

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07049

研究課題名（和文）SARS-CoV-2に対する自然免疫機構と重症化因子の影響に関する分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms underlying the innate response and the effects of risk factors on SARS-CoV-2 infection

研究代表者

山田 大翔（Taisho, Yamada）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：10779333

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）：SARS-CoV-2は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を引き起こすRNAウイルスであるが、宿主の自然免疫系においてどのように認識や排除が行われるかは不明な点が多かった。また慢性閉塞性肺疾患（COPD）などといった基礎疾患がこの重症化のリスク要因として知られるが、その詳細な分子機構についても不明であった。本研究では、ヒト肺上皮細胞における自然免疫抗ウイルス作用に重要なタンパク質（センサー分子）としてRIG-Iを同定した。さらに、このRIG-Iは少なくとも喫煙やCOPDなどの生活習慣要因により発現が低下することでウイルス増殖を引き起こし、感染症重症化の原因となり得ることを提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの基礎疾患がなぜ、COVID-19の重症化の高いリスク要因となるかを分子機構を見出した。本研究でSARS-CoV-2の抑制に重要な分子として見出したRIG-Iの発現を肺上皮細胞で正常に保つことが、感染症重症化を予防することにつながる可能性を提示した。さらにその方法の一つの案として、レチノイン酸（ATRA）処理によってRIG-I発現を回復させることを実験的に検証した。

研究成果の概要（英文）：SARS-CoV-2 is an RNA virus that causes COVID-19. There were many unknowns about how it is recognized and eliminated by the host's innate immune system. Although chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are known to be a risk factor for the severe COVID-19, the detailed molecular mechanisms have remained unclear. In this study, we identified RIG-I as a host sensor molecule important for the innate direct antiviral response in human lung epithelial cells. Furthermore, its expression is reduced in cells from patients with smoking and COPD, causing viral proliferation.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 抗ウイルス RIG-I

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界規模の流行を引きおこし社会問題となってまだ記憶に新しい新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、その原因ウイルスである SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2)の感染によって引き起こされ、研究開始当初、その病態や治療に向けた研究は急務であると認識されていた。

通常、感染防御としてのヒト免疫応答はまず自然免疫システムが働き、引き続いて適応免疫システムが活性化され、病原体の排除が行われる。この最初の感染防御のステップである自然免疫の活性化は、病原体の体内への侵入を認識することで始まる。この認識は、パターン認識受容体と呼ばれるタンパク質分子(センサー分子)が病原体微生物由来の特有な分子を認識することによって行われ、ウイルス感染時には多くの場合、ウイルス由来の DNA や RNA という核酸が認識の標的となる。病原体の侵入を感知したセンサー分子は、下流に細胞内シグナル伝達を活性化し、抗ウイルス活性のあるインターフェロン(interferon, IFN)などのサイトカインやケモカインの遺伝子発現が行われ、ウイルスの排除や T 細胞・B 細胞などの獲得免疫系を効率よく行うために重要な役割を持つ。COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 が感染時にどのような分子機構で自然免疫システムによって認識されるかについては不明な点が多かった。

さらに、COVID-19 の重症化の原因となる宿主の要因として、喫煙や慢性閉塞性肺疾患(COPD)などが知られているが、その理由となる詳細な分子機構についても不明であった。

2. 研究の目的

SARS-CoV-2 に対する(1)自然免疫認識機構の解明と(2)COVID-19 の重症化リスク要因として報告されている喫煙や慢性閉塞性肺疾患(COPD)の自然免疫応答に対する影響について、その詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

SARS-CoV-2 株は中国武漢市で発生したオリジナル株の一つである JPN/TY/WK-521 を使用し、ヒト肺・気管支上皮細胞として細胞株 A549、Calu-3、初代培養株 HPAEpiC、HBepiC、HBepC、COPD 患者由来初代培養株 HBepC-COPD、PBEC-COPD などを使用した。感染時の自然免疫応答として、感染細胞のサイトカイン・ケモカイン誘導やウイルスの増殖性を qRT-PCR で主に評価した。また、一部ウイルス増殖性については、プラークアッセイやウイルスタンパク質の免疫染色を実施し、総合的な評価も加えた。ウイルス RNA に対する宿主タンパク質の結合性については、pull-down アッセイや RIP アッセイにより主に検討した。宿主細胞におけるタンパク質機能の解析には、siRNA を用いた遺伝子抑制、CRISPR-Cas9 による遺伝子欠損、プラスミドによる過剰発現系を適宜実施した。

