

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890106

研究課題名(和文) 2型インターフェロンによる抗ウイルス機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of antiviral responses by type-II Interferon

研究代表者

笹井 美和 (Sasai, Miwa)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30631551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスが生体で最初に感染する粘膜上皮細胞での抗ウイルス機構の解明は、感染を早期に食い止める上でも非常に重要である。ウイルスの中でも単純ヘルペスウイルスは、口腔・眼・膣粘膜より生体に感染し、その感染はII型インターフェロンにより制御される事が知られているが、詳細な感染防御機構は不明な点が多い。本研究はII型インターフェロン刺激による抗ウイルス機構に着目して解析を行い、II型インターフェロンによって粘膜上皮細胞に発現が誘導される分子の中で、抗ウイルス作用を持つ可能性のある分子を、新たに複数個同定した。

研究成果の概要(英文)：Viral infections occur at mucosal surfaces. It is important to prevent viral infection at mucosal surfaces because it is initial place. Herpes simplex virus (HSV) infect at mucosal surfaces of oral, ocular and genital. It has been reported that the protection against HSV infection are type-II interferon (IFN-gamma) dependently, especially secondary infection. However, the molecular mechanism is completely unclear. In this work, we examine the molecular mechanism of IFN-gamma mediated anti-viral immune responses, especially HSV infection. We did microarray analysis to identify gene that is involved in anti viral immune responses against HSV infection using mouse primary keratinocytes and we successfully identified the candidate molecules those are involved in suppress viral replication IFN-gamma dependently. These data highly assumed that this is a new mechanism of antiviral immune responses that is regulated by IFN-gamma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：感染防御

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスは DNA ウイルスであり、皮膚の傷口や粘膜より感染し、感染局所に痛みを伴う水疱を形成することが知られています。ヘルペスウイルスは他のウイルスとは異なり、脊髄神経節や三叉神経節・仙骨神経節といった神経細胞に潜伏感染することが特徴です。潜伏感染していても、通常は免疫機構が働いて活性化を防いでいるため、健康に全く問題はありますが、ひとたび免疫機能が低下すると、再活性化して感染局所に再び水疱を形成する、回帰感染を引き起こす事が問題視されています。

ヘルペスウイルスの回帰感染を防いでいる免疫機構を理解する上で、ヘルペスウイルスを雌マウスの膺より感染させる実験系は、マウスを殺さずに経時的に感染局所の状況を観察できるため、非常に有用です。ヘルペスウイルスの弱毒株を感染させたマウスを最低三週間飼育し、弱毒株が存在しなくなっていることを確認してから、強毒株を二次感染させた際に見られる免疫応答について解析した結果、弱毒株感染によって誘導された記憶 CD4 陽性細胞が、強毒株感染によって抗原特異的に II 型インターフェロンである IFN-gamma を産生し、産生された IFN-gamma は膺粘膜上皮細胞に作用する事によって、強毒株感染を抑制している事が明らかとなっていました。しかし、膺粘膜上皮細胞に作用した IFN-gamma がどのように作用する事によって強毒株の感染を制御しているのかについては不明でした。

2. 研究の目的

本研究は膺粘膜上皮細胞に IFN-gamma が作用した際に誘導される抗ヘルペスウイルス機構の作用機序の解明を目的としました。

3. 研究の方法

ヘルペスウイルスの弱毒株を免疫したマウスで見られた IFN-gamma による膺粘膜上皮細胞での抗ヘルペス応答が、培養細胞に *in vitro* でウイルスを感染させた際にも同様に見られるかについて検討を行った所、培養細胞を用いた実験系においても IFN-gamma 刺

激によってウイルス感染の抑制が認められました。そこで、マウス初代角質細胞ならびにマウス初代線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast, MEF) の培養液にヘルペスウイルスを添加してウイルスを細胞に感染させ、IFN-gamma 刺激を行い、下記の実験を行いました。

(1) ウイルス感染細胞数の検討

野生型または遺伝子欠損 MEF 細胞にヘルペスウイルスを感染させ、感染後様々な時間に IFN-gamma を 2 ng/ml の濃度で添加し、感染後 48 時間のウイルス陽性細胞数について、ウイルス蛋白質に対する抗体を用いてフローサイトメトリーにて解析を行いました。また、細胞内にウイルス蛋白質が蓄積しているかどうかを検討するため、ウイルス感染後 48 時間の細胞の細胞膜に穴を空け、感染細胞内に存在するウイルス蛋白質と細胞表面に存在するウイルス蛋白質の両方を合わせたウイルス蛋白質陽性細胞数についてフローサイトメトリーを用いて解析を行いました。

