

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791205

研究課題名(和文) RSVの細胞感染およびウイルス複製に関する宿主因子の特定

研究課題名(英文) Identification of host cell factors relating the replication of respiratory syncytial virus

研究代表者

白戸 憲也 (Shirato, Kazuya)

国立感染症研究所・ウイルス第3部・主任研究官

研究者番号：40415477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：RSVは軽症の感冒様症状から下部気道感染にいたるまで様々な疾患を引き起こし、特に生後8週から30週の乳幼児が感染すると重症化しやすい。ワクチン開発は困難で成功しておらず、インフルエンザにおけるタミフルのような抗ウイルス薬の開発が待たれる。本研究では、RSV低感受性のMDCK細胞と感受性細胞由来のcDNAライブラリーを用い、RSVの抗ウイルス薬開発のための標的となりうる、ウイルス複製に関する細胞宿主因子の特定を試みた。結果として、Ephrin-B2、RARRES2、CCL2発現がウイルス複製を上昇させた。今後はこれらの分子がどのようにRSV複製に関与しているかを調べていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Respiratory syncytial virus (RSV) is a major causative agent of respiratory tract infections in children worldwide. Preterm children are at a particularly high risk of developing severe and lethal RSV infections. Because effective vaccines are not available, it is urgently necessary to develop antiviral drugs like oseltamivir for influenza virus. In this study, we tried to identify host cell factors relating the replication of RSV using low-susceptible cell line, MDCK, and cDNA library derived from susceptible cells. As the results, expression of Ephrin-B2, RARRES2, and CCL2 increased the replication of RSV in MDCK. In future, it is necessary to clarify precise roles of these molecules in the replication of RSV.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：RSV MDCK ウイルス複製

## 1. 研究開始当初の背景

Respiratory syncytial virus (RSV) は Paramyxovirus 科 Pneumovirus 亜科 Pneumovirus 族に属するマイナス鎖RNAウイルスである。世界中に広く分布しており、症状は軽症の感冒様症状から下部気道感染にいたるまで様々で、大人になってからも容易に再感染を起こす。特に、生後8週から30週齢の乳幼児が感染すると最も症状が悪化し、ウイルス性気管支炎で入院する幼児の70%がRSV感染といわれる。また老人や骨髄移植などで免疫抑制がなされている患者等でも重症化し、院内感染や家庭内感染の防止が重要とされている。RSVに対するワクチンは未だ開発されていない。かつて1960年代に行われたホルマリン不活化ワクチントライアルで、逆にワクチン接種群のほうで症状が悪化して2名が死亡したように(1,2)、RSVのワクチン開発は困難を極めている。従って、RSV感染症のコントロールのためには、インフルエンザにおけるタミフルのような、抗RSV薬の開発研究も推進すべきであると考えられる。

1. AM J Epidemiol. 1969. 89:449-63.
2. AM J Epidemiol. 1969. 89:435-48.

## 2. 研究の目的

インフルエンザ感染症におけるタミフルはウイルスのノイラミニダーゼを抑制する事でウイルスの出芽を抑え、ウイルス複製サイクルを阻害している。このように抗ウイルス薬開発のためには、ウイルス複製機構の分子基盤を明らかにすることが重要である。近年 nucleolin が RSV のウイルス受容体として報告されたが(3)、他の分子基盤についてはよくわかっておらず、抗ウイルス薬の標的分子となる分子の候補の検索が必要である。そこで経験的にイヌ腎臓由来の MDCK 細胞は RSV に対する感受性が低い事がわかっていることから、本実験において、ヒト肺由来 cDNA ライブラリ、または HeLa 細胞由来 cDNA ライブラリを MDCK 細胞に導入し、RSV 感受性化した細胞クローンを得、これらのクローンと元の MDCK を用いることで、RSV のウイルス複製に關与する宿主因子の特定を試みた。

