

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670746

研究課題名(和文) 型インターフェロンサブタイプ相互干渉解析によるウイルス自然除去因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of the anti-viral mechanism by interference between lambda interferon subtypes

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸器ウイルスとくにRSウイルスは小児の気道感染症に重要である。ウイルスに伴う炎症を抑制する作用を持つとされるマクロライド系薬剤(CAM)を用いてRSV感染および疑似ウイルス感染による鼻粘膜上皮からの炎症性サイトカインおよび各種インターフェロンの産生について検討した。CAMは炎症性サイトカインの産生を抑制しただけでなくIFN α およびIFN β のサブタイプの産生も抑制した。この作用はCAMがIRF3の核内移行を抑制することでおこることが解った。

研究成果の概要(英文)：Human respiratory syncytial virus (RSV) infects to airway epithelium cells, and causes frequently bronchiolitis and pneumonia in infants. Clarithromycin (CAM), which is a one of the macrolide antimicrobial agents, is also known as an immunomodulator, and has been used for otitis media with effusion and chronic sinusitis. 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. CAM also dramatically suppressed RSV-induced promoter activity of the PRDIII-1, 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.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：RSウイルス インターフェロン IRF3 鼻粘膜 上皮細胞 クラリスロマイシン サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

多様なウイルスの感染に対する抗ウイルス自然免疫応答として、生体は2種類のインターフェロン(IFN), I型IFN(IFN α/β)とII型IFN(IFN γ , 1,2,3)を誘導する。IFNは受容体発現が主に上皮細胞に限定するため、IFNは粘膜表面でのウイルス感染防止に参与する。さらに、2013年に新たなサブタイプ(IFN γ 4)が発見され(Nat Genet 2013), IFN γ 4は抗ウイルス作用に干渉し、ウイルス自然除去を阻害するという従来の概念を覆す発見がなされた。すでに、われわれはヒト鼻粘膜上皮におけるII型IFN(IFN γ)の重要性について報告した。この研究を基にして宿主のウイルス自然除去機能を検討し、ウイルス関連疾患の治療戦略構築への応用を計画した。

しかし、その後の研究ではIFN γ 4の検出のむずかしさ、不安定性など研究対象として困難を伴うためか、その後の大きな成果が得られていない。このため、当初の方針を変更し、抗ウイルス応答を示す生理活性物質を用いてII型IFNの役割を検討することとした。

2. 研究の目的

ウイルス感染での抗ウイルス自然免疫応答でIFNシステムは重要である。従来のIFNの研究では不明であった粘膜上皮細胞のウイルス感染メカニズムは、II型IFNの発現で大きく進展した。われわれはヒト鼻粘膜上皮におけるII型IFN(IFN γ)の重要性について報告した。この研究を基にして宿主の抗ウイルス機能を持つ生理活性物質について検討し、ウイルス関連疾患の治療戦略構築への応用を計画した。

ここではマクロライド系薬剤であるクラリスロマイシン(CAM)が気道炎症における抗炎症作用を持つことが知られている。CAMは様々な生理活性を持っているが、抗菌薬であるにもかかわらず、ウイルス感染時の炎症も抑制することが臨床的にも明らかにされている。このことからCAMの抗炎症作用の機序をIFNの面から解析することは、各種ウイルス感染、特に、II型IFN解析により粘膜上皮をターゲットとする各種ウイルスの新しい治療戦略を構築することができると考えた。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞, ウイルス

培養細胞はA549, BEAS-2B, Hep2, さらに手術で得られたヒト鼻粘膜上皮初代培養を用いて行った。鼻粘膜上皮細胞はhTERT遺伝子導入し延命化したものを用いた。

疑似ウイルス感染にはPoly I:C刺激を用い、ウイルスはRSV Long and A2 strain(ATCC)を用いた。

(2) IFNの測定

インターフェロンを含む各種サイトカインは以下のものをELISAにて測定した(IL-6,

CXCL8, IL-8, CCL5, RANTES, IFN-lambda2, IL-28B/IFN-lambda3, IL-29/IFN-lambda1)。またReporter gene assay, native PAGE, Western blotting, 免疫組織化学を用いてIFNおよびIRFの検索を行った。

