

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293370

研究課題名(和文) 抗ウイルス自然免疫応答解析による上気道疾患病態解明と治療戦略個別化の探索

研究課題名(英文) Analysis of anti-viral innate immunity and therapeutic strategies for upper respiratory disease.

研究代表者

氷見 徹夫 (Himi, Tetsuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90181114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：RSV感染で誘導される， β 型インターフェロンの産生をクラリスロマイシン(CAM)は抑制した。これには転写因子としてのIRF3が関与しているが，CAMはIFN- β のプロモーター領域の転写因子活性を抑制することが分かった。RSVで誘導されるリン酸化にはCAMは関与していないが，CAMはpoly I:CやRSV感染によりIRF3の二量体形成，細胞質から核内への移行するのを阻害してすることで炎症性サイトカイン産生やIFN誘導抑制効果を示すと考えられ，気道上皮のウイルス炎症を抑制する薬剤の新たな機序を解明した。また，ストレス顆粒やNIP-SNAPとウイルス性炎症とのかわりを解明した。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of CAM on production of cytokines, CAM significantly suppressed RSV-induced production of IFN- β , α and γ . CAM dramatically suppressed RSV-induced promoter activity, which is an IRF3 binding element. RSV-induced phosphorylation of IRF-3 did not alter in the presence of CAM. CAM inhibits IRF3 dimerization and its subsequent nuclear translocation from cytosol upon stimulation with poly I:C or RSV. In conclusion, CAM suppresses the production of pro-inflammatory cytokines and IFNs induced by virus-related stimuli, such as RSV and poly I:C. CAM exerts these effects by inhibiting the dimerization and subsequent nuclear translocation of IRF3 in airway epithelial cells. NIP-SNAP and MuV-induced SGs partly suppressed viral-induced type I IFN production and suppressed the production of pro-inflammatory cytokines.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：上気道感染 ウイルス RSVウイルス インターフェロン IRF3 気道上皮細胞

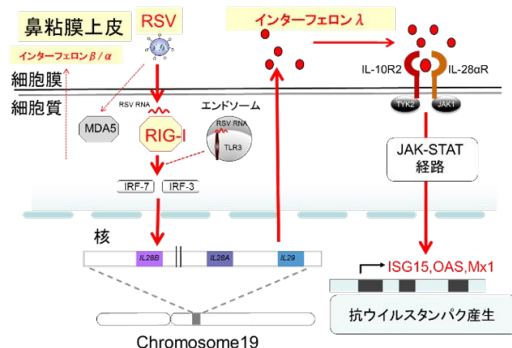
1. 研究開始当初の背景

呼吸器ウイルスの侵入に対する防御機構で重要なのは、RIG-I や MDA5 によるウイルスの認識とそれによって誘導されるインターフェロン (interferon; IFN) である。抗ウイルス作用の中心として IFN- β が有名であるが、これは IFN- β とともに α 型 IFN に分類されている。 α 型 IFN はあらゆる細胞において誘導され、分泌された IFN は周囲の細胞表面のレセプターに結合しその活性を発揮する。作用を受けた細胞は抗ウイルス活性を持つ分子の発現を誘導する。

α 型 IFN (IFN- α) のほかに、新たに λ 型 IFN [IFN-ラムダ (λ) ファミリー] が発見された。IFN- λ レセプター発現は主に上皮細胞に制限される。 λ 型 IFN が多種の細胞に受容体があることは対照的である。この限定的な発現から、IFN- λ は皮膚と粘膜表面でのウイルス侵入の防止に参与すると推定されている。

ヒト鼻粘膜上皮細胞の抗ウイルス自然免疫応答についての検討では、呼吸器ウイルス感染に応答して λ 型 IFN (I 型 IFN でなく) を誘導することをわかった。重要な点は λ 型 IFN は呼吸器ウイルスが感染した場合に主に分泌される IFN という点である。すなわち、鼻粘膜上皮への感染初期には IFN- β / γ でなく IFN- λ が抗ウイルス作用の主体となっている可能性が高い (下図)。

鼻粘膜上皮での IFN- λ を介したウイルス抑制作用を持つ活性物質の探索は実際の治療に応用できる物質を同定し新しい治療戦略を作り上げることができる。この研究ではウイルス受容体、IFN 受容体、細胞内シグナル、ウイルスの細胞内輸送のそれぞれの制御が IFN サブタイプのそれぞれがどのように影響するかをあらかじめ確認し、その中から標的分子産生・作用の絞り込みを行う。また、すでにウイルス抑制作用が確認されている活性物質について、IFN システムにどのように変化をもたらすかの両面から解析を進め新たな創薬の基盤を作り上げる。