## 3. Nat Med. 2011. 17:1132-5

### 3. 研究の方法

・RSV 感受性化 MDCK クローンの作出  
RSV 感受性細胞由来 cDNA ライブラリーとして、肺由来 cDNA ライブラリー-(Takara 9506)および HeLa 細胞由来 cDNA ライブラリー(バイオアカデミア 02-723)を用いた。6 穴プレート、 $1 \times 10^5$  の MDCK 細胞に 400 $\mu$ g の肺由来ライブラリー、120 $\mu$ g の HeLa 由来ライブラリーそれぞれを、DMRIE-C(Invitrogen) を使って形質導入し、G418(0.6mg/ml)を用いて薬剤選択を行った。培養 4 日後トリプシナイズし、75cm<sup>2</sup> フラスコへ移動し、さらに薬剤選択を行った。コロニーが目視できるレベルまで培養した後、トリプシナイズしてまとめ、バルクのストックを得た。得られたバルクストックは細胞濃度を数え、80~100個/well の濃度になるように希釈し、96 穴プレートにデュアルで接種した。その後一方の細胞に RSV を  $10^4$ PFU/well 接種し、4 日間培養後、メタノールアセトンにより固定した。固定後、抗 RSV ヤギ血清(Chemicon AB1128)および FITC-Rabbit anti-goat IgG(Zymed 81-1611)を用いて染色し、蛍光顕微鏡によりウイルス抗原を観察した。ウイルス抗原の蛍光が観察されたコロニーについて、もう一方のプレートの同じウェルをトリプシナイズし、80~100 個/well の濃度になるように希釈して、96 穴プレートにデュアルで接種し、同様に RSV 感受性クローンの選択を 5 回行った。6 回目ウイルス抗原陽性コロニーをトリプシナイズした後、限界希釈法によって単一クローンを得、得られたクローンについて同様の蛍光抗体法による染色を行い、抗原の蛍光の見られたクローンを陽性クローンとした。ライブラリーのトランスフェクションを行っていない細胞を陰性対照として用いた。

・RSV 複製に關与する候補遺伝子の RSV 複製への關与の検討

ヒト肺由来 cDNA ライブラリから得られた No. E6、および HeLa 由来 cDNA ライブラリが得られた

No. D2H の 2 クローンを主に用いた。マイクロアレイ解析のために RSV 感受性化 MDCK(E6, D2H)および MDCK 細胞からそれぞれ TRIzol を用いて RNA を抽出した。東レの 3D-Gene chip を用いてそれぞれでマイクロアレイ解析を行い、E6 と MDCK および D2H と MDCK の組み合わせそれぞれで共通し、かつ発現量の差の大きい遺伝子のなかより、候補遺伝子のピックアップを行った。候補遺伝子 cDNA を HeLa または HEp-2 細胞より RT-PCR で複製し、哺乳動物発現ベクターである pTarget(Promega)にクローニングした。発現プラスミドを MDCK 細胞に形質導入し、G418 による薬剤選択を行い、発現細胞のクローンを得た。次に 24 穴プレートの各ウェルに  $1 \times 10^5$  個の発現細胞クローンを用意し、m.o.i.=0.001 で RSV を感染させ、3 日後に培養上清および細胞を回収し、ブランクアッセイによって力価の測定を行った。候補遺伝子のいくつかは組み合わせて形質導入し、共発現する細胞クローンを得、実験に用いた。各遺伝子の発現は RT-PCR によって cDNA が複製されることにより確認した。

