 型 IFN に依存した自然免疫を誘導することを明らかにした。また、この III 型 IFN の誘導にはウイルスセンサーである RIG-I が重要な働きをしていることを明らかにした。RSV 感染細胞に対する抗菌薬 fosfomicin の効果として、NF- κ B 活性抑制による炎症性ケモカイン RANTES および肺炎球菌受容体 PAF 受容体の抑制を見い出した。

研究成果の概要 (英文)：

Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the most common causes of respiratory diseases in children. Nasal epithelial cell (NEC) is the first site exposure to RSV. NEC induced type-III IFN by RSV infection, but not merely type-I IFN. Our results showed that RIG-I, one of the virus sensors, contributed to this type-III IFN production. Fosfomicin, anti-bacterial agent, suppressed the RSV-induced a proinflammatory chemokine, RANTES production, and a receptor for *Streptococcus pneumoniae*, platelet-activating factor receptor expression, by inhibition of transcription factor NF- κ B activity.

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	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

(1) RSV 症と自然免疫応答の攪乱

RSV 感染症は乳幼児の肺炎の 50%、細気管

支炎の 90% を占めており、心臓に基礎疾患がある場合には致死的にもなります。また繰り返して感染することや、サイトカインストームを

起こす事が、アトピー、喘息などのアレルギー疾患との関連性が指摘されています。

ウイルスは生体の抗ウイルス作用から逃れようとする戦略を有します。RSV が属するパラミクソウイルス科の他のウイルスでは、アクセサリ蛋白が IFN システム抑制戦略を持つことが報告されています。しかし、RSV はアクセサリ蛋白を持たず、IFN システムへの影響は不明です。近年、RSV の非構造蛋白 NS1 と NS2 が JAK/STAT 抑制、IRF-3 の発現抑制により I 型 IFN システムを阻害すると報告されました。このことにより Th1 反応を誘導する IFN システム阻害により、RSV が Th2 免疫応答の増強に関与し、Th1/Th2 バランス崩壊がアレルギー症状を起こす可能性が示唆されています。

(2) 細胞内ウイルスセンサーとその攪乱戦略

ウイルス複製時に形成される dsRNA を、細胞内ウイルスセンサーである TLR3、RIG-I、MDA5 が認識します。これらのウイルスセンサーからの情報伝達により、IRF-3、NF- κ B が活性化され、IFN- β 、炎症性サイトカインが産生され、自然免疫応答が発動します (図 1)。パラミクソウイルス科のアクセサリ蛋白が MDA5 に結合することにより、MDA5 からの情報伝達を阻害することが報告されました。しかし RSV とウイルスセンサーの関係は明らかにされていません。

(3) RSV 感染症に対する予防、治療薬の開発の遅れ

ワクチン開発は 1960 年代に開発された不活化ワクチンが再感染による病態悪化を引き起こして以来成功しておらず、ヒト化モノクローナル抗体が使用されているだけです。治療に関しては、対処療法のみで、有効なサイトカイン抑制薬がないのが現状です。

2. 研究の目的

(1) RSV 感染時における自然免疫応答を IFN の産生とその情報伝達を含めた IFN システムへの影響について明らかにすることを目的とした。特に RSV を含めた呼吸器感染症関連ウイルスは、鼻粘膜細胞が生体への侵入門戸とする。一般的に呼吸器感染ウイルスに *in vitro* の実験系では A549 などのガン由来肺胞上皮細胞などが使用されている。本研究では、第一線の感染防御となる鼻粘膜細胞に着目し、健康者由来鼻粘膜細胞を用いることにより、より生体に近い状態での RSV 感染時の自然免疫応答状況を明らかにすることを目的とした。

近年、I 型 IFN (IFN- α/β) に加えて、新たに III 型 IFN として、IFN- λ による自然免疫応答が着目されている。本研究にお

いても、I 型 IFN だけでなく、III 型 IFN の産生性、およびその意義についても検討した。

(2) 病原体侵入時に産生される病原体関連分子パターンを認識することにより、生体は自然免疫応答を誘導することが明らかになってきた。その中でもウイルス複製時に産生されるウイルス dsRNA を認識するウイルスセンサーとして、RIG-I、MDA5、TLR3 が重要な働きをする。しかし、これらのセンサーはウイルスの種類毎にことなる機能を発揮することがあり、またウイルスによっては、そのセンサーが、およびそれを起点とする情報伝達経路が抑制標的となり、自然免疫応答の誘導抑制に繋がることも明らかになっている。そこで、(1)で明らかにする鼻粘膜細胞における RSV 感染時の自然免疫誘導の起点となるウイルスセンサーを明らかにすることを目的とした。