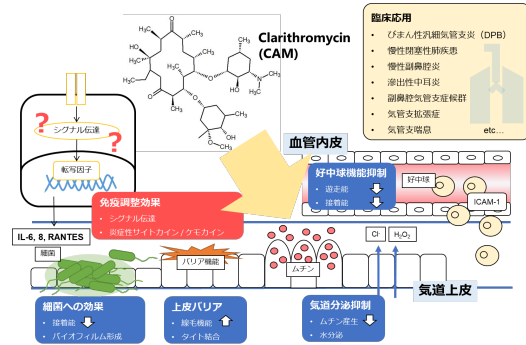


2. 研究の目的

2-1. 生理活性物質の抗ウイルス作用の機序解明

クラリスロマイシン (CAM) は 14 員環マクロライド系抗菌薬の一つで、抗菌効果以外

に抗炎症作用を持つことが知られている (図)。臨床においてはマクロライド長期少量投与療法が抗炎症効果を期待して選択される。CAM の抗炎症作用機構の本態は ERK, NF- κ B, MAPK などのシグナル伝達を抑制することによる炎症性サイトカイン産生抑制であると推測されているがメカニズムはいまだ不明である。このような背景から、ウイルス感染における CAM の抗炎症作用機構を詳細に検討し、その作用点を解明することは極めて重要な意味を持つ。



2-2. 宿主自然免疫によるウイルス感染防御機構

自然免疫系は宿主が外来病原体を認識するために備えている防御機構である。Toll 様受容体 (Toll-like receptors: TLRs), RIG-I 様受容体, NOD 様受容体などのパターン認識受容体がウイルスゲノムなどを認識するが、シグナル伝達経路は複雑であり、その制御機構はいまだ不明な点が多い。さらに近年、呼吸器感染性ウイルスは TLR3 とは独立したシグナル伝達経路によって IFN の産生を誘導することが明らかとなっている。TLR3 依存、非依存経路ともに最終的に NF- κ B 転写因子あるいは IFN 調節因子の活性化を介して type I, III IFNs 産生を誘導することがわかってきたためこの点に着目して検討した。

2-3. IFN 産生のための細胞内機構の解明

Type I, III IFN はあらゆるウイルス感染に対して宿主の炎症反応を惹起することで、非特異的に抗ウイルス効果のあるサイトカインとして知られている。産生された type I, III IFN は主にウイルスにまだ感染していない細胞の IFN 受容体に作用し、炎症性サイトカインを誘導することで、細胞を抗ウイルス状態に導く。しかし、ウイルスがその細胞ですでに感染している状況では、その高度な炎症惹起反応が逆に宿主に有害であることが近年指摘されている。

さらに、この CAM の作用機序を細胞内構築物から解明することも必要で、この研究課題では NIP-SNAP1 および NIP-SNAP2 とストレス顆粒というウイルス感染と関連が深い構造物にも着目して研究を進める。

コロナウイルスを用いたげっ歯類の系でウイルス増殖に対し type I IFN 産生が遅延した群において臨床的重症度が悪化するこ

と、IFN 非産生群ではウイルス量の増加は見られるものの、臨床病態の著明な悪化は見られないこと、感染極早期に IFN を投与する群では、炎症反応が適切に誘導され続いて収束に向かうように調整され、臨床病態が緩和される。すなわち、過剰で持続的な IFN 産生の弊害と IFN の感染極初期における重要性について知る必要がある。そこで、type I, III IFN 産生を抑制する細胞内機構を解明することは、ウイルス感染初期に動員される IFN の本質に迫ることができ、新たな上気道ウイルス感染症の治療戦略につながる可能性がある。

3. 研究の方法

同意が得られた患者の鼻粘膜から作製した hTERT 導入鼻粘膜上皮細胞 (hTERT-HNEC)、肺胞上皮由来細胞株 (A549)、ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B) を上気道上皮細胞として検討に用いた。これらの細胞に RSV 感染、ムンプスウイルス感染もしくは TLR3 のリガンドである PolyI:C 処置を行い、誘導されるサイトカインに対する活性物質 CAM の影響を検討した。IL-6, Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), IFN- γ , IFN- β , IFN- λ の細胞培養液中濃度は ELISA 法で測定した。