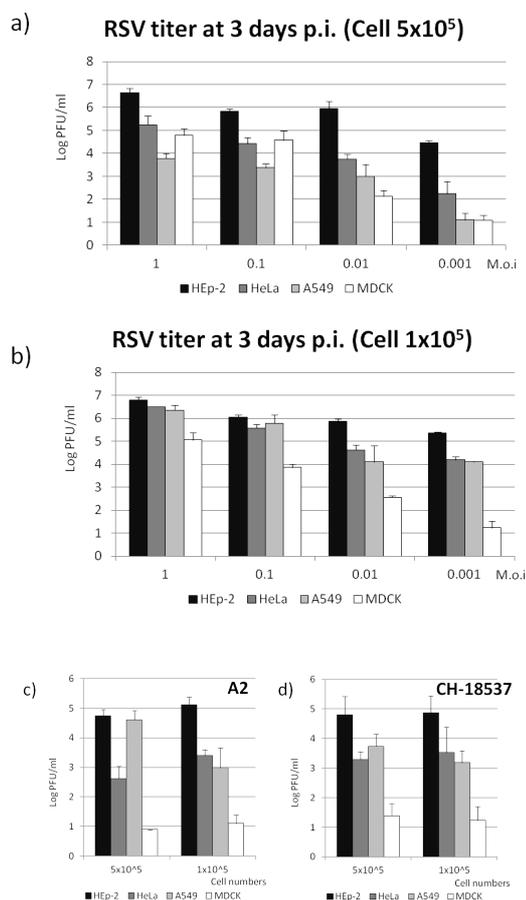
#### 4. 研究成果

##### MDCK の RSV 感受性について

まず、MDCK は RSV 低感受性であると考えているが、改めてウイルス感染実験の条件を検討するため、MDCK の細胞濃度、RSV のウイルス濃度別によるウイルス複製の違いの検討を行った(図 1 a, b)。結果として高濃度(a;  $5 \times 10^5$ )および低濃度(b;  $1 \times 10^5$ )の細胞ともに、MOI が高いほど、MDCK における RSV ウイルス(Long 株)力価は高いことがわかった。MOI=1 では HEp-2 細胞と比較すると、10 ~ 100 倍低くはあるが、MDCK 細胞においても  $10^5$  PFU/ml ほどの十分なウイルス複製が見られた。一方 MOI=0.001 では HEp-2 では  $10^4$  PFU/ml ほどのウイルス複製が見られた一方で、MDCK では  $10^1$  PFU/ml ほどでほとんど検出限界であり、その差は 1000 ~ 10000 倍と開いた。HeLa 細胞は MOI に従っ

て力価が下がるが、MDCK より複製効率は高かった。A549 細胞は細胞濃度が濃い場合は MDCK のように RSV 複製が低下したが、低濃度では HeLa 細胞と同程度の複製を示した。また、他の RSV 株(c; A2, d; 18537)も同様の複製動態を示した(図 1c,d)。もともと、RSV は MDCK で増えないわけではないが、通常巨細胞は形成されず、MDCK での継代を繰り返すことで CPE が見えるようになること 1979 年に報告されている(4)。しかし今回の結果から、RSV は MDCK 細胞に感染する事は可能であるが、多段階複製を行う事が困難である可能性が示唆される。以上の結果から、HEp-2 と MDCK における RSV 複製の差が最大となる条件、すなわち  $1 \times 10^5$  の細胞に MOI = 0.001 のウイルスを感染させることとした。

