

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791916
 研究課題名（和文）上気道粘膜上皮におけるウイルス認識受容体を介した生体防御機構の検討
 研究課題名（英文）Studies on biological defense mechanism via the pattern recognition receptor for viral infection in upper airway epithelium.
 研究代表者 大國 毅
 （OHUKUNI TSUYOSHI）札幌医科大学 医学部 助教
 研究者番号：40464490

研究成果の概要（和文）：上気道上皮は呼吸器系ウイルスに対する生体防御最前線に位置する。ウイルス感染の初期に働く自然免疫システム解明を目的とし、ヒト鼻粘膜上皮細胞を用い、RSウイルスをターゲットとした実験を行った。結果、ヒト鼻粘膜上皮細胞においては、1) パターン認識受容体のうち主に RIG-I がウイルス認識に関わっている、2) 抗ウイルス性サイトカインであるⅢ型インターフェロンが産生誘導される。また 3) 感染抑制する上皮バリア（タイト結合分子）の一部が、ウイルス感染に伴いその発現・局在を変化させていた。

研究成果の概要（英文）：The airway epithelium is the first line of biological defense during respiratory viral infection. In the present study, we made analysis of innate immune system against early phase viral infection in experiments on human nasal epithelial cells (HNECs) infected with RS virus. In our experiments, these results indicated that 1) RIG-I may play the major role in the recognition of RS virus, 2) RS virus infection induces the secretion of type III interferon, 3) RS virus infection changes the localization of tight junction proteins, claudin4 and occludin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：①鼻粘膜 ②ウイルス ③受容体 ④上気道 ⑤生体防御

1. 研究開始当初の背景

ウイルス核酸等の病原体由来微細構造物を、非自己であると検知するパターン認識受容体が自然免疫システムの主要な役割を果たす。研究者は二本鎖 RNA を認識するとされる Toll 様受容体 3 について、ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて実験を行ってきた。ウイルス核酸類似人工合成物(Poly I:C)で TLR3 を刺激すると、炎症性サイトカイン産生やタイト結合分子発現・局在変化が誘導され、これにはシグナル分子 EGFR, MAPK, PI3K, NF-kB が関与することを認め、これらがウイルス感染に対する新規治療薬のターゲットとなり得ることを示した (Ohkuni T et al.

Toxicol Appl Pharmacol. 2011)。

しかし最近の研究では、細胞膜またはエンドソーム膜上に発現する TLR とは異なり、細胞質内の局在するパターン認識受容体 RIG-I, MDA5 がウイルス感染初期での中心的役割を果たすと注目されている。そこで本研究では人工合成物ではなく実際のウイルス感染モデルを用いて、呼吸器ウイルスに対する鼻粘膜上皮の生体防御、自然免疫メカニズムを解明することとした。

2. 研究の目的

呼吸器ウイルスのうち、RS ウイルスは小児科領域における下気道病変重篤化に関わるとされる、重要な病原体である。耳鼻咽喉

科領域でも、2歳未満の乳幼児急性中耳炎での検出率が高く、急性中耳炎発症の危険因子と考えられている。またこれまでのわれわれの研究から、RSウイルスは鼻粘膜上皮を標的としていることが示唆されている。そこでRSウイルスを用い、①ウイルス感染・複製・出芽、②抗ウイルス性サイトカイン、③ウイルス核酸の認識受容体、以上に関わるメカニズムを解明し新規ウイルス治療戦略に結びつけることを目的とした。

3. 研究の方法

①hTERTを遺伝子導入し延命化した正常ヒト鼻粘膜上皮細胞へのRSウイルス感染モデルを確立する。

②抗ウイルス性サイトカイン、パターン認識受容体、シグナル分子の遺伝子発現についてマイクロアレイを用い網羅的解析を行う。

③抗ウイルス性サイトカインであるインターフェロンについて、いずれの型が主として作用しているか、PCR法、ELISA法を用いRNAレベル、蛋白レベルで検討する。

④RSウイルス蛋白に対する免疫染色、また電子顕微鏡的解析を用い、ウイルスの侵入・出芽の、特に細胞頂部および基底膜部いずれの方向から侵入し出芽するか解析する。

⑤最近、自然免疫を担う上皮バリア(タイト結合分子)とパターン認識受容体の関連性について報告がなされている。ウイルス感染に伴うタイト結合分子の発現局在の変化、および上皮バリア機能の変化について解析する。

