

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19574

研究課題名（和文）鼻汁中分泌型細胞小胞を用いた呼吸器ウイルス感染重症化予測のための探索研究

研究課題名（英文）Exploratory research for prediction of severity of respiratory virus infection using nasal secretory vesicles.

研究代表者

小笠原 徳子 (Ogasawara, Noriko)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00438061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：感染時における分泌型細胞外小胞（extracellular vesicle; EV）の解析を行い、内容物が重症度マーカーとなるか検討を行った。内容物を同定するために予備検討を行ったがEV内容物のマーカーがタンパク質として検出できなかった。そのため初代培養小児咽頭扁桃上皮細胞にGFP-RSVを感染させ、遺伝子変化の網羅的解析を行った。感染細胞では分泌系タンパク質をコードする遺伝子や複数のmicroRNAの発現上昇が見られた。RSV-NS1に結合する宿主タンパク質の解析では、vesicle関連の宿主タンパク質結合が示唆され、RSV-NS1が宿主タンパク質とともに細胞外に放出されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器感染性ウイルスは治療薬開発やワクチン開発が進んでいるが、感染力の強さや罹患率の高さからは、適切な介入因子を探索することも治療薬開発やワクチン開発とともに非常に重要で臨床的、社会的意義が大きい。本研究の遂行によって、これまで知られていなかったウイルスタンパク質単独での放出とバイオマーカーとしての可能性を示すことができ、挑戦的萌芽研究遂行の波及効果として罹患率の高い感染症における有用な介入因子のさらなる解析を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：Along with developing therapeutic and rapid diagnostic methods for respiratory viral infections, we analyze secretory extracellular vesicles (EVs) during infection to obtain non-invasive and condensed information from the living body. We investigated whether the contents in EVs could serve as severity-specific biomarkers. A preliminary study was conducted to identify the specific EV contents induced during infection, but the marker for the EV contents could not be detected as a protein. Primary cultured pediatric adenoid epithelial cells were infected with GFP-RSV, and RNA-sequence was performed. As a result, the infected cells showed increased expression of genes encoding secretory proteins and noncoding RNAs, including multiple microRNAs. Further analysis of host proteins that bind to RSV-NS1 suggested binding to multiple host proteins that may be released into vesicles. These findings indicate that RSV-NS1 is extracellularly released together with host proteins.

研究分野：粘膜自然免疫

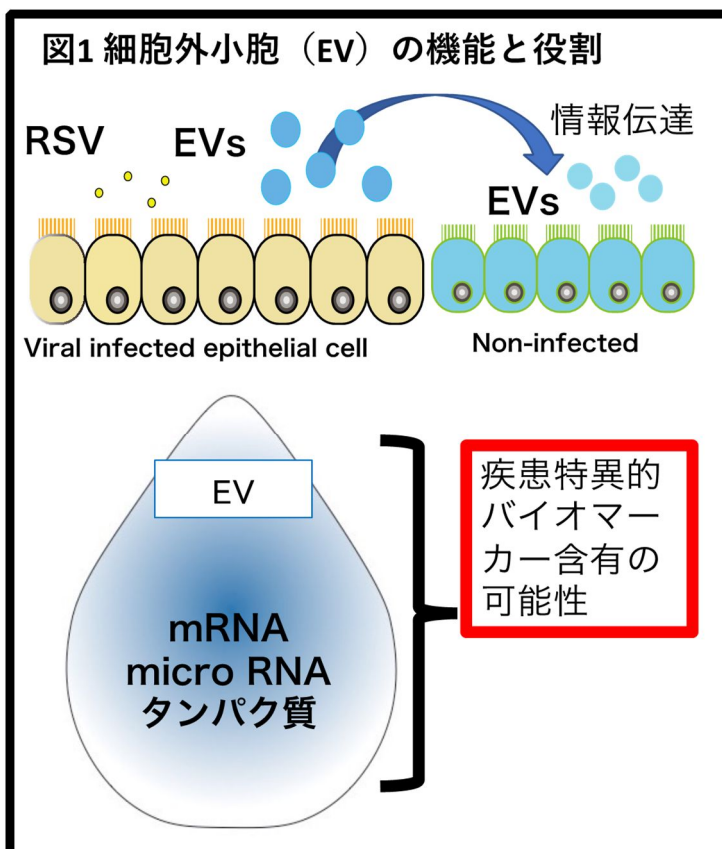
キーワード：粘膜免疫 自然免疫 RSウイルス

1. 研究開始当初の背景

同じウイルスに暴露されても、その後の症状は個人個人あるいは同一人物でも時期、年齢、体調によって千差万別である。従来、この症状の差については暴露ウイルス量、宿主獲得免疫誘導能力の違いといった説明がなされていたが明確な科学的解析に裏付けられた確証は未だない。2020年に Habibi らのグループが Respiratory syncytial virus (RSV) の健常者チャレンジテストにおいてウイルス暴露直前の粘膜状況がその後の症状の出現に関連があるとする画期的な報告を Science 誌に行った (Science, 2020)。このことは、呼吸器感染性ウイルス感染が重症化する要素の多くは宿主要因によって運命づけられることを示唆している。

申請者は予備的にヒト小児咽頭扁桃上皮細胞における RSV 感染時の miRNA を網羅的に検索しており 47 の miRNA が発現上昇を示すことを見出した。さらに鼻汁中に分泌される miRNA の定量 real-time PCR において鼻汁中において一定の発現傾向を示すハウスキープング miRNA の検討を行い複数の miRNA が鼻汁中から検出可能であることを見出した。その中で多くの miRNA の機能が未知であり、また miRNA のみならず未だ同定されていない non-coding RNA や peptide が鼻汁中に分泌型細胞外小胞 (extracellular vesicle; EV) 内容物として分泌される可能性があることに気がついた。

そこで申請者はウイルス種に特異的な重症化予測因子の探索 (疾患特異的バイオマーカー) を行うと同時に、ウイルス種に関わらず重症化を予測する因子の探索計画を着想した。EV は近年注目されている新しい細胞間情報伝達システムである (図 1)。呼吸器ウイルス感染症に対する治療・迅速診断法の発達に伴い早期の重症度予測法確立の必要性が高まる中で、非侵襲的でかつ凝縮された情報を生体から得るために呼吸器感染性ウイルス感染時における EV の解析を行い、EV 中に含有される様々な内容物が重症度特異的なバイオマーカーとして汎用し得るかどうか検討を行うことを着想した。



2. 研究の目的

本研究は(1) 呼吸器ウイルス感染時に誘導される特異的 EV 内容物を同定し、(2) 同定産物が重症化バイオマーカーとなりうるか機能解析を行い、(3) 鼻汁から疾患重症度・予後を予測する EV 内容物を迅速に診断する方法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

呼吸器感染性ウイルス全体の差異を確認するために、RS ウイルス (RSV)、ライノウイルス (HRV)、パラインフルエンザウイルス (PIV) および toll-like-receptor 3 (TLR-3) の作動薬である PolyI:C を用いてヒト初代培養小児咽頭扁桃粘膜上皮細胞に感染あるいは処置させて、細胞内の遺伝子発現状況を RNA sequence にて網羅的に比較解析を行う。その結果細胞外に放出される可能性のあるタンパク質をコードする遺伝子を抽出し、各ウイルスおよび TLR-3 作動薬における違いを解析する。さらに、RSV 特異的に放出される可能性のあるタンパク質をコードする遺伝子群・およびウイルス種に関わらず上昇を示す候補遺伝子群を抽出する。

重症化予測のため、同定したバイオマーカー候補内容物を 1) miRNA 2) miRNA 以外の non-coding RNA 3) ペプチド断片に分類し、1) では候補 miRNA の molecular mimic および molecular

antagonist、2) では non-coding RNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、3) では人工合成した候補ペプチド断片を、それぞれ上皮細胞に処理し RNA sequence を用いた非処理・処理間での遺伝子発現変動を解析するとともに、各種ウイルス感染時におけるウイルス増殖能(プラークアッセイ法)、抗炎症性サイトカイン産生能 (ELISA, 定量的 PCR) を評価し生体内における機能を解析し重症化に関わる因子を同定する。

4. 研究成果

初年度は呼吸器感染性ウイルス感染時に誘導される特異的 EV 内容物を同定するための超免疫アフィニティ法について予備検討を行った。市販のキットでは EV 内容物のマーカーとして使用した CD9 などがウエスタンブロット法で検出できなかったため、EV の濃縮や、精製方法についてさらなる検討を行った。