4. 研究成果

まず、肺・気管支上皮細胞は、SARS-CoV-2 感染時の主な標的細胞であることから肺胞細胞および気管支上皮細胞由来の複数の初代培養細胞を用いて SARS-CoV-2 感染に対する自然免疫応答を調べた。しかし、これらの細胞に SARS-CoV-2 が十分感染することは確認できたが、いずれの細胞の場合も I 型および III 型 IFNs やその他の自然免疫サイトカインの誘導は認められず、かつ IRF-3 や NF- κ B といった転写因子の活性化も見られなかった。これまで SARS-CoV-2 を含むコロナウイルスには自然免疫シグナル伝達経路を抑制するという、多くの免疫回避タンパク質が備わっていることが知られており、おそらくこのような肺や気管支由来の上皮細胞では、ウイルスタンパク質によってサイトカイン誘導が抑制されることでウイルスが効率よく増殖しているのではないかと予想された。しかしながらその予想に反して、SARS-CoV-2 の増殖がみられなかった。そこで、従来みとめられるはずの自然免疫応答が活性化しなくともウイルスを抑制する仕組みがあると考えに至った。サイトカインを誘導しないという結果は、ほとんどの SARS-CoV-2 感染者が無症状または軽症である点や、実際に IFNs や炎症性サイトカインが顕著に増加しないことが報告されていることから、臨床病態との何らかの関連性が示唆された。そこで、サイトカインを誘導すること無く SARS-CoV-2 増殖を抑制できる、新たな自然免疫抗ウイルスシステムが存在すると考え、その因子の同定を試みた。SARS-CoV-2 は RNA ウイルスであるため、まずは RNA 認識センサー分子の関与について解析した結果、RIG-I の発現が低下あるいは欠損させたヒト肺胞上皮細胞では SARS-CoV-2 の増殖とサイトカイン誘導がみられた。また SARS-CoV-2 の研究でよく使われるヒト肺がん細胞株 Calu-3 は、我々が用いた肺や気管支の初代上皮細胞と比較して顕著に RIG-I の発現レベルが低く、SARS-CoV-2 の増殖やサイトカイン応答がみられることから、肺・気管支上皮細胞での SARS-CoV-2 感染に対する感染初期の抗ウイルス防御には RIG-I の発現レベルが重要であることが示唆された。一方、COPD を基礎

疾患に持つ SARS-CoV-2 感染者は、COVID-19 重症化のリスクが高いに着目し、COPD 患者由来の肺や気管支由来の上皮細胞における RIG-I の発現量を検討すると、その発現が顕著に減少していることがわかり、かつ SARS-CoV-2 が複製されることが観察された。RIG-I 発現量の低下が COPD 患者での高い COVID-19 重症化リスクを説明する要因の一つとなっている可能性があると考えられた。

さらに、RIG-I はどのように SARS-CoV-2 複製を抑制するか詳細な検討を進めた。RIG-I は通常のリガンド RNA の認識には C 末端ドメインを介して結合することが知られていたが、SARS-CoV-2 の場合にはこの C 末端ドメインではなく、ヘリカーゼドメインを介して直接的に SARS-CoV-2 を認識していることがわかった。また、RIG-I は従来リガンド認識後には MAVS/IPS-1 に結合することで自然免疫サイトカインの誘導に関わるが、このヘリカーゼドメインを介した結合の場合はそのような下流のシグナル経路は活性化しないというユニークな機構であることが明らかとなった。さらにこの結合性がなぜウイルス複製を抑制するのかを調べた。SARS-CoV-2 はプラス鎖 RNA ウイルスで、RIG-I はこのプラス鎖 RNA の 3'非翻訳領域を主に認識することがわかった。このウイルス RNA の領域は、プラス鎖 RNA からマイナス鎖 RNA を転写する際にウイルスの RNA 依存的 RNA ポリメラーゼが結合する部分であり、この複製の最初のプロセスを RIG-I が競合的、直接的に阻害していることを見出した。