(3) 近年、ある種の抗菌薬が抗炎症作用を持つことが報告されている。申請者の準備実験においても、RSV 感染呼吸器上皮細胞に抗菌薬フォスホマイシン (FOM) を処理すると、RSV 症の病態悪化に関与するサイトカイン産生を抑制することを見出した。このような化合物が、どのような機序で、そのサイトカイン産生を抑制に働くのかを明らかにすることを目的とした。また、サイトカイン抑制だけでなく、RSV 関連病態の改善にどのような影響を与えるのかを、RSV の病態を悪化させる細菌の二次感染への影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 手術で摘出したヒト鼻粘膜組織の正常部から、上皮細胞を取り出し、ヒト鼻粘膜上皮細胞 (NEC) の初代培養を確立した。また、この初代培養系細胞に、human telomerase reverse transcriptase 遺伝子 (hTERT) を導入することにより継代可能とした hTERT-NEC を作製した。HTERT-NEC に RSV (Long 株、A2 株) を MOI 1 で感染させ、そのウイルス増殖性を PFU 解析、IFN 産生性を ELISA 法、IFN 誘導遺伝子 (ISG) の発現を RNA、蛋白発現誘導により解析した。

(2) RSV 感染時の肺胞上皮細胞 A549 および hTERT-NEC のウイルス由来 dsRNA 認識機構である RIG-I、MDA5 の発現をウエスタンブロット、3D-gene 解析により調べた。また、これらの認識機構が、自然免疫応答にどのように寄与しているのかを明

らかにするため、これらの siRNA を導入細胞における自然免疫応答への影響を調べた。

- (3) 肺上皮細胞 A549 に、RSV を MOI 1 で感染させ、FOM を 0-1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で処理した。処理細胞から RT-PCR によりサイトカイン mRNA の発現、培養上清からサイトカイン/ケモカイン産生量を ELISA により求めた。RANTES プロモーター、NF- κB ルシフェラーゼ遺伝子解析、固相化 NF- κB 結合領域核酸に対する核抽出物の結合により NF- κB の活性を調べた。PAF 受容体の発現は RT-PCR、フローサイトメトリーにより調べた。FITC 標識した肺炎球菌菌体の細胞への接着をフローサイトメトリーで検討した。

4. 研究成果

- (1) hTERT-NEC において RSV の感染増殖が観察できた(感染 24 時間後 Long 株 2.3×10^3 、A2 株 2.8×10^3 PFU/ml)。また、RSV 増殖に伴う RANTES の産生がみられた。RSV 感染により I 型 IFN mRNA は誘導されなかったが、III 型 IFN mRNA が顕著に誘導され、ISG 発現との相関性があった。培養上清中において、IFN- $\lambda 1$ の継時的な産生誘導(感染 24 時間後 Long 株 849、A2 株 1119 pg/ml) が確認できたが、IFN- β の誘導はみられなかった。ヒト正常鼻粘膜上皮細胞を、継代可能な状態で、RSV 感染系として確立することが出来た。この感染系からの結果では、I 型 IFN よりも III 型 IFN が優位に産生されたことから、RSV 感染時のヒト鼻粘膜上皮細胞においては、III 型 IFN による感染防御が中心となって作動していると考えられた。現在までに、鼻粘膜正常細胞におけるウイルス感染時の III 型 IFN の優位な誘導性は明らかにされていなかった。この感染系を用いることにより、RSV だけでなく、インフルエンザ、ライノウイルスなどの呼吸器感染症ウイルスの侵入門戸における自然免疫誘導性の解明、その予防法の開発、治療効果の評価へ利用することが期待できる。
- (2) hTERT-NEC において、RSV 感染時に RIG-I、MDA5 の mRNA および蛋白発現誘導が見られたが、TLR3 の発現誘導は認められなかった。その他の TLR の mRNA の誘導も観察できなかった。この結果より RIG-I、MDA5 が RSV 感染時の自然免疫誘導システムに関連していると着目した。SiRNA による RIG-I 発現抑制細胞では、RSV 感染による IFN- λ の産生は抑制されたが、MDA5 発現抑制細胞では、IFN- $\lambda 1$ の産生は抑制されなかった。この結果より、鼻粘膜上皮細胞