4. 研究成果

①RSウイルス感染モデルが正常ヒト鼻粘膜上皮細胞を用いて確立され、今後抗ウイルス治療の評価系としても用いることが可能となった。

②ヒト鼻粘膜上皮へのRSウイルス感染様式は、細胞頂部側から侵入し、ウイルス複製なされた後細胞頂部側から出芽することが確認された。またウイルス感染に伴いタイト結合分子の一部が細胞膜へリクルートされ、生体の上皮バリア機能増加だけでなく、ウイルスの頂部側からの出芽に利用されている可能性が示唆された(Masaki T et al. Mol Biol Cell. 2011)。

③RSウイルス感染に伴い、I型ではなくIII型インターフェロンの発現誘導がRNAレベルおよび蛋白レベルで確認された。またこの発現誘導にはパターン認識受容体のうちRIG-Iが主要な役割を果たしていることがsiRNAによる実験で認められた。

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 7件)

1. Regulation of tight junctions in upper airway epithelium. Kojima T, Go M,

Takano K, Kurose M, Ohkuni T, Koizumi J, Kamekura R, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Obata K, Hirakawa S, Nomura K, Keira T, Miyata R, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Biomed Res Int. 2013 doi: 10.1155/2013/947072. Epub 2012 Dec 29. 査読有

2. Hop water extract inhibits double-stranded RNA-induced thymic stromal lymphopietin release from nasal epithelial cells. Fuchimoto J, Kojima T, Kobayashi N, Ohkuni T, Ogasawara N, Masaki T, Obata K, Nomura K, Kondoh A, Shigyo T, Himi T, Sawada N. Am J Rhinol Allergy. 2012; 26(6):433-438. 査読有

3. Altered expression of claudin-1, claudin-7, and tricellulin regardless of human papilloma virus infection in human tonsillar squamous cell carcinoma. Kondoh A, Takano K, Kojima T, Ohkuni T, Kamekura R, Ogasawara N, Go M, Sawada N, Himi T. Acta Otolaryngol. 2011 Aug 131(8):861-868. 査読有

4. Poly (I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNF α via distinct NF- κ B pathways in human nasal epithelial cells. Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi J, Ichimiya S, Murata M, Tanaka S, Himi T, Sawada N. Toxicol Appl Pharmacol. 2011 1;250(1):29-38. 査読有

5. Mucosal immune barrier and antigen-presenting system in human nasal epithelial cells. Himi T, Takano K, Ogasawara N, Go M, Kurose M, Koizumi J, Kamekura R, Kondoh A, Ohkuni T, Masaki T, Kojima T, Sawada N, Tsutsumi H. Adv Otorhinolaryngol. 2011; 72:28-30. 査読有

6. A nuclear factor- κ B signaling pathway via protein kinase C delta regulates replication of respiratory syncytial virus in polarized normal human nasal epithelial cells. Masaki T, Kojima T, Okabayashi T, Ogasawara N, Ohkuni T, Obata K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirakawa S, Fuchimoto J, Ninomiya T, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Mol Biol Cell. 2011 1;22(13): 2144-2156. 査読有

7. Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human

adenoids. Ogasawara N, Kojima T, Go M, Takano K, Kamekura R, Ohkuni T, Koizumi J, Masaki T, Fuchimoto J, Obata K, Kurose M, Shintani T, Sawada N, Himi T. Acta Otolaryngol. 2011 131(2): 116-123. 査読有

[学会発表] (計 3件)

1. 小幡和史, 小島隆, 正木智之, 平川賢史, 野村一顕, 高澤啓, 澗本潤, 大國毅, 横田伸一, 澤田典均, 氷見徹夫. 上気道粘膜上皮におけるウイルス関連受容体を介した生体防御機構の検討. 2012年9月6-8日 下関市
2. Ohkuni T, Himi T, Sawada N, Kojima T, Kamekura R, Ogasawara N, Masaki T. Poly IC Stimulation Reduces Expression of JAM-A and Induces Proinflammatory Cytokines Secretion via Distinct NF-kB Pathways in Human Nasal Epithelial Cells. XIV IRS, XXX ISIAN 2011 2011年9月20日-23日 東京都
3. Masaki T, Kojima T, Ogasawara N, Ohkuni T, Obata K, Fuchimoto J, Sawada N, Himi T. A NF-kappa B Signaling Pathway via PKC-delta Regulates Replication of Respiratory Syncytial Virus in Polarized Normal Human Nasal Epithelial Cells. XIV IRS, XXX ISIAN 2011 2011年9月20日-23日 東京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者 大國 毅

(OHKUNI TSUYOSHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40464990

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 氷見 徹夫

(HIMI TETSUO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90181114