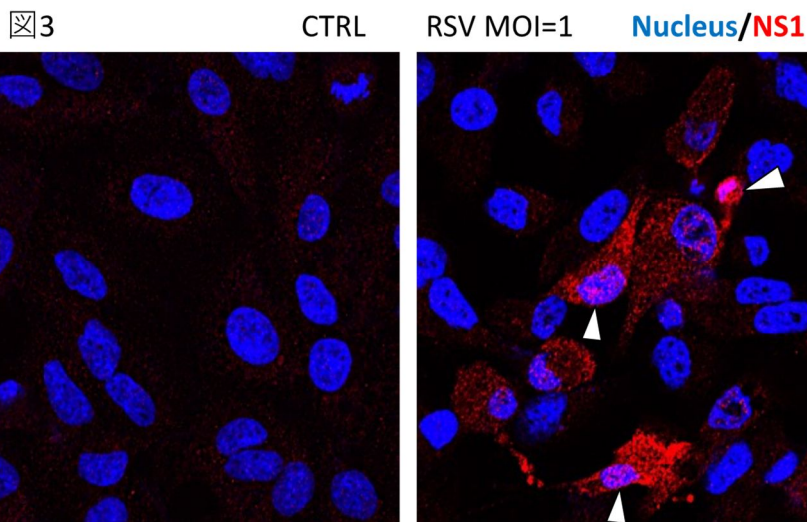
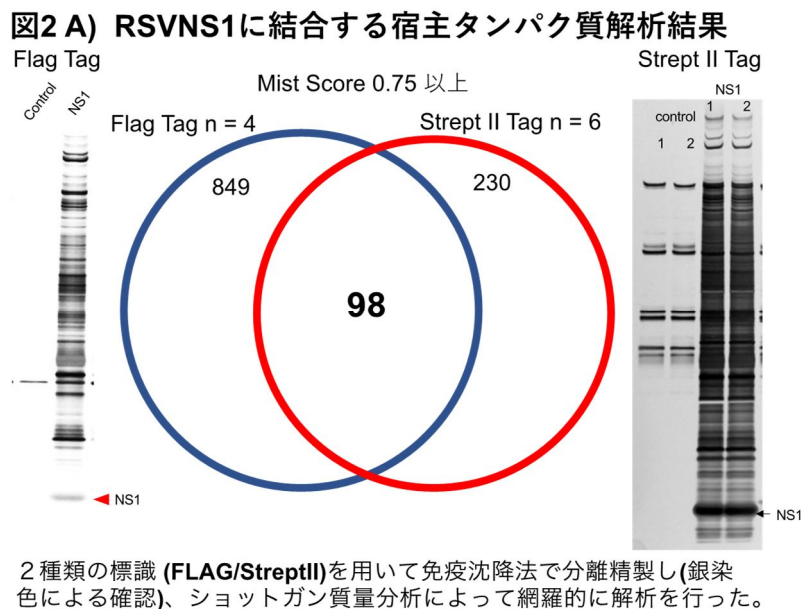
初代培養小児咽頭扁桃上皮細胞に GFP-RS ウイルスを感染させ、GFP の蛍光を指標に感染細胞と非感染細胞に分別し、RNA sequence 解析を行った結果、感染細胞では分泌系タンパク質をコードする遺伝子や複数の microRNA を含む non-codingRNA の発現上昇が見られた。

さらに RSV-NS1 に結合する宿主タンパク質の解析を免疫沈降法および質量分析法を用いて行ったところ、exosome あるいは vesicle 内に放出される可能性のある複数の宿主タンパク質と結合する可能性が示唆された(図 2)。そこで RSV-NS1 が細胞外に放出される可能性について初代培養上皮細胞を用いて解析を継続した。

RSV-NS1 の抗体は市販されていないため、RSV-NS1 タンパク質を精製し、抗体を作成した。NS1 は細胞質及び核にも局在することが示唆され、幅広い分布を示す可能性が示された(図 3)。今後はこの抗体を用いて、RSV-NS1 が細胞外に EV 内容物として放出されるかどうかを解析する。

RSV・HRV・PIV・polyI:C を感染及び処理した初代小児咽頭扁桃上皮細胞について、RNA sequence 解析を行い、それぞれの群での遺伝子発現解析を行った。RSV ではこれまで予備的に行っている代謝解析などにおいて、polyI:C とは異なる経路の活性化が示唆されており、polyI:C とは遺伝子発現変動が異なることが予測される。RNA sequence 解析を多面的に解析することによって、効果的に RSV 特異的に変動する遺伝子群を抽出する予定である。

EV の抽出は初代培養上皮細胞に用いていた小児咽頭扁桃組織が前半(2021 年度)に手術が少なかったため、予備検討が不十分な状態であった。手術件数がコロナ禍以前の水準に戻ってきたため、上皮細胞を大量に培養し、濃縮した RSV を用いて上清中の EV 内容物を効果的に抽出し、内容物について検討を重ねて行く予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takumi-Tanimukai Yuka, Yamamoto Soh, Ogasawara Noriko, Nakabayashi Sayaka, Mizuta Katsumi, Yamamoto Keisuke, Miyata Ryo, Kakuki Takuya, Jitsukawa Sumito, Sato Toyotaka, Tsutsumi Hiroyuki, Kojima Takashi, Takano Kenichi, Yokota Shin-ichi	4. 巻 304
2. 論文標題 A hydroxypropyl methylcellulose plaque assay for human respiratory syncytial virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 114528 ~ 114528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jviromet.2022.114528	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷向 (工) 由佳 小笠原 徳子 山本 圭佑 横田 伸一 高野 賢一
2. 発表標題 Drug-repositioning による抗RSV 治療薬開発のための基礎研究
3. 学会等名 第2回耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2022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
---------	---------