RIG-I の発現レベルが低下しウイルス複製の最初のステップが進行した場合には、ウイルスプラス鎖 RNA からマイナス鎖 RNA 転写される。このウイルス複製が進行した際には、自然免疫応答が活性化し、サイトカインに誘導が認められた。この応答に関わるセンサー分子を探索したところ、他の RNA 認識センサー分子である MDA5 がそのウイルスマイナス鎖 RNA の認識に関わることも明らかにした。

これらの知見から、RIG-I の発現レベルが顕著に減少している COPD 患者由来の肺や気管支由来の上皮細胞において RIG-I 発現量を回復させることができれば、ウイルス複製を抑制できる手法となり得ると考えられた。そこで、ビタミン A の誘導體であるオールトランス型レチノイン酸 (ATRA) を処理すると、RIG-I の発現レベルが増加し、SARS-CoV-2 の複製が抑制することを見出した。このことから、ATRA などを投与して RIG-I の発現を高めることが治療や予防という点で有効である可能性が示唆された。

まとめると、通常ヒト肺上皮細胞および気管支上皮細胞に SARS-CoV-2 が感染すると、RIG-I によってウイルス RNA の転写が抑制されるためウイルス増殖が起こらないが、RIG-I の発現レベルが低下してしまっている場合には RIG-I によるウイルス増殖抑制が働かず、そのためウイルス複製が開始し、その過程で合成されるマイナス鎖 RNA は今度は MDA5 によってサイトカインを誘導するタイプの自然免疫応答が活性化されるという、2 段階にセンサーが作動する免疫システムが備わっていることが明らかとなった。半数近くの感染者が無症状であり、インターフェロンや炎症性サイトカインが顕著に増加しないことが報告されていることを考慮すると、今回の結果はこの病態の一部を説明しているかもしれない。細胞の RIG-I の発現レベルとおそらく感染するウイルス量のバランスが、細胞内でのウイルス複製の進行とそれに伴う自然免疫サイトカインの誘導を規定しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yamada Taisho, Takaoka Akinori	4. 巻 43
2. 論文標題 Innate immune recognition against SARS-CoV-2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-023-00259-5	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 Yamada Taisho, Sato Seiichi, Sotoyama Yuki, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Yamauchi Hajime, Sasaki Michihito, Takaoka Akinori	4. 巻 22
2. 論文標題 RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 820 ~ 828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-021-00942-0	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6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamada T
2. 発表標題 RIG-I restrains SARS-CoV-2 replication in human lung cells without activation of innate immune signaling
3. 学会等名 The 17th International Symposium of The Institute Network for Biomedical Sciences International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田大翔
2. 発表標題 SARS-CoV-2に対する新たな自然免疫系防御機能
3. 学会等名 日本ウイルス学会北海道支部 第55回夏季シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田大翔
2. 発表標題 抗ウイルス自然免疫研究からのCOVID-19病態の理解
3. 学会等名 第10回北海道免疫疾患談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamada T. Sato S., Sotoyama Y., Orba Y., Sawa H., Yamauchi H., Sasaki M., and Takaoka A.,
2. 発表標題 RIG-I restrains SARS-CoV-2 replication in human lung cells without activation of innate signaling
3. 学会等名 The 9th Sapporo Summer Seminar for One Health
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田大翔, 佐藤精一, 外山雄貴, 大場靖子, 澤洋文, 山内肇, 佐々木道仁, 高岡晃教
2. 発表標題 RIG-Iはヒト肺細胞においてシグナル伝達非依存的な抗SARS-CoV-2防御を誘導する
3. 学会等名 第85回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田大翔
2. 発表標題 ウイルス感染を認識する自然免疫核酸センサーとそのシグナル制御機構に関する一連の解析
3. 学会等名 第85回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------