図 1

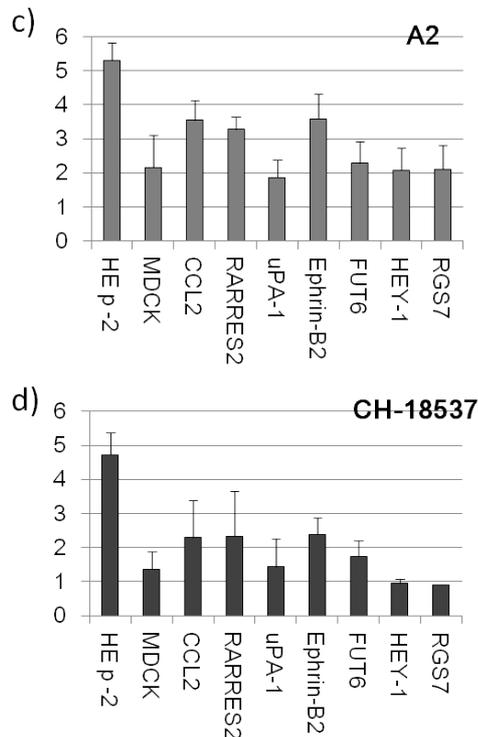
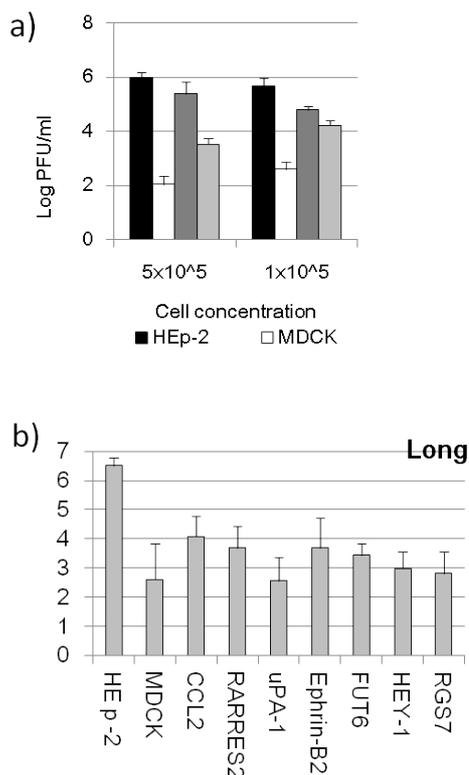


RSV 複製に關与する宿主因子のピックアップおよび RSV 複製への關与の検討

マイクロアレイ解析に用いたライブラリ導入クローンは D2H と E6 であるが、これらの細胞は上記の RSV 感染実験条件において、MDCK よりも十分に高いウイルス力価を示した(図 2a)。マイクロアレイ解析において、E6 と MDCK、D2H と MDCK に共通する遺伝子がピックアップされたが、そのうち遺伝子クローニングに成功し、かつ MDCK に恒常的発現させる事に成功したのは、CCL2、RARRES2、uPA-1、Ephrin-B2、FUT6、HEY-1、RSG7 の 7 種類であった。そしてこれらの細胞を用いて RSV 感受性の検討を行った。

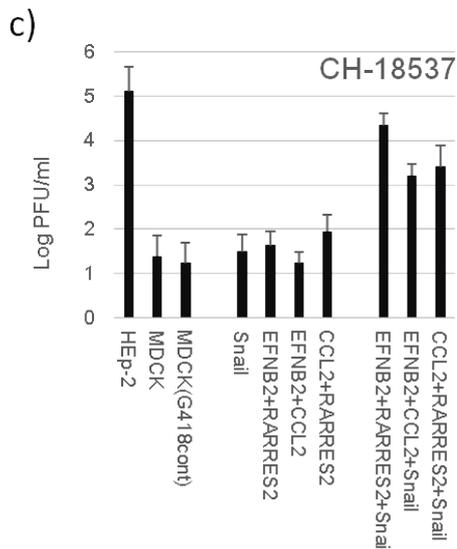
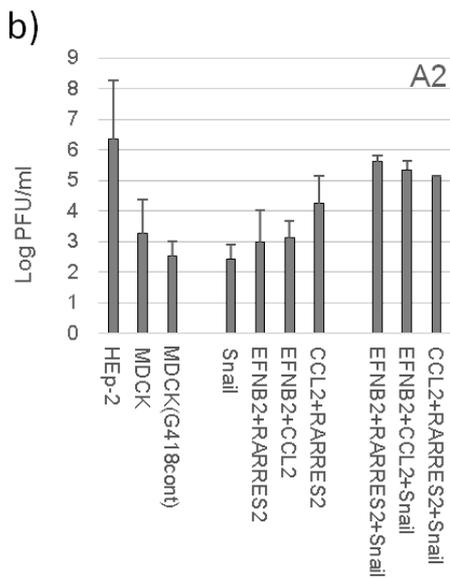
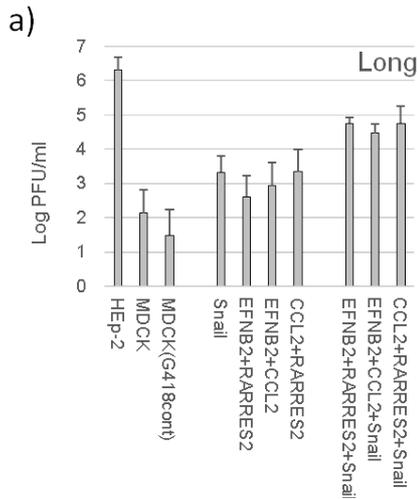
次に上記の得られた 7 つの細胞クローンを用い、それぞれの候補遺伝子が RSV 複製に与える影響について検討した(図 2b-d)。RSV3 株(Long、A2、CH-18537)それぞれにおいて、CCL2、RARRES2、Ephrin-B2 の 3 遺伝子で、約 10 倍程度のウイルス力価の増加が見られた。従って、これらの遺伝子が、RSV 複製において何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。しかし単独での発現では、十分なウイルス複製が見られなかった。