4. 研究成果

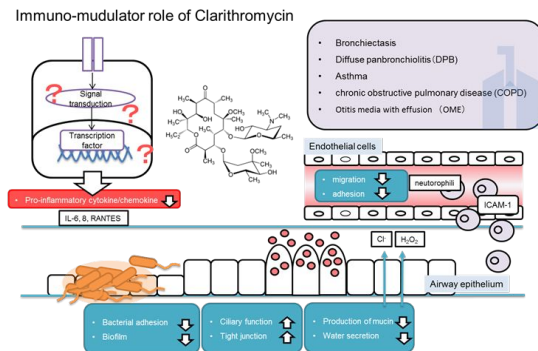
(1) RSV複製に対するCAMの効果

CAMはウイルスの複製抑制作用もあるとの報告があったが、今回の結果からはRSV複製抑制作用は持っていないことが考えられた。

(2) RSV感染にて誘導されるサイトカインに対する作用

RSV感染にて各種炎症性サイトカイン(IL-8, IL-6, CCL5)が誘導され、CAMによって有意に抑制された。さらにIFN α/β およびIFN γ 1, 2, 3いずれもRSVにて誘導されたが、この誘導もCAMは抑制することが分かった。

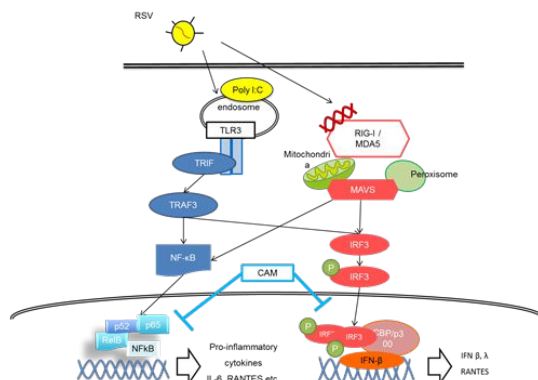
以下にその作用の概要を図示した。



(3) CAMのIFN抑制作用

通常、CAMの抑制作用はNF κ Bを介して起こることが知られていたが、IFN産生に関しては、RIG-IやMDA5を介したIR3の経路が重要とされている。今回の研究目的であるIFN産生の抑制効果はこの系に影響を与えて抑制が起こっていると考えられたため、IRF3経路について詳細に検討を行った。

その結果、IFN産生およびRANTES産生抑制に関しては、IRF3の核内移行を抑制することで産生の抑制が起こっていることを明らかにした。



このように、RSVのような呼吸器ウイルス感染に伴う鼻粘膜上皮での炎症はCAMにより抑制されることが分かった。さらに、今回上皮から産生されるIFN群(IFN α , IFN β , IFN γ)が抑制されたことは、これらのIFNがウイルス活性抑制だけでなく感染初期には他の炎症抑制作用を持っていることを示しているのかもしれない。マクロライド系薬剤の中でもEMはこのようなウイルス感染時のIFN抑制作用があることも報告されており、一方で、AzithromycinはIFN産生増加を示すということから、これらの薬剤の作用機序と作用点を明らかにすることで新たなウイルス炎症抑制あるいは抗ウイルス活性の増強などの創薬に結びつく可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計34件)

1. Yamashita K, Kawata K, Matsumiya H, Kamekura R, Jitsukawa S, Nagaya T, Ogasawara N, Takano K, Kubo T, Kimura S, Shigehara K, **Himi T**, Ichimiya S. Bob1 limits cellular frequency of T follicular helper cells. *Eur J Immunol*. 2016 in press. (査読有)
2. Kakuki T, Kurose M, Takano KI, Kondoh A, Obata K, Nomura K, Miyata R, Kaneko Y, Konno T, Takahashi S, Hatakeyama T, Kohno T, **Himi T**, Kojima T. Dysregulation of junctional adhesion molecule-A via p63/GATA-3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 in press. (査読有)
3. Jinushi M, Yamamoto S, Ogasawara N, Nagano H, Hashimoto S, Tsutsumi H, **Himi T**, Yokota SI. Measles Virus Genotype D Wild Strains Suppress Interferon-Stimulated Gene Expression More Potently than Laboratory Strains in SiHa Cells. *Viral Immunol*. 2016 in press. (査読有)
4. Takano K, Nomura K, Abe A, Kamekura R, Yamamoto M, Ichimiya S, Takahashi H, **Himi T**. Clinicopathological analysis of salivary gland tissue from patients with IgG4-related disease. *Acta Otolaryngol*. 2016 Mar 23:1-5. (査読有)
5. Abe A, Takano K, Kojima T, Nomura K, Kakuki T, Kaneko Y, Yamamoto M, Takahashi H, **Himi T**. Interferon-gamma increased epithelial barrier function via upregulating claudin-7 expression in human submandibular gland duct epithelium. *J Mol Histol*. 2016 in press. (査読有)
6. Shirasaki H, Kanaizumi E, **Himi T**. Immunohistochemical localization of alpha and beta adrenergic receptors in the human nasal turbinate. *Auris Nasus Larynx*. 2016 Jun;43(3):309-14. (査読有)
7. Kamekura R, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Ichimiya S, **Himi T**. Role of Crosstalk between Epithelial and Immune Cells, the Epimicrobiome, in Allergic Rhinitis Pathogenesis. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:75-82. (査読なし)
8. Ogasawara N, Takano K, Shintani T, Saikawa E, Takahashi N, Ito F, **Himi T**. Clinical Review of Cochlear Implantation Performed at Sapporo Medical University Hospital. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:1-6. (査読なし)
9. Takano K, Kojima T, Keira T, Miyata R, Nomura K, Kakuki T, Kaneko Y, Yajima R, Kakiuchi A, **Himi T**. A Novel Drug Delivery System for the Human Nasal Epithelium. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:67-74. (査読なし)
10. Sato J, Konno N, Murakami M, Uede T, **Himi T**. Adenovirus-Mediated ICOSlg Gene Therapy in a Presensitized Murine Model of Allergic Rhinitis. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:59-66. (査読なし)
11. Shirasaki H, Saikawa E, Seki N, Kikuchi M, **Himi T**. Nasal Mucosal Expression of the Receptors for Inflammatory Chemical Mediators. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:52-8. (査読なし)
12. Yamashita K, Ichimiya S, Kamekura R, Nagaya T, Jitsukawa S, Matsumiya H, Takano K, **Himi T**. Studies of Tonsils in Basic and Clinical Perspectives: From the Past to the Future. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:119-24. (査読なし)
13. Shirasaki H, **Himi T**. Role of Cysteinyl Leukotrienes in Allergic Rhinitis. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:40-5. (査読なし)
14. Kamekura R, Imai R, Takano K, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Hirao M, Tsubota H, **Himi T**. Expression and Localization of Human Defensins in Palatine Tonsils. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:112-8. (査読なし)
15. Ogasawara N, Yamamoto K, Takano K, **Himi T**. Relationship between Otitis Media and Epithelial Function in the Lymphoepithelium of Pediatric Adenoids. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:33-9. (査読なし)
16. Kakuki T, Kaneko Y, Takano K, Ninomiya T, Kohno T, Kojima T, **Himi T**. Behavior of Primary Cilia and Tricellular Tight Junction Proteins during Differentiation in Temperature-Sensitive Mouse Cochlear Precursor Hair Cells. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:27-32. (査読なし)
17. Takano K, Kondo A, Kurose M, Yamashita K, Nomura K, Obata K, Murayama K, Ito F, **Himi T**. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:98-104. (査読なし)
18. Kurose M, Kakuki T, Takano K, Kondo A, Obata K, Nomura K, Miyata R, Kaneko Y, Konno T, Kohno T, Kojima T, **Himi T**. Junctional Adhesion Molecule-A in Head and

- Neck Squamous Cell Carcinoma. Adv Otorhinolaryngol. 2016;77:92-7. (査読なし)
19. Takano K, Abe A, Yajima R, Kakuki T, Jitsukawa S, Nomura K, **Himi T**. Clinical Evaluation of Sinonasal Lesions in Patients With Immunoglobulin G4-Related Disease. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2015 Dec;124(12):965-71. (査読有)
20. Yamamoto M, Shimizu Y, Yajima H, Tabeya T, Suzuki C, Naishiro Y, Takano K, Murakami R, Honda S, Abe T, **Himi T**, Mukai M, Takahashi H. Validation of the comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease in a SMART registry. Mod Rheumatol. 2016 Mar;26(2):310-2. (査読有)
21. Kojima T, Kondoh M, Keira T, Takano KI, Kakuki T, Kaneko Y, Miyata R, Nomura K, Obata K, Kohno T, Konno T, Sawada N, **Himi T**. Claudin-binder C-CPE mutants enhance permeability of insulin across human nasal epithelial cells. Drug Deliv. 2015 Jun 3:1-8. (査読有)
22. Miyata R, Kakuki T, Nomura K, Ohkuni T, Ogasawara N, Takano K, Konno T, Kohno T, Sawada N, **Himi T**, Kojima T. Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells. Eur J Pharmacol. 2015 Aug 15;761:375-82. (査読有).
23. 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. 2015 Apr;248(2):327-36. (査読有)
24. Kubo T, Kamekura R, Kumagai A, Kawata K, Yamashita K, Mitsushashi Y, Kojima T, Sugimoto K, Yoneta A, Sumikawa Y, Yamashita T, Sato N, **Himi T**, Ichimiya S. Δ Np63 controls a TLR3-mediated mechanism that abundantly provides thymic stromal lymphopoietin in atopic dermatitis. PLoS One. 2014 Aug 29;9(8):e105498. (査読有)
25. Yamamoto M, Yajima H, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Shimizu Y, Tabeya T, Suzuki C, Naishiro Y, Takano K, Yamashita K, Hashimoto M, Keira Y, Honda S, Abe T, Suzuki Y, Mukai M, **Himi T**, Hasegawa T, Imai K, Shinomura Y. Everyday clinical practice in IgG4-related dacryoadenitis and/or sialadenitis: results from the SMART database. Mod Rheumatol. 2015 Mar;25(2):199-204. (査読有)
26. Tsukahara T, Emori M, Murata K, Hirano T, Muroi N, Kyono M, Toji S, Watanabe K, Torigoe T, Kochin V, Asanuma H, Matsumiya H, Yamashita K, **Himi T**, Ichimiya S, Wada T, Yamashita T, Hasegawa T, Sato N. Specific targeting of a naturally presented osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor peptide, using an artificial monoclonal antibody. J Biol Chem. 2014 Aug 8;289(32):22035-47. (査読有)
27. Kurose M, Takano K, Mitsuzawa H, **Himi T**. Tracheo-innominate artery fistula with severe motor and intellectual disability: incidence and therapeutic management. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2014 Aug;78(8):1348-51. (査読有)
28. Yamamoto M, Nojima M, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Yajima H, Shimizu Y, Tabeya T, Matsui M, Suzuki C, Naishiro Y, Takano K, **Himi T**, Imai K, Shinomura Y. Identification of relapse predictors in IgG4-related disease using multivariate analysis of clinical data at the first visit and initial treatment. Rheumatology (Oxford). 2015 Jan;54(1):45-9. (査読有)
29. Abe A, Takano K, Seki N, Jitsukawa S, Yamamoto M, Takahashi H, **Himi T**. The clinical characteristics of patients with IgG4-related disease with infiltration of the labial salivary gland by IgG4-positive cells. Mod Rheumatol. 2014 Nov;24(6):949-52. (査読有)
30. Tabeya T, Yamamoto M, Naishiro Y, Ishigami K, Shimizu Y, Yajima H, Suzuki C, Seki N, Takano K, **Himi T**, Imai K, Takahashi H, Shinomura Y. The role of cytotoxic T cells in IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis, the so-called Mikulicz's disease. Mod Rheumatol. 2014 Nov;24(6):953-60. (査読有)
31. Nomura K, Obata K, Keira T, Miyata R, Hirakawa S, Takano K, Kohno T, Sawada N, **Himi T**, Kojima T. Pseudomonas aeruginosa elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. Respir Res. 2014 Feb 18;15:21. (査読有)
32. Takano K, Yajima R, Seki N, Abe A, Yamamoto M, Takahashi H, **Himi T**. A study of infraorbital nerve swelling associated with immunoglobulin G4 Mikulicz's disease. Mod Rheumatol. 2014 Sep;24(5):798-801. (査読有)
33. Takano K, Kojima T, Sawada N, **Himi T**. Role of tight junctions in signal transduction: an update. EXCLI J. 2014 Oct 13;13:1145-62. eCollection 2014. (査読有)
34. 氷見徹夫, 高野賢一, 大國毅, 小笠原徳子, 正木智之, 小幡和史, 堤裕幸, 小島隆, 澤田典均, 横田伸一. ウイルス性炎症における上気道粘膜の役割. 日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会会誌 2(1):1-5, 2014

〔学会発表〕(計3件)

1. Yamamoto K, Hashimoto S, Tsutsumi H, **Himi T**, Yokota S: Clarithromycin and garenoxacin suppress proinflammatory cytokine and chemokine induction airway epithelial cells induced by human RSV via different signal pathways. 第63回日本ウイ

- ルス学会 平成 27 年 11 月 22 - 24 日, 福岡国際会議場 (福岡県, 福岡市)
2. 山本聡, 小笠原徳子, 白石宗, 佐藤豊孝, 氷見徹夫, 伊藤英晃, 横田伸一. 哺乳類 H S P 6 0 の新規基質 N I P - S N A P 2 タンパク質の機能解析 第 10 回臨床ストレス応答学会 平成 27 年 11 月 6 - 7 日, 東京農工大学 140 周年記念会館 (東京都小金井市)
 3. 小笠原徳子, 高野賢一, 亀倉隆太, 氷見徹夫. R S ウイルス感染症における細気管支炎・喘鳴の発症予測因子としての microRNA の可能性 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 平成 27 年 5 月 26 - 28 日, グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール (東京港区)

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

(3) 連携研究者