さらに RSV, ムンプス誘導性サイトカイン産生の抑制機序を明らかにするために、それらサイトカインの産生を制御している転写因子の活性をルシフェラーゼレポーター遺伝子法により検討した。ウイルス量はプラーク法により検討し、IRF-3 の活性化、シグナル伝達経路の評価をウエスタンブロット法 (WB 法) によるリン酸化の定量, native PAGE を用いた二量体形成の有無, ストレス顆粒などは免疫染色により解析し検討した。

また、NIP-SNAP1 および NIP-SNAP2 の検討は siRNA, セファロスゲルを用いた CAM への結合, TLR 刺激によるサイトカイン産生の変化を検討した。ストレス顆粒の検討では RNA 解析, siRNA を用いた検討, 免疫組織学的検討, NF- κ B の活性化について検討した。

4. 研究成果

4-1. CAM は RSV 誘導性 type I IFN の産生を抑制する。

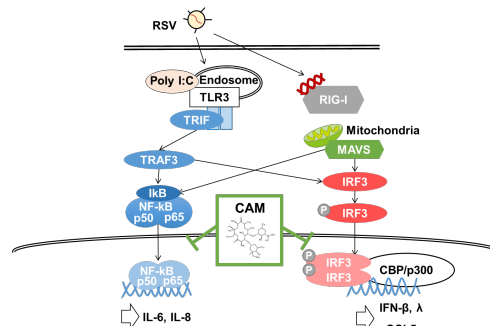
ヒト上気道上皮細胞に RSV を感染させ、CAM 処置の有無によるウイルス量の変化 (24 時間) をプラーク法で定量したが、上皮細胞から産生されたウイルス量において CAM 処置による増減は見られなかった。続いて、上皮細胞内の RSV 構造タンパクの発現を比較した。WB 法による RSV 構造タンパクの発現量は CAM 処置による変化を認めなかった。以上より検討した範囲の MOI, 感染時間では CAM 処置は RSV の増殖に影響を与えない。

続いて hTERT-HNEC, A549 において PolyI:C 処置もしくは RSV 感染を行い、CAM 処置による IL-6, CCL5, type I, III IFN (IFN- β , - λ , - γ), の産生量の変化を計測した。RSV

感染によって誘導される IL-6, CCL5, type I, III IFNs 産生は CAM 処置によって有意に抑制された。以上のことから、CAM は自然免疫にかかわるサイトカイン産生を抑制していることが判明した。

4-2. CAM は IFN- β のプロモーター領域の転写因子活性を抑制する。

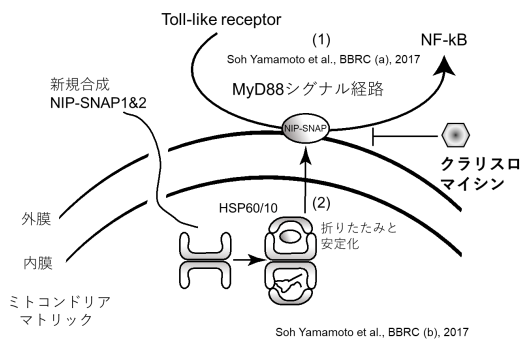
CAM によるサイトカイン産生抑制効果の作用機序を検討するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子法を用いて転写因子活性を検討した。IFN- β プロモーター領域 (IFN- β -P125) には AP1, NF- κ B, IRF が結合する positive regulatory domain (PRD) があり、その中でも PRD III, PRD I は IRF-3 の結合領域である [30]。われわれは IFN- β -P125 もしくは PRD III-I 領域の転写活性の検討を行った。A549 に PolyI:C 処置を行うと、IFN- β -P-125 と PRD III-I の制御下のレポーター遺伝子は活性化され、その活性は CAM 処置により抑制された。同様に RSV 感染により活性化された IFN- β -P-125 と PRD III-I 制御下のレポーター活性も CAM 処置により有意に抑制された。さらに CAM はムンプスウイルス感染により活性化された IFN- β -P-125 のレポーター活性も有意に抑制した。IFN- β のプロモーター領域のうち、CAM 投与によって NF- κ B および AP-1 の活性が抑制されることについては報告、推測されていたが、IRF-3 の関与の報告はこれまでになく、我々はさらに IRF-3 の活性化抑制機構について詳細に検討した。TBK1 と IRF-3 は RSV 感染により強くリン酸化されたが、CAM 処置はそれらのリン酸化に影響を与えなかった。IRF-3 の細胞内局在を免疫染色で検討したところ PolyI:C 処置, RSV 感染により IRF-3 は細胞質から核へ移行するが、CAM 処置により IRF-3 の核移行が有意に阻害された。さらにわれわれは、BEAS-2B を用いて NativePAGE による IRF-3 の二量体形成を検討した。RSV 感染により二量体形成の誘導が見られたが、CAM 処置により二量体形成は抑制されていた。これらの結果から、CAM は RSV により誘導される IRF-3 の二量体形成を抑制することで、以下の図のようにシグナル伝達経路を止めていることが示された。



4-3. NIP-SNAP による NF- κ B の活性化。

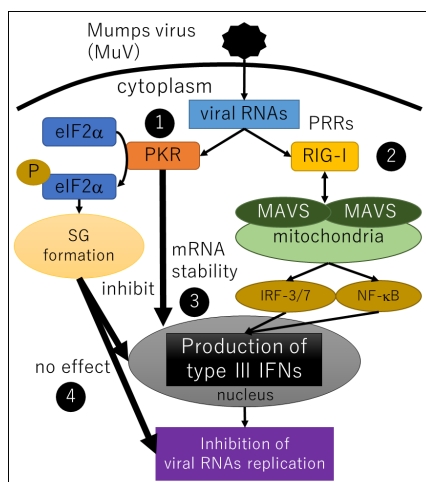
ミトコンドリア機能やオートファジーに関連するユビキチンタンパク NIP-SNAP はミトコンドリア外膜に存在し、CAM と結合するこ

とが分かった。さらにこの自然免疫関連因子がCAMと結合することにより炎症性サイトカインの抑制に関与していることが分かった。これらのNIP-SNAP1およびNIP-SNAP2はNF- κ Bを介するサイトカインの産生に関与しており、これらのメカニズムもCAMの抗炎症作用と関連していることが分かった。さらに、ミトコンドリア分子シャペロンのHSP60によって安定化される。このことはウイルス感染が引き起こす炎症作用の抑制に対する新たな展開が期待できる成果である。



4-4. ストレス顆粒によるIFN産生制御

ウイルス感染により現れるストレス顆粒(SGs)はMuV感染によっても出現し、その顆粒形成はPKR依存性であることが分かった。また、MuVはパターン認識受容体のうちRIG-Iによって認識され、MAVSと関連してIFNを産生することが分かった。さらに、MuV感染において形成されるSGsは型III IFN mRNAの安定性を調節し、IFN産生を抑制している可能性があることが分かった、このことは、粘膜のウイルス感染に重要な型III IFNの制御の機序に関与している可能性がある。MuV感染においてPKR活性化及びSGs形成はウイルス複製には影響がないことから、ウイルス制御の面でも新たな発見といえる。下図にストレス顆粒のウイルス感染での位置づけをまとめた。



5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計13件)

1. Yamamoto K, Ogasawara N, Yamamoto S, Takano K, Shiraishi T, Sato T, Tsutsumi H, Himi T, Yokota SI. Evaluation of consistency in quantification of gene copy number by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction and virus titer by plaque-forming assay for human respiratory syncytial virus. *Microbiol Immunol.* 2018 Feb;62(2):90-98. doi: 10.1111/1348-0421.12563. (査読有)
2. Ohkoshi Y, Sato T, Suzuki Y, Yamamoto S, Shiraishi T, Ogasawara N, Yokota SI. Mechanism of Reduced Susceptibility to Fosfomycin in *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Biomed Res Int.* 2017;2017:5470241. doi: 10.1155/2017/5470241. (査読有)
3. Ogasawara N, Poposki JA, Klingler AI, Tan BK, Weibman AR, Hulse KE, Stevens WW, Peters AT, Grammer LC, Schleimer RP, Welch KC, Smith SS, Conley DB, Raviv JR, Soroosh P, Akbari O, Himi T, Kern RC, Kato A. IL-10, TGF- β , and glucocorticoid prevent the production of type 2 cytokines in human group 2 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Mar;141(3):1147-1151.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2017.09.025. (査読有)
4. Kaneko Y, Kohno T, Kakuki T, Takano KI, Ogasawara N, Miyata R, Kikuchi S, Konno T, Ohkuni T, Yajima R, Kakiuchi A, Yokota SI, Himi T, Kojima T. The role of transcriptional factor p63 in regulation of epithelial barrier and ciliogenesis of human nasal epithelial cells. *Sci Rep.* 2017 Sep 7;7(1):10935. doi: 10.1038/s41598-017-11481-w. (査読有)
5. Sato T, Suzuki Y, Shiraishi T, Honda H, Shinagawa M, Yamamoto S, Ogasawara N, Takahashi H, Takahashi S, Tamura Y, Yokota SI. Tigecycline Nonsusceptibility Occurs Exclusively in Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Clinical Isolates, Including the Major Multidrug-Resistant Lineages O25b:H4-ST131-H30R and O1-ST648. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Jan 24;61(2). pii: e01654-16. doi: 10.1128/AAC.01654-16. (査読有)
6. Yamamoto S, Ogasawara N, Yamamoto K, Uemura C, Takaya Y, Shiraishi T, Sato T, Hashimoto S, Tsutsumi H, Takano K, Himi T, Yokota SI. Mitochondrial proteins NIP-SNAP-1 and -2 are a target for the immunomodulatory activity of clarithromycin, which involves NF- κ B-mediated cytokine production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Feb 12;483(3):911-916. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.100. (査読有)