図 2



4. J Clin Microbiol. 1979. 9:175-179.

候補遺伝子の組み合わせ発現と RSV 複製  
単独発現では 10 倍程度の複製増強しか見られないため、ピックアップされた 3 遺伝子に加え、CCL2 と同様に occludin と claudin1 を阻害して tight junction 形成を阻害することが知られている Snail を含め、これらの遺伝子を組み合わせで発現させ、RSV 複製を調べた(図 3)。結果として、Snail 単体発現でのウイルス複製への影響は軽微であり、候補遺伝子を 2 つ組み合わせで発現させた場合でも、Long 株感染(3a)でのみ、力価の上昇が見られた、しかし 2 つの遺伝子に加えて Snail を発現させた場合、A2 および CH-18537 でも MDCK と比べて 100 倍程度のウイルス力価上昇が見られた(図 3b、c)。尚、Ephrin-B2、RARRES2、CCL2 を同時に発現する細胞、および Snail をさらに発現する細胞にこの実験は現在進行中である。以上の結果から、これらの因子が複合的に、RSV のウイルス複製に参与していることが示唆された。

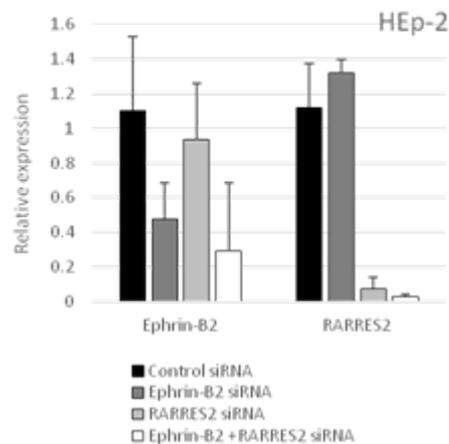


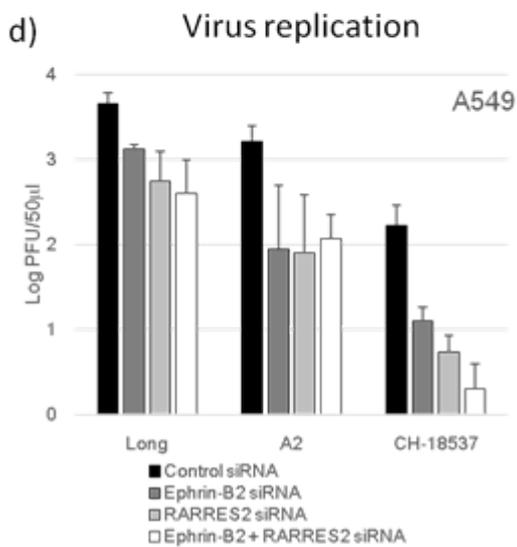
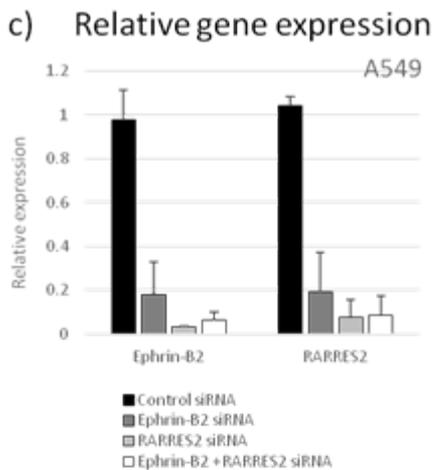
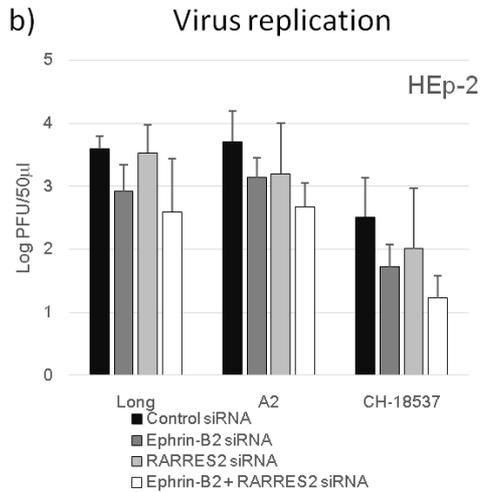
候補遺伝子のノックダウンが感受性細胞

での RSV 複製に与える影響

RSV 感受性の HEP-2 細胞、A549 細胞における遺伝子ノックダウンが、ウイルス複製に影響を与えるか否かを検討した。これらの細胞は極性細胞ではなく、タイトジャンクションが形成されないため、CCL2 および Snail は検討外とし、Ephrin-B2 と RARRES2 に注目してノックダウン実験を行った。これらの siRNA を形質導入した後、24 時間後にウイルスを感染させ、さらに 3 日後のウイルス力価を測定した(図 5)。HEP-2 細胞では siRNA により、想定通りの遺伝子ノックダウンが行えた(図 5a)。また Ephrin-B2 遺伝子単独のノックダウンで、わずかにウイルス複製の低下が見られ、Ephrin-B2、RARRES2 遺伝子の同時のノックダウンにより、用いた RSV3 株すべてで 10 倍ほどのウイルス複製の低下が見られた(図 5b)。A549 細胞では Ephrin-B2、RARRES2 それぞれのノックダウン処置で、両方の遺伝子がノックダウンされてしまったが、原因は不明である(図 5c)。しかし Ephrin-B2 および RARRES2 遺伝子両方のノックダウンにより、用いた RSV3 株すべてで 10 倍以上のウイルス複製低下が見られた(図 5d)。従って、ヒトの呼吸器上皮由来細胞においても、Ephrin-B2 および RARRES2 が RSV のウイルス複製に関与している事が示唆された。

a) Relative gene expression





結語

以上の結果より、MDCK 細胞では RSV の多段階複製が困難であり、これは Ephrin-B2 および

RARRES2 遺伝子、そしてタイトジャンクションの形成に依る可能性が示唆された。そして Ephrin-B2 および RARRES2 遺伝子は、ヒトの呼吸器上皮由来細胞である HEp-2、A549 細胞においても、RSV の多段階複製に関係していることが示唆された。従って、Ephrin-B2 および RARRES2 が RSV のウイルス複製に關与する宿主因子としてピックアップされた。今後はこれらの遺伝子が RSV のどのウイルス蛋白質と相互作用しているかの検討を行っていく必要がある。

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 )

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 )

Shirato K, Ujike M, Kawase M, and Matsuyama S. (2012). Increased Replication of Respiratory Syncytial Virus in the Presence of Cytokeratin 8 and 18. J Med. Virol. 84:365-370.

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

白戸憲也

( 国立感染症研究所ウイルス第 3 部 )

研究者番号 : 40415477

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし