

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15265

研究課題名（和文）インフルエンザウイルス関連細菌性肺炎で見られる細胞膜突起構造の機能と制御策の追究

研究課題名（英文）exploration of the function and regulatory mechanism of cell membrane protrusions in influenza virus-associated bacterial pneumonia

研究代表者

野依 修 (noyori, osamu)

長崎大学・高度感染症研究センター・助教

研究者番号：30737151

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本課題では、オセルタミビル存在下において、インフルエンザウイルス単独感染細胞と比較して、インフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌の共感染細胞でより多くのナノチューブが形成され、非感染細胞へのウイルスタンパク質の効率的な輸送に関与していることを見出した。また、アクチン重合阻害剤の添加によってナノチューブの形成が抑制されることに伴い、NPの細胞間移行効率が顕著に抑制されていた。以上の事から、黄色ブドウ球菌との共感染により形成増強されたナノチューブは、ウイルス分泌阻害薬や中和抗体などの存在下におけるウイルスの効率的な細胞間伝播経路として寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスと細菌に共感染した患者では肺炎の重症化がみられる。その原因の一つとして、治療薬の効果減弱が挙げられるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本課題において、ウイルス分泌阻害薬存在下で、インフルエンザウイルス単独感染細胞と比較して、インフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌の共感染細胞は、より多くのナノチューブを形成し、効率的にウイルスタンパク質を細胞間輸送していることが分かった。本研究結果は、これまでに不明であったインフルエンザ関連細菌性肺炎患者における治療薬の効果減弱の原因解明に向けた新たな知見の一助となる可能性が有る。

研究成果の概要（英文）：In this study, we observed that nanotubes, which facilitate the transfer of viral proteins such as NP, HA, and NS1 from infected cells to uninfected cells, were more prevalent in cells co-infected with influenza virus and *Staphylococcus aureus* compared to cells solely infected with influenza virus. Furthermore, it was found that the nanotube formation was significantly suppressed under the treatment of actin polymerization inhibitor, leading to a notable decrease in the transfer of NP to uninfected cells. Collectively, it was assumed that additionally formed nanotubes between co-infected cells and uninfected cells have the potential to facilitate cell-to-cell viral spread, particularly in the presence of a viral secretion inhibitor and/or neutralizing antibody.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス ナノチューブ 共感染 黄色ブドウ球菌 細胞間伝播

1. 研究開始当初の背景

1918年に大流行したスペイン風邪で死亡した全患者 (Morens et al, J Infect Dis 2008)、および2009年の新型インフルエンザで、集中治療室にて治療を受けた約34%の患者 (Martín-Loeches, et al, Chest 2011) が、インフルエンザウイルス関連細菌性肺炎を起こし死亡したと推計されており、肺炎の重症化に細菌の共感染は深く関わっている。原因の一つとして、共感染者では標準治療の効果が鈍化することが挙げられ (Chertow et al, JAMA 2013)、新たな治療方法の確立が望まれる。HIV-1 (Sowinski et al, Nat Cell Biol 2008) やプリオン (Gousett et al, Nat Cell Biol 2009) は、感染細胞においてナノチューブと呼ばれる細胞膜突起構造を形成誘導し、その内部を通過して遠隔(細胞数個分)の細胞へ感染拡大する。中和抗体や治療薬の多くは、細胞膜透過性が極めて低いことから、ナノチューブを介して感染伝播する病原体に対する治療効果は減弱すると言われる。インフルエンザウイルス関連細菌性肺炎は、“治療効果の鈍化”に起因して高い致死率を示すが、その分子メカニズムについてはほぼ不明である。そこで申請者は、肺胞上皮系細胞であるA549細胞に、インフルエンザウイルス A/PR/8/34 (H1N1)、黄色ブドウ球菌 (RN4220株) の単独感染、または共感染を行いナノチューブが形成されるのかを検討した。その結果、黄色ブドウ球菌単独感染時はナノチューブの形成は見られず、インフルエンザウイルス単独感染時には、一部の細胞でナノチューブの形成が見られた。とても興味深いことに、共感染した場合、細胞の形態変化に伴い、著しく多数の長いナノチューブが形成されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 を用いて、インフルエンザウイルス感染細胞が、黄色ブドウ球菌の共感染によって無数のナノチューブを形成する生物学的意義を明らかにする。また、ナノチューブ形成メカニズムの分子基盤を明らかにし、病原体感染細胞のナノチューブ形成を特異的に制御する方法を追究する。