においては、RIG-I によるウイルス認識が IFN- λ を優位とする自然免疫応答を誘導していることを明らかにした。また、IFN- λ は hTERT-NEC における RSV 複製を抑制し、また、RSV の病態に深く関連する RANTES の産生を抑制した。これにより、鼻粘膜上皮細胞における RSV 感染時には、RIG-I を起点とする IFN- λ の抗ウイルス効果を発揮するのに重要であることを明らかにした。今後は MDA5 の発現がどのような意味を持つのか、また IFN- β が産生誘導されない機序を明らかにし、呼吸器ウイルス感染症の侵入門戸における生体の防御機構を明らかにしていきたい。

- (3) FOM は RSV 感染 A549 細胞における細胞活性、ウイルス複製に影響しなかったが、RANTES、IL-8 の産生を抑制した。RSV 感染は RANTES プロモーターを活性化したが、その活性は NF- κB 結合領域変異体で抑制された。また、FOM 処理が RSV 感染による NF- κB の転写活性及び結合を抑制した。PAF 受容体は RSV 感染により誘導され、FOM 共存下で FOM の用量依存的にこの発現上昇が有意に抑制された。これに相関して、RSV 感染細胞では肺炎球菌接着量は有意な増加を認められたが、FOM 共存下での感染では肺炎球菌の接着量は減少していた。RSV は感染細胞において NF- κB 依存的に RANTES を産生する。FOM は NF- κB 活性を抑制することにより、RANTES 産生を抑制すると考えられる。また FOM に RSV による PAF 受容体の発現上昇を抑制する効果を見出した。これらの結果より、FOM が抗菌活性以外に、ウイルス感染における炎症症状の緩和や細菌の二次感染の抑制をもたらす可能性が示唆された。このことは、抗菌薬の新規有効利用としても考えられ、RSV 感染症の治療薬開発に向けての情報提供が可能になると考えられる。

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 1 件)

- ① Okabayashi T, Yokota S, Yoto Y, Tsutsumi H, Fujii N. Fosfomycin suppresses chemokine induction in airway epithelial cells infected with the respiratory syncytial virus. Clin Vac Immunol. 査読有、16(6), 2009. p859-865.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 岡林環樹、ホスホマイシンは RS ウイルス

誘導性ケモカイン産生および細菌接着増強を抑制する、北海道臨床微生物研究会、2009.11.13.札幌

② 岡林環樹、RS ウイルスによるケモカイン産生および細菌接着増強に対するホスホマイシンの抑制効果、日本ウイルス学会、2009.10.27.東京

③ 岡林環樹、ホスホマイシンはRS ウイルス誘導性細菌接着増強を抑制する、日本細菌学会北海道支部会、2009.9.18、札幌

④ 岡林環樹、ホスホマイシンによるRS ウイルス感染呼吸器上皮細胞からのケモカイン産生抑制、日本感染症学会、2009.4.24.東京

⑤ Tamaki Okabayashi, Modulation of cytokine induction by Fosfomycin in airway epithelial cells infected with RSV, Regulation in innate immunity from recognition molecules to antimicrobial peptide 2008.10.28. Sapporo.

⑥ Tamaki Okabayashi, Type I IFN production depended melanoma differentiation-associated gene 5 in airway epithelial cells infected with RSV, Regulation in innate immunity from recognition molecules to antimicrobial peptide 2008.10.28. Sapporo.

⑦ 岡林環樹、RS ウイルスによる IFN 非依存的 MDA5 発現調節と I 型 IFN 産生機序、日本インターフェロンサイトカイン学会、2008.7.10.札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡林 環樹 (Okabayashi Tamaki)

札幌医科大学医学部講師

研究者番号：10359995