STAT1 の阻害剤であるフルダラビルはウイルス感染の 1 時間後に 50 μ M の濃度で培養上清に加え、その 1 時間後に IFN-gamma を添加し、ウイルス感染 48 時間後のウイルス感染細胞数について同様に解析を行いました。

また、IFN-gamma 刺激によって発現が誘導される遺伝子群としてマイクロアレーにより同定された各遺伝子は、それぞれクローニングし、レトロウイルスベクターに組み込みました。これらの遺伝子を発現するレトロウイルスを作成し、野生型 MEF 細胞に感染させ、各遺伝子を発現している細胞を濃縮した後、ヘルペスウイルス感染を行った際のウイルス陽性細胞数について、フローサイトメトリーを用いて解析を行いました。

(2) ウイルス蛋白質の翻訳に対する

IFN-gamma の影響

ヘルペスウイルス蛋白質の翻訳における IFN-gamma 刺激の効果について解析を行うため、野生型 MEF 細胞にヘルペスウイルスを感染させ、IFN-gamma 刺激の有無におけるウイルスタンパク量の変化について、ヘルペスウイルス蛋白質に対するポリクローナル

抗体を用い、ウエスタンブロッティング法で検討を行いました。

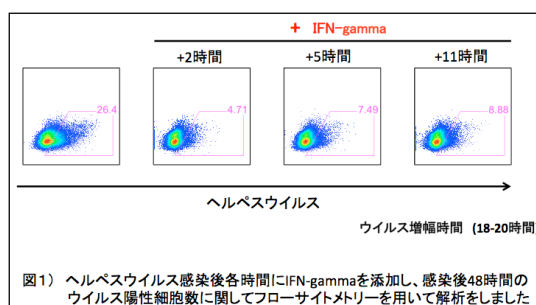
(3) ウイルス mRNA に対する定量 PCR

ヘルペスウイルスのウイルス mRNA はその転写順序によって三段階に分類する事が可能です。それぞれの段階のウイルス mRNA 転写に対する IFN-gamma 刺激の影響について検討するため、それぞれの段階のウイルス mRNA を 2-3 遺伝子選び、MEF 細胞にウイルスを感染させた後のウイルス mRNA の誘導量について、定量 PCR 法を用いて解析を行いました。

4. 研究成果

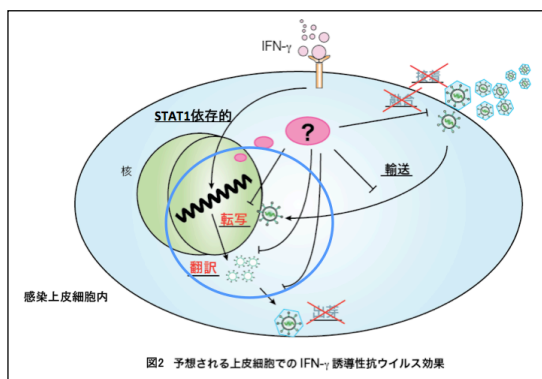
上皮細胞において、IFN-gamma による抗ヘルペスウイルス応答に関与している分子群を同定するために、まず IFN-gamma 刺激によるどのような要素が抗ウイルス機構に関与しているのかについて検討を行いました。IFN-gamma は IFNGR1 と IFNGR2 のヘテロ二量体からなる受容体によって認識され、JAK1/JAK2 というチロシンキナーゼを介して転写因子である STAT1 が活性化される事により、様々な遺伝子の発現が誘導される事が知られています。そこで、IFN-gamma 受容体からのシグナル伝達機構そのものが、抗ウイルス機構に関与しているのか、それとも STAT1 を介した発現誘導遺伝子が関与しているのかについて検討を行うため、STAT1 阻害剤存在下または STAT1 欠損 MEF 細胞でウイルス感染を行いました。その結果、STAT1 阻害剤存在下ならびに STAT1 欠損 MEF において、IFN-gamma 刺激による抗ヘルペスウイルス作用は顕著に減少した事から、IFN-gamma による抗ウイルス作用は STAT1 依存的な誘導性遺伝子によって担われている事が暗示されました。次に、IFN-gamma 誘導性遺伝子のうち、IFN-gamma 刺激後どの程度の時間で発現が誘導されている遺伝子群に抗ウイルス作用があるのかを検討するため、ウイルス感染後の様々な時間において IFN-gamma 刺激を行い、ウイルス増殖量について解析を行いました。ヘルペスウイルスは 18-20 時間で 1 サイクルの増殖を行う

事が知られていますが、ウイルス感染後 11 時間を経過した細胞培養液に IFN-gamma 刺激を行ってもその抗ウイルス効果を確認する事ができました (図 1)。