3. 研究の方法

本研究では、インフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌の共感染で形成誘導されるナノチューブが、治療薬あるいは中和抗体存在下において、インフルエンザウイルスの細胞間伝播に寄与するのかを検証した。インフルエンザウイルス A/PR/8/34 (H1N1) と黄色ブドウ球菌: RN4220株を使用した。黄色ブドウ球菌は肺胞上皮系細胞 (A549細胞) に感染し、細胞内で1か月近く生存する (Tuchscher et al, EMBO Mol Med 2011) ことが知られており、本課題では A549細胞を使用し実験を行った。

- (1) オセルタミビル存在下において、インフルエンザウイルスのみに感染させた細胞とインフルエンザウイルスおよび黄色ブドウ球菌の共感染細胞で形成されるナノチューブ(アクチン陽性)の数を比較した。
- (2) ナノチューブ形成の原因を明らかにするため、熱不活化処理または無処理のインフルエンザウイルスおよび黄色ブドウ球菌に感染した A549 で、ナノチューブ形成数を比較した。
- (3) オセルタミビル存在下において、インフルエンザウイルス感染細胞またはインフルエンザウイルスおよび黄色ブドウ球菌に共感染した細胞を CellTracker Green で染色しておいた非感染細胞と15時間共培養し、ウイルスタンパク質がナノチューブを介して CellTracker Green 陽性細胞へ伝達する効率を比較した。
- (4) ナノチューブによる非感染細胞への NP 伝播効率を明らかにするため、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D 存在または非存在下で、インフルエンザウイルス単独感染またはインフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌共感染細胞と CellTracker Green で染色しておいた非感染細胞を共培養し、CellTracker Green 陽性細胞への NP 移行効率を比較した。

4. 研究成果

(1) オセルタミビル存在下において、単独感染細胞と比較して、インフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌共感染細胞でナノチューブの形成細胞の割合が顕著に高いことが分かった(図1)。

(2) インフルエンザウイルス単独感染細胞と比較して、インフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌の共感染細胞でナノチューブの形成が増強されるが、インフルエンザウイルスあるいは黄色ブドウ球菌のどちらかを熱処理した場合においても、ナノチューブ形成細胞の割合はインフルエンザウイルス単独感染細胞とほぼ同程度であった。

(3) ナノチューブは、非感染細胞へインフルエンザウイルスの viral ribonucleoprotein を輸送し、感染性ウイルスの産生に関与することが知られている(Ganti et al, *PLoS Pathog* 2021)。本研究により、インフルエンザウイルス単独感染細胞と比較して、インフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌の共感染細胞は非感染細胞への NP 細胞間伝播効率が約 1.5 倍程度高いことが分かった。

(4) ナノチューブはアクチンを主要な構成要素とすることから、アクチン重合阻害剤(サイトカラシン D) の添加によって強力にナノチューブの形成は阻害される。そこでサイトカラシン D 存在下でインフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌の共感染細胞を非感染細胞と共培養したところ、インフルエンザウイルス単独感染細胞と非感染細胞を共培養した場合と同程度にまで NP の細胞間伝播効率は減少することが分かった。

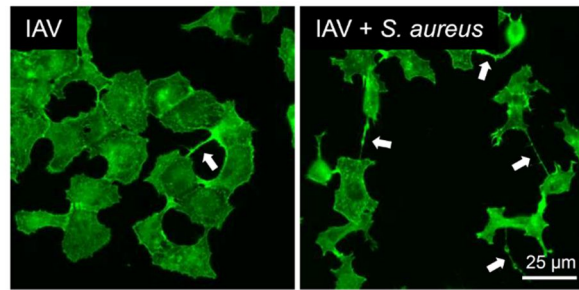


図1. IAVと *S. aureus* の共感染細胞で多数のナノチューブが形成される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永 樹希、山口 春衣、野依 修
2. 発表標題 インフルエンザウイルスのナノチューブを介する細胞間伝播
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野依 修、富永 樹希、山口 春衣、山吉 誠也、河岡 義裕、中山 勝文
2. 発表標題 Intercellular transmission of influenza virus through tunneling nanotubes
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 春衣、富永 樹希、山吉 誠也、河岡 義裕、中山 勝文、野依 修
2. 発表標題 インフルエンザウイルスのナノチューブを介する細胞間伝播
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
---------	---------