7. Yamamoto S, Okamoto T, Ogasawara N, Hashimoto S, Shiraishi T, Sato T, Yamamoto K, Tsutsumi H, Takano K, Himi T, Itoh H, Yokota S. NIP-SNAP-1 and -2 mitochondrial proteins are maintained by heat shock protein 60. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Feb 12;483(3):917-922. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.133. (査読有)
8. Kojima T, Kohno T, Kubo T, Kaneko Y, Kakuki T, Kakiuchi A, Kurose M, Takano KI, Ogasawara N, Obata K, Nomura K, Miyata R, Konno T, Ichimiya S, Himi T. Regulation of claudin-4 via p63 in human epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Oct;1405(1):25-31. doi: 10.1111/nyas.1345 (査読有)
9. Jinushi M, Yamamoto S, Ogasawara N, Nagano H, Hashimoto S, Tsutsumi H, Himi T, Yokota S. Measles Virus Genotype D Wild Strains Suppress Interferon-Stimulated Gene Expression More Potently than Laboratory Strains in SiHa Cells. *Viral Immunol.* 2016 Jun;29(5):296-306. doi: 10.1089/vim.2016.0004 (査読有)
10. Hashimoto S, Yamamoto S, Ogasawara N, Sato T, Yamamoto K, Katoh H, Kubota T, Shiraishi T, Kojima T, Himi T, Tsutsumi H, Yokota S. Mumps Virus Induces Protein-Kinase-R-Dependent Stress Granules, Partly Suppressing Type III Interferon Production. *PLoS One.* 2016 Aug 25;11(8):e0161793. doi: 10.1371/journal.pone.0161793. eCollection 2016. (査読有)
11. Yamamoto K, Yamamoto S, Ogasawara N, Takano K, Shiraishi T, Sato T, Miyata R, Kakuki T, Kamekura R, Kojima T, Tsutsumi H, Himi T, Yokota S. Clarithromycin prevents human respiratory syncytial virus-induced airway epithelial responses by modulating activation of interferon regulatory factor-3. *Pharmacol Res.* 2016 Sep;111:804-814. doi: 10.1016/j.phrs.2016.07.033. (査読有)
12. Yokota S, Konno M, Fujiwara S, Toita N, Takahashi M, Yamamoto S, Ogasawara N, Shiraishi T: Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intrasporousal, *Helicobacter pylori* Infection in Japan Determined by Multilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. *Helicobacter.* 2015 Oct;20(5):334-42. doi: 10.1111/hel.12217. (査読有)
13. Miyata R, Nomura K, Kakuki T, Takano K, Kohno T, Konno T, Sawada N, Himi T, Kojima T. Irsogladine maleate regulates gap junctional intercellular communication-dependent epithelial barrier in human nasal epithelial cells. *J Membr Biol.* 248 (2): 327-336, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

1. 山本圭佑, 小笠原徳子, 大國毅, 高野賢二, 堤裕幸, 氷見徹夫: ウイルス感染症での鼻粘膜上皮における細気管支炎・喘鳴の発症予測因子としての鼻汁 microRNA の可能性. 第56回日本鼻科学会総会・学術講演会(平成29年9月28~30日, 山梨)
2. 山本圭佑, 小笠原徳子, 高野賢一, 宮田遼, 角木拓也, 亀倉隆太, 氷見徹夫: クラリスロマイシンは気道上皮でRSVによって誘導されるインターフェロンをIRF-3を介して調整する. 第118回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会(平成29年5月17~20日, 広島)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氷見 徹夫 (Himi Tetsuo)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90181114

(2) 研究分担者

横田 伸一 (Yokota Shin-ichi)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10325863
高野 賢一 (Takano Ken-ichi)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70404689
小笠原 徳子 (Ogasawara Noriko)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00438061