また、IFN-gamma による抗ウイルス作用がウイルス増殖のどの段階に作用して抗ウイルス作用を示しているのかについて検討を行いました。ウイルス蛋白質の翻訳が抑制されているかどうかについて検討するため、ウイルス蛋白質特異的な抗体を用いて、IFN-gamma による発現誘導阻害についてウエスタンブロッティング法を用いて解析した所、多くのウイルス蛋白質の発現が抑制されている事が明らかになり、この事からウイルス蛋白質をコードしている mRNA の発現制御に IFN-gamma 誘導性の分子は関与しているのではないかと考えられました。ヘルペスウイルスは、3 段階に分けてカスケード状に各段階の mRNA の発現を制御している事が知られています。ウイルス mRNA 転写のどの段階で IFN-gamma 誘導性遺伝子による抗ウイルス作用を受けているのかを検討するため、各段階から 2-3 遺伝子を選択し、それぞれの段階のウイルス mRNA について解析を行いました。その結果、最初の段階である最初期遺伝子 (Immediately early gene) に分類されるウイルス mRNA においてもその発現の減少が認められた事から、IFN-gamma 誘導性遺伝子の中にヘルペスウイルス転写の早期に作用してウイルスの増殖を抑制している事が明らかとなりました。これらの結果から、IFN-gamma 刺激後比較的早期に発現が誘導される遺伝子の中に、ヘルペスウイルスの mRNA 転写を阻害またウイルス蛋白質の翻訳を阻害する事によって抗ウイルス作用を誘導する遺伝子

が含まれる事が暗示されました (図 2)。



そこでIFN-gamma刺激によって上皮細胞に発現が誘導されてくる遺伝子について網羅的に同定する目的でマイクロアレー解析を行いました。その結果、IFN-gamma刺激によって上皮細胞に発現が誘導される遺伝子群は、GTPase活性を含む遺伝子群、遺伝子複製/修復に関与する事が報告されている遺伝子のファミリー群、宿主免疫系分子の修飾に関与する遺伝子群、機能未知の遺伝子群の4群に大別する事ができました。それぞれの遺伝子群による抗ヘルペスウイルス応答について解析を行うため、それぞれの遺伝子をクローニングし、レトロウイルスベクターに組み込みました。このベクターを用いてウイルス粒子を作成し、野生型MEF細胞に発現させる事によって、候補遺伝子を発現しているMEF細胞を作成し、それぞれの遺伝子による抗ヘルペスウイルス応答について検討を行った所、GTPase活性を持つ遺伝子群と遺伝子複製・修復に関与している事が報告されている遺伝子のファミリー群において抗ウイルス応答が認められました。これらの結果から、これらの遺伝子群の中にIFN-gammaを介した抗ヘルペス機能を持つ分子があると考えられ、現在詳細な解析を行っています。

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4件)

- (1) Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Su Ma J, Kamiyama N, Matsuura Y,

Pann-Ghill S, Hayashi M, Ebisu S, Takeda K, Akira S, Yamamoto M. Role of mouse and human autophagy proteins in IFN- γ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 査読あり, 192(7), 2014, 3328-35, DOI: 10.4049/jimmunol.1302822.

- (2) Ono C, Ninomiya A, Yamamoto S, Abe T, Wen X, Fukuhara T, Sasai M, Yamamoto M, Saitoh T, Satoh T, Kawai T, Ishii KJ, Akira S, Okamoto T, Matsuura Y. *J Virol*. 査読あり, 88(4), 2014, 2157-67, DOI: 10.1128/JVI.03055-13.
- (3) Sasai M, Yamamoto M. *Int Rev Immunol*, 査読有り, 32(2), 2013, 116-33, DOI: 10.3109/08830185.2013.774391.
- (4) Kamiyama N, Yamamoto M, Saiga H, Ma JS, Ohshima J, Machimura S, Sasai M, Kimura T, Ueda Y, Kayama H, Takeda K. *PLoS One*, 査読あり, 8(2), 2013, e55800, DOI: 10.1371/journal.pone.0055800.

[学会発表] (計3件)

- (1) 山本雅裕, 大嶋淳, 馬知秀, 笹井美和, 李英愛. IFN- γ 依存性抗トキソプラズマ応答におけるオートファジー蛋白質の役割. 第83回日本寄生虫学会大会. 2014年3月27日-28日. 愛媛
- (2) JiSu Ma, Miwa Sasai, Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto. Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense protein GRA6. *JSI 2013*. 2013年12月11日-13日. 幕張メッセ
- (3) 大嶋淳, 笹井美和, 山本雅裕, 林美加子. インターフェロン γ 依存性の細胞内侵入病原体排除におけるオートファジー感染タンパク質の役割の解明. 第138回日本歯科保存学会春季学術大会 2013年6月27日-28日. 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 美和 (SASAI, Miwa)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30631551

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし