

図 1. 非免疫サル群 (2 頭) と免疫サル群 (5 頭) における血中 IL-6 (A), 血中 IL-2 (B), 血中 RANTES (C), および, 血中 IFN-gamma (D) のサル痘ウイルス感染後の推移.

ウイルス感染において共通の分子パターン(二本鎖RNA)に対する ミクログリアの活性化機序の解析

主任研究者：森本金次郎 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
協力研究者：中道 一生 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
倉根 一郎 (国立感染症研究所ウイルス第一部)

研究要旨：近年、脳局所に薬物を作用させるための先端技術として、ウイルスベクターを用いたドラッグデリバリーシステムが注目を集めている。その一方で、ウイルスに対する免疫応答は閉鎖環境における炎症反応を誘発し、神経細胞へのダメージを引き起こすことが知られている。脳内炎症反応には中枢神経系に常在する免疫細胞(ミクログリア)の活性化が深く関与することから、本研究ではウイルス感染において普遍的な分子パターンである二本鎖RNAに対するミクログリアの活性化メカニズムを解析した。

A. 研究目的

血液脳関門によって外部から隔離され、かつ組織内の物質輸送さえも大きく制限される脳実質に薬物を作用させることは、脳疾患治療における大きな課題の一つである。近年、この問題を解決するための先端技術としてウイルスベクターを用いたドラッグデリバリーが注目を集めており、アルツハイマー病やパーキンソン病といった脳疾患、ならびに脳腫瘍等の治療における実用化が試みられている。他のドラッグデリバリーシステムと比較した場合、ウイルスベクターは極めて高い遺伝子導入効率を示す。その反面、投与部位における免疫誘導という欠点が指摘されている。とりわけ、脳特有の閉鎖的環境における炎症反応は周囲のグリア細胞の活性化を誘発し、神経細胞へのダメージを引き起こす。また、ウイルスベクター自体に対する免疫誘導は遺伝子導入効率を大幅に低下させる。

多種類の白血球が混在する末梢組織と

は対照的に、脳の免疫システムでは常在型のマクロファージ様細胞であるミクログリアが中心的かつ多彩な役割を担っている。正常組織において、ミクログリアは突起を張り巡らせた形態をとり、脳局所での異常や病原体感染を監視するセンサーとして機能する。脳に損傷や疾患、ウイルス感染等が生じた場合、ミクログリアはアメーバ状の活性型細胞へとトランスフォームすることで変性細胞を貪食するほか、表面抗原やサイトカイン、酵素、神経保護因子等を高発現する。ウイルスベクターによる炎症反応の回避および導入効率の改善のためには、ミクログリアに対する刺激を低減させたベクター系の開発、ならびに細胞の活性化を一時的に抑制する抗炎症物質の開発が必要となる。

ウイルスベクターに対するミクログリアの活性化機序の解析、ならびに抗炎症物質の探索では、抗ウイルス応答を可能な限り単純化した実験モデルの構築が必要不可欠である。二本鎖RNA(dsRNA)はウイルス

感染において普遍的に産生される分子構造であり、RNAウイルスのゲノム複製やウイルスに由来する相補mRNA、もしくはウイルスmRNAの二次構造(ヘアピンループ)によって生じる。このdsRNAパターンは宿主のToll-like receptor 3 (TLR3) や dsRNA-activated protein kinase (PKR)によって認識され、NF- κ Bを基幹とする細胞応答を誘導する。本研究では、ミクログリアの抗ウイルス応答モデルを確立するために、dsRNAに対する細胞内シグナリングと遺伝子発現誘導を体系的に解析した。

B. 研究方法

1) 細胞:

マウス正常脳に由来するミクログリア細胞株 Ra2 を用いた。Ra2 細胞は GM-CSF の存在下において増殖が可能であり、形態や貪食能、蛋白質発現パターン、脳へ親和性において初代培養ミクログリアと極めて類似した性質を有する。

2) dsRNA に対するミクログリアの遺伝子発現誘導パターンの解析:

Ra2 細胞を合成 dsRNA である poly inosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] の存在・非存在下で培養した後、経時的に細胞を回収し全 RNA を抽出した。常法に従って相補 DNA (cDNA) を合成した後、サイトカイン (IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、GM-CSF、TGF- β 1、TGF- β 2) および ケモカイン (CXCL2/MIP-2、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、CXCL11/I-TAC、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1、CCL4/MIP-1 β 、CCL5/RANTES、CX₃CL1)、接着分子 (CD11a、CD11b、CD11a、CD49a、CD49b、CD49d、CD49e、CD49f、CD54、CD80、CD86)、

一酸化窒素合成酵素、等の遺伝子群を標的として定量的 PCR を行った。

3) ケモカイン蛋白質の定量:

Ra2 細胞を poly(I:C) 存在・非存在下にて培養した後、経時的に培養上清を回収し DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems Inc) を用いて産生量を測定した。

4) シグナル分子リン酸化の解析:

Ra2 細胞を poly(I:C) 処理した後、経時的に回収し、Triton X-100 および蛋白質分解酵素阻害剤、脱リン酸化酵素阻害剤を含む緩衝液に浮遊させた後、超音波破碎処理をおこなった。得られた蛋白質を SDS-PAGE により分離した後、リン酸化・非リン酸化状態のシグナル伝達分子 (I κ B、NF- κ B p65、MKK1/2、MKK3/6、MKK4、ERK1/2、JNK1/2、p38、C/EBP β 、STAT-1、STAT-3、STAT-5、STAT-6、ATF-2、c-Jun 等) に対する抗体によるウェスタンブロット解析に供した。

5) シグナル経路活性化阻害実験:

ミクログリアを U0126 および PD98059、SB202190、SP600125、CAPE、BAY11-7082 等の阻害剤にて前処理した後、poly(I:C) 処理を行った。培養上清を回収した後、ケモカイン産生量を上記の方法により定量した。

6) 液胞内 pH の中和試験:

ミクログリアを bafilomycin A1 および monensin にて前処理し、poly(I:C) 刺激を行った。細胞ならびに培養上清を回収した後、シグナル分子の活性化とケモカイン産生量を上記の手法を用いて調べた。

C. 研究結果

1) dsRNAに対するミクログリアの遺伝子発現様式:

サイトカインおよびケモカイン、接着分子、細胞傷害因子等の遺伝子群を標的とした定量PCRを行い、dsRNA処理したミクログリアにおける遺伝子発現の時間的、量的な変動パターンを調べた。poly(I:C)にて刺激したミクログリアでは、接着分子やケモカイン受容体、細胞障害因子等の遺伝子発現量においては軽微な変化しか認められなかったが、炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6)およびケモカイン(CXCL2、CXCL10、CCL2、CCL5)の遺伝子発現が有意に増加した。とりわけCXCL10遺伝子の発現はpoly(I:C)刺激の最初期から増大し、長時間培養後もmRNA量が安定して維持されること、また刺激後2時間以降にはCXCL10蛋白質が細胞外へ放出されることが分かった。

2) dsRNAに対するミクログリアの細胞内シグナリング:

dsRNAに対するミクログリアの細胞内シグナル伝達機序の詳細は不明である。ミクログリアをpoly(I:C)処理し、シグナル分子群のリン酸化を調べた。poly(I:C)処理したミクログリアではSTAT経路等の活性化は軽微であった。これに対して、NF- κ BおよびJNK、p38を介したシグナル経路はpoly(I:C)刺激に対して迅速に応答することが分かった。核酸を認識する数種のTLRは細胞内の液胞においてリガンドを認識することが報告されているため、dsRNAによるミクログリア活性化におけるエンドソームの役割を調べた。プロトンポンプ(H⁺-ATPase)阻害剤、もしくはイオンキャリアーを用いて液胞内pHを中和した場合、poly(I:C)によるシグナル分子活性化は顕著に抑制さ

れることが分かった。

3) ミクログリアのCXCL10発現における細胞内シグナリングの役割:

dsRNAパターンの認識によるミクログリアのシグナル経路活性化とCXCL10発現誘導との関連を明らかにするため、各シグナルカスケードに対する特異的阻害物質の存在下でのCXCL10発現量を調べた。poly(I:C)刺激に対するミクログリアのCXCL10発現は、NF- κ BおよびJNK、p38シグナリングを阻害することで顕著に低下した。以上の研究結果より、ミクログリアは液胞内におけるdsRNAの認識を介して特定のシグナル伝達経路を活性化させ、CXCL10の発現を誘導することが分かった。

D. 考察

これまで、ミクログリアは単なる脳に常在するマクロファージとして考えられてきた。しかしながら、近年、末梢マクロファージとは異なる遺伝子発現様式や組織特異性、神経細胞の保護や高次脳機能への関与等が次々と報告されたことで、ミクログリアは脳の恒常性維持のために特殊化した細胞であるという概念が定着しつつある。また、血液脳関門によって隔離された脳組織に侵入する病原体のほとんどはウイルスであるため、ミクログリアがウイルス感染に対して末梢マクロファージとは異なった細胞応答を示すことが考えられるが、これらの詳細は解明されていない。本研究の結果、ミクログリアはdsRNAを認識することでNF- κ BおよびJNK、p38を介したシグナルカスケードを活性化することが示された。また、各々のシグナリングは、TLRリガンドが細胞内のエンドソームにおいて認識されることで活性化すること、この過程にはプロトンポンプ(H⁺-ATPase)を介した液胞内の酸性化が必須であることを明らかにした。

dsRNA刺激に対するミクログリアの遺伝子発現解析を行った結果、サイトカインおよびケモカイン遺伝子の発現が選択的に誘導されることが明らかとなった。とりわけ、CXCL10遺伝子の発現はdsRNA刺激に対して最も迅速かつ高レベルで応答することが分かった。CXCL10はマクロファージ系細胞等によって分泌されるケモカインであり、受容体であるCXCR3を介してT細胞や単球、NK細胞の遊走を促進する。中枢神経系におけるCXCL10の過剰発現は脳実質への白血球浸潤を誘導し、様々な脳疾患における炎症反応に深く関与することが知られている。したがって、ウイルスベクターを用いた脳へのドラッグデリバリーにおける安全性および有効性の向上のためには、CXCL10の発現を極力低減するようなベクター系の設計、ならびに抗炎症剤の開発が強く望まれる。

E. 結論

ウイルス感染において共通の分子パターンであるdsRNAの認識を介して活性化するミクログリアの遺伝子発現およびシグナル伝達経路を特定するとともに、両者の相互関係を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamichi K, Saiki M, Sawada M, Yamamuro Y, Morimoto K, Kurane I. Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways. *Journal of Neurochemistry* (2005) 95(1):273-283.

- 2) Nakamichi K, Saiki M, Sawada M, Takayama-Ito M, Yamamuro Y,

Morimoto K, Kurane I. Rabies virus-induced activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways regulates expression of CXC and CC chemokine ligands in microglia. *Journal of Virology* (2005) 79(18):11801-11812.

2. 学会発表

- 1) 齊木めぐみ・澤田誠・森本金次郎・山室裕・倉根一郎・中道一生. Induction of chemokine expression in microglia through recognition of TLR3 ligand. 第28回日本神経科学大会. 2005年7月(横浜)
- 2) 中道一生・齊木めぐみ・澤田誠・森本金次郎・山室裕・倉根一郎. Chemokine response of microglia against neurotropic virus infection via activation of signal-transducing molecules. 第28回日本神経科学大会. 2005年7月(横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

狂犬病ウイルス粒子に対する樹状細胞の免疫応答

分担研究者：西園 晃（大分大学医学部感染分子病態制御講座）
協力研究者：後藤 和代（大分大学総合科学研究支援センター）
野口賀津子（大分大学医学部感染分子病態制御講座）

研究要旨：狂犬病ウイルス街上毒株の感染の多くは最終的には致死性病態を誘導するが、その炎症所見は乏しく、中枢及び末梢組織において免疫の抑制または不応答がなされていると考えられている。それに対し、致死性病原性の減衰した弱毒株は、末梢において強力に免疫を賦活し、致死性病態が免れていると考えられている。本研究では狂犬病ウイルス(RV)に対する樹状細胞の応答を調べた。マウス樹状細胞由来 JAWSII 細胞は Challenge Virus Standard(CVS)または Evelyn Rokitniki Abelsrth strain (ERA) 感染に対して両者とも非感染性を示し、子孫ウイルスの産生は観察されなかった。CVS または ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中の TNF- α 、IFN- α および IFN- β を解析した結果、CVS と比較して ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中には顕著に TNF- α 、IFN- α および IFN- β が検出された。よって末梢の樹状細胞において RV の株の違いにより免疫応答が左右されている可能性が推測できた。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは(RV)はラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される砲弾型の一本鎖 RNA ウイルスである。神経細胞に指向性が強く、ひとたび免疫特権領域である神経系に侵入し上向性に感染が進めば、もはや免疫では排除不可能であると考えられている。よって脳神経まで感染が及ぶか否かは末梢での免疫応答に深く左右されており、その応答性は恐らく、致死性病態を誘導する街上毒株と致死性病態にまでは至らない弱毒株との間で異なっているだろうという事は予測で

きる。

これまで、末梢局所に接種された RV 粒子の多くはマクロファージ等の食食系の細胞内に存在することが報告されており、またマクロファージ由来の RAW264 を用いた *in vitro* の実験において、RV は RAW264 細胞に対して非感染性であり子孫ウイルスは産生しないけれども、ERK1/2 シグナル経路を介して CXCL10 の発現を誘導する事により、免疫を活性化する事が報告されている。

これらの報告を元に本研究では、樹状細胞を用いて、固定毒株と弱毒株をそれ

ぞれ細胞に接種した場合の反応性の違いの解析を行った。

B. 研究方法

1) 細胞とウイルス

マウス樹状細胞系株 JAWSII、およびマウス神経芽細胞腫由来細胞株 NA を用いた。

2) ウイルス

RV 固定毒株 Challenge Virus Standard (CVS)、および弱毒株 Evelyn Rokitniki Abelsrth strain (ERA) を用いた。ウイルスストックの調整および感染力価測定には NA 細胞を用いた。

3) 樹状細胞への RV 感染

(細胞の形態観察)

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を 2.5×10^5 個播種した後に CVS または ERA を MOI 10、MOI 5、MOI 1 で接種した。6, 12, 24, 48, 72 時間後に細胞を顕微鏡下で観察を行った。

(蛍光抗体染色法)

96 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を 6.0×10^4 個播種した後に CVS または ERA を MOI 10、MOI 5、MOI 1 で接種した。12, 24, 48, 72 時間後に細胞をピペッティングにて回収し、PBS で洗浄した後スライドグラスに固着させ、アセトンで固定を行った。固定終了後、FITC 標識抗 RV-N 抗体で 40 分・37 度インキュベーターで反応させ、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

(フォーカス形成試験)

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を 2.5×10^5 個播種した後に CVS または ERA を MOI 10、MOI 5、MOI 1 で接種した。6, 12, 24, 48, 72 時間後に培養上清液を回収し感染性子孫ウイルス量を NA 細胞を用いたフォーカス形成試験により測定した。

4) TNF- α , IFN- α および IFN- β

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を 2.5×10^5 個播種した後に CVS または ERA を MOI 10、MOI 5、MOI 1 で接種した。24, 72 時間後に培養上清液を回収し TNF- α , IFN- α および IFN- β を ELISA にて解析した。

C. 研究結果

1) 樹状細胞への RV 感染

(細胞の形態観察)

6, 12, 24, 48 間後は細胞にあまり変化は認められなかった。72 時間後において ERA を接種した細胞には顕著な CPE が観察された。

(蛍光抗体染色法)

CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞では、ウイルス N 蛋白質を発現した細胞はほとんど認められなかった。この結果から、JAWSII 細胞は RV 感染に対して非感受性を示すことが分かった。

(フォーカス形成試験)

CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中における感染性粒子量は、コントロール (ウイルスだけ

をインキュベートした場合)と比較して速やかに激減した(図1)。この結果からウイルスは感染ではなく貪食によって処理されている可能性が強く示唆された。

2) TNF- α , IFN- α および IFN- β

CVS を接種した JAWSII 細胞の培養上清中と、ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中を比較した場合、ERA を接種した時の方が TNF- α , IFN- α および IFN- β において、高濃度の値を示した(図2)。よって細胞内における CVS と ERA の反応性は異なっている事が推測された。

D. 考察

RV の強毒株と弱毒株における免疫反応の違いは、以前よりマウスまたは神経細胞を使った実験で報告がなされているが、感染直後・初期に应答するであろう樹状細胞に対する反応性の検討の報告はほとんどなされていない。近年 HIV やデングウイルスが樹状細胞の DC sign を介して感染し、DC の中で複製・増殖がなされていることが証明されており、また HIV に関しては、一度樹状細胞に感染する事により、細胞指向性がより強く決定され CD4+T 細胞に感染しやすくなるという報告もあり、ウイルス感染に際して樹状細胞の反応性の検討は重要であると考えられる。よって今回我々は RV が体内に侵入した際、早期にどのような免疫反応が誘導さ

れているのかを予測するのを目的に、マウス樹状細胞を用い *in vitro* でその反応性の検討を行った。

RV 接種 72 時間後、ERA を接種した細胞と CVS を接種した細胞には、顕著な CPE の違いが認められた。しかしながら間接蛍光抗体法を用いて細胞を染色しても、両者ともに RV 蛋白は検出されなかった。またこの時上清中には感染性を有するウイルスはほとんど認められなかった。細胞培養液の上清中の TNF- α , IFN- α および IFN- β を測定したところ、ERA を接種した細胞の上清中には TNF- α , IFN- α および IFN- β が高濃度検出されたが、CVS を接種した細胞の上清中には低濃度しか検出されなかった。

これらの結果より、ERA 及び CVS は樹状細胞に感染はほとんどせず、貪食経路によって侵入(処理)されている可能性が示唆された。しかしながらその反応性は異っており ERA の方が樹状細胞をより賦活化していると考えられる。これらのメカニズムは解析中である。

E. 結語

ERA と CVS の樹状細胞に対する反応性は大きく異なる事が判明した。樹状細胞はウイルスの末梢感染において重要な役割を持っている事が推測できることより、この反応性の違いは、致命的病態を誘導する強毒株と、致命的病原性の減衰した弱毒株の病

態形成機序を解明するヒントに成り
得ると考えている。

F. 研究発表
該当なし

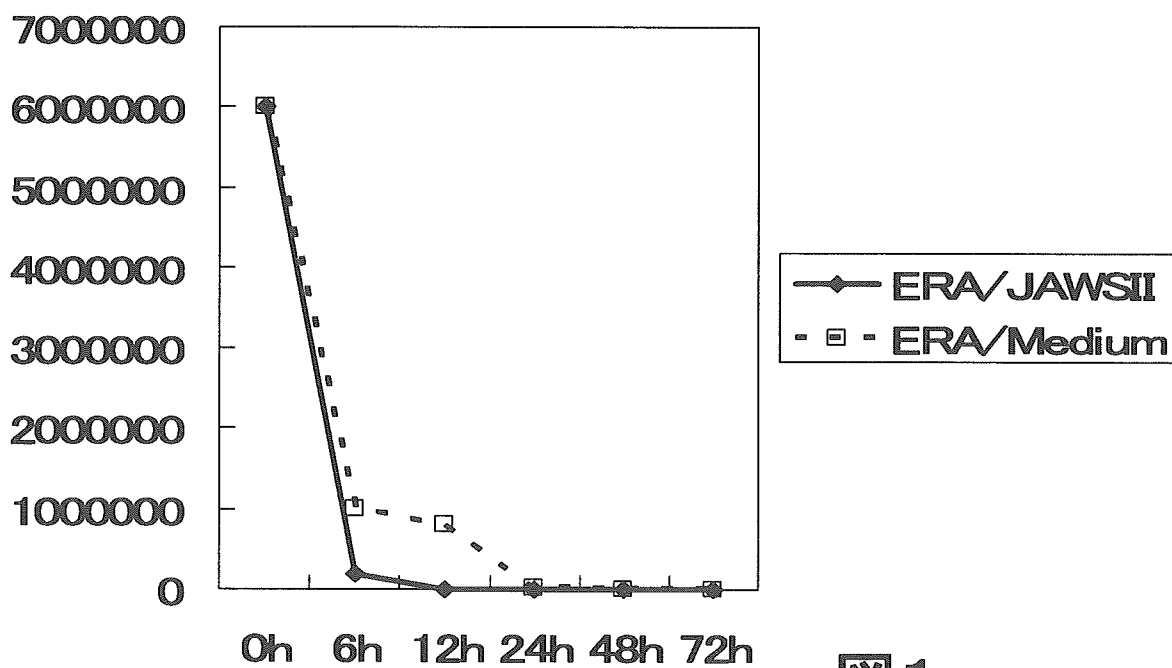
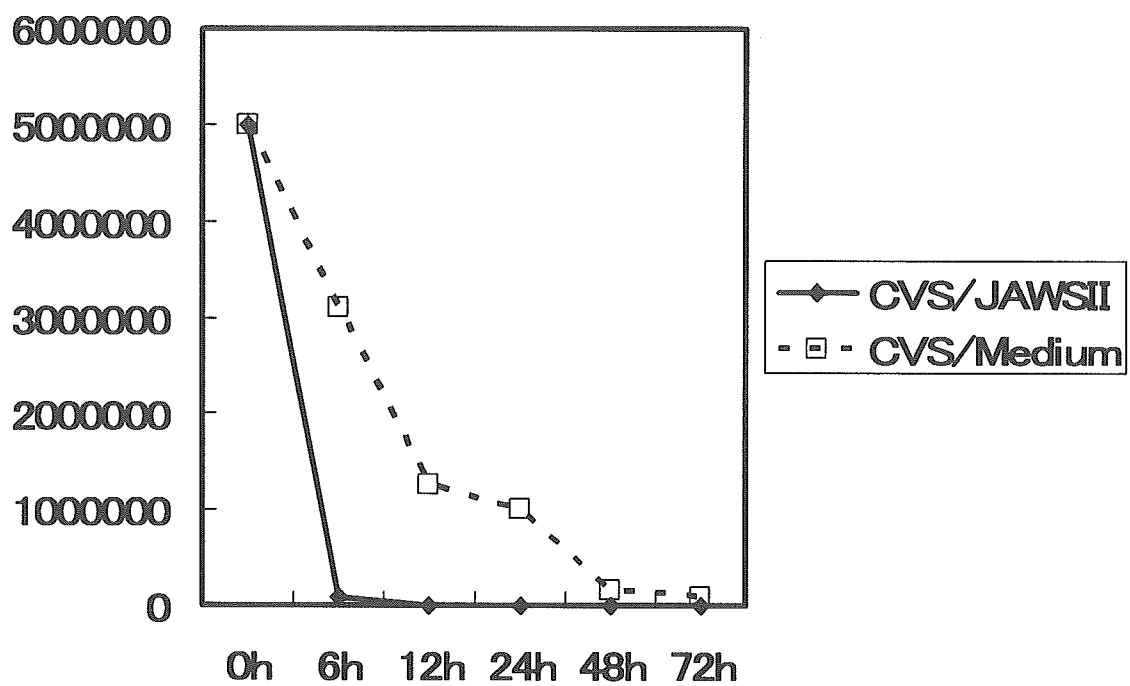
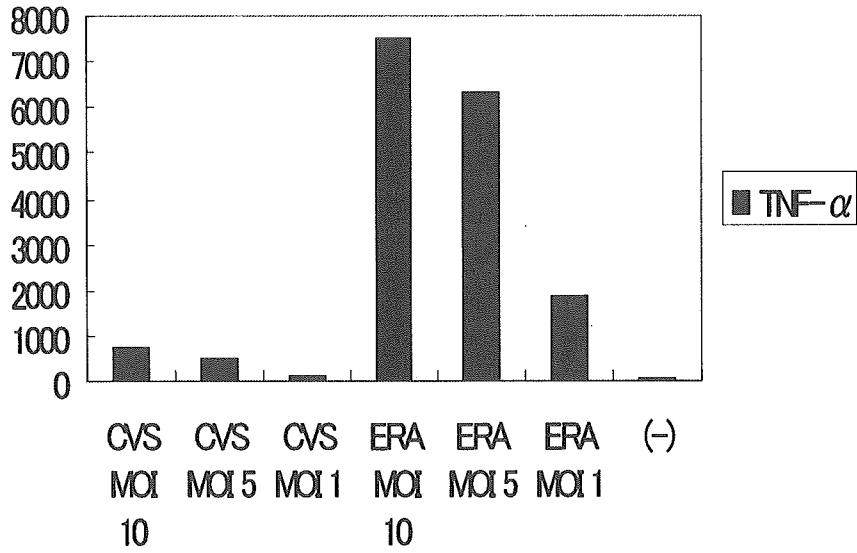


图 1

24時間



72時間

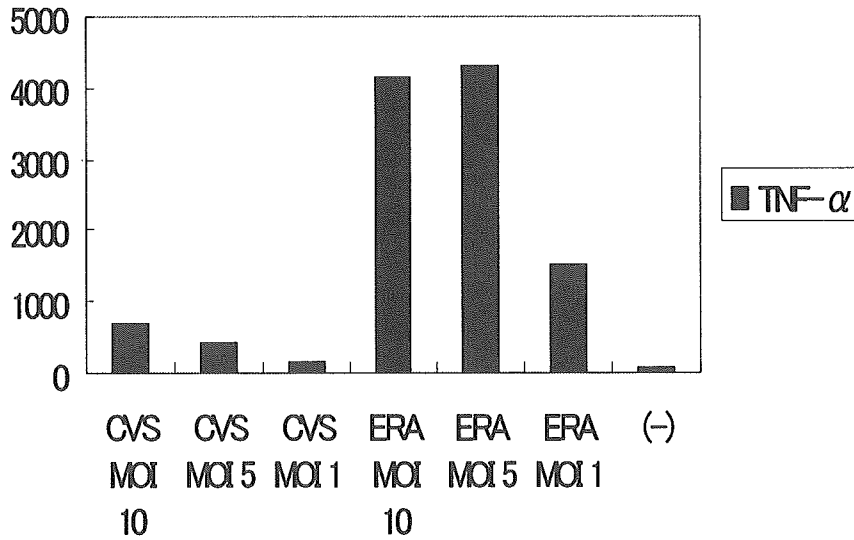
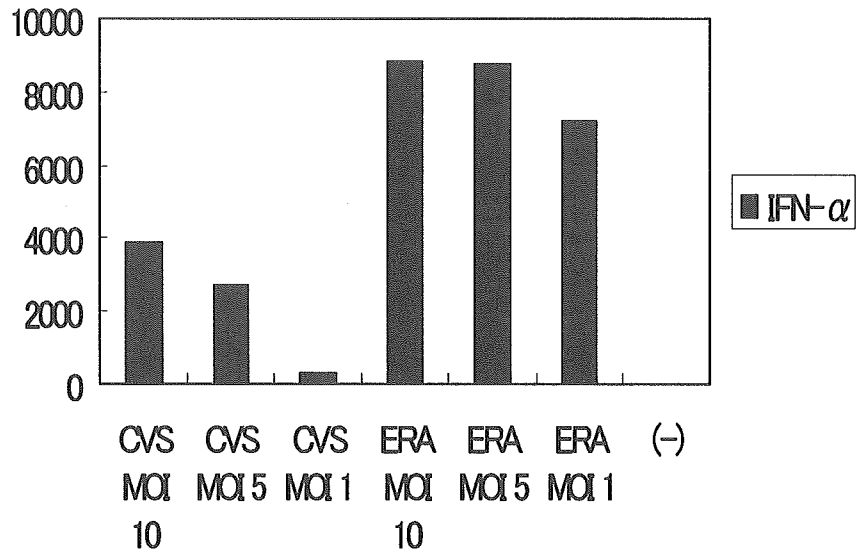


図2(A)

24時間



72時間

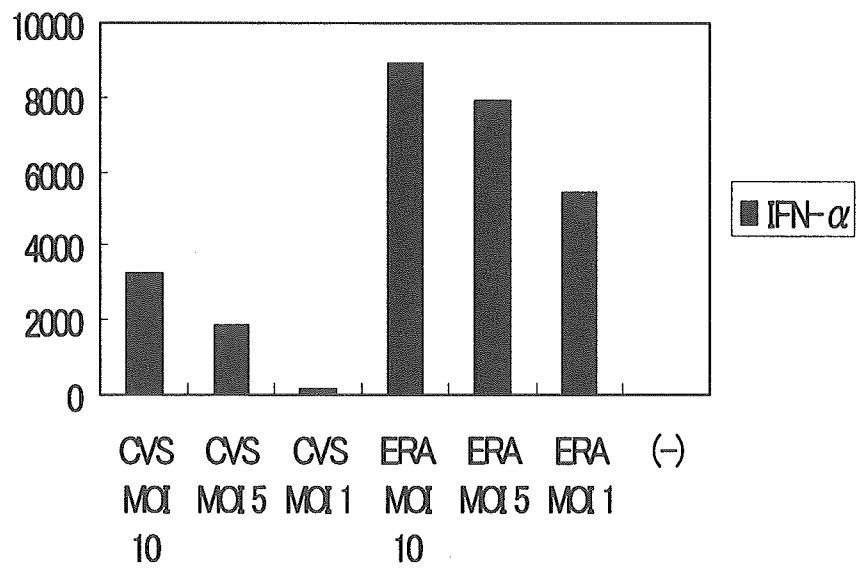
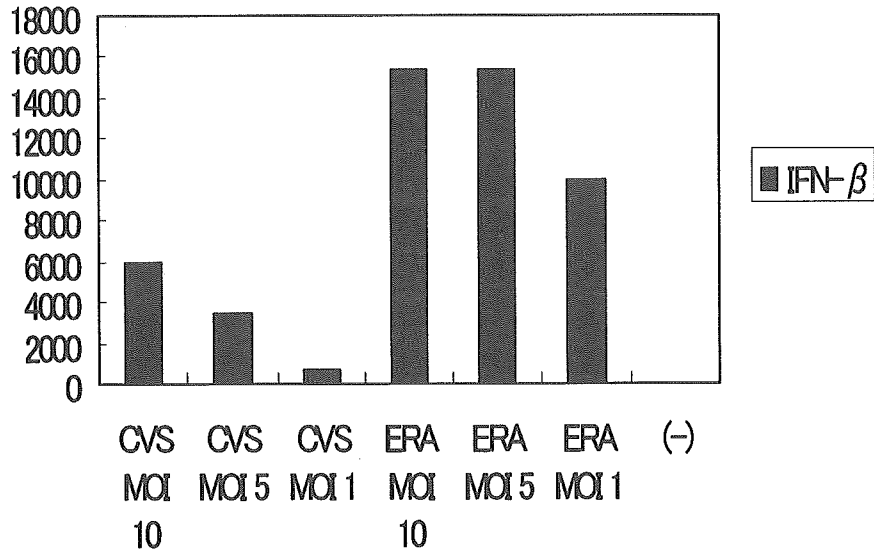


図2(B)

24時間



72時間

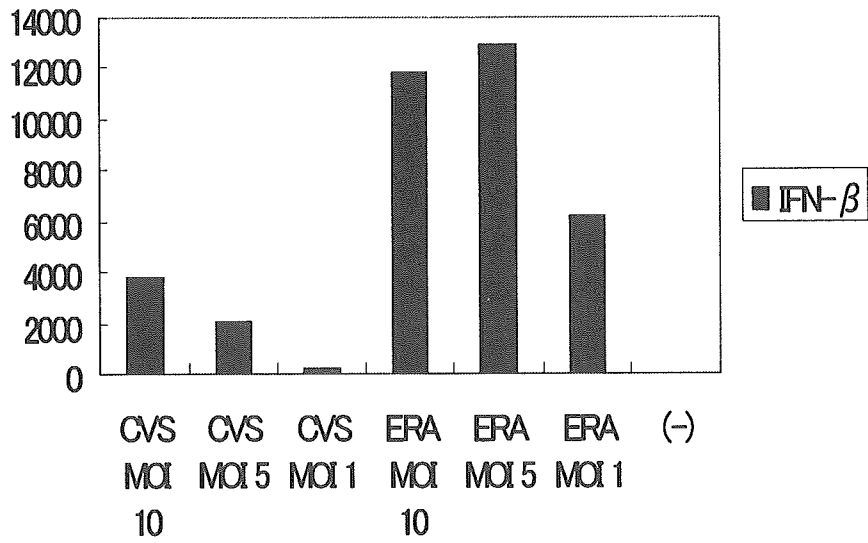


図2(C)

RS ウイルスのインターフェロン活性からの回避機構 (ワクチン開発のための基礎的研究)

分担研究者：錫谷 達夫（福島県立医科大学微生物学講座）

協力研究者：橋本 浩一（福島県立医科大学微生物学講座）

研究要旨

Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) はパラミクソウイルス科ニューモウイルス属のウイルスで乳幼児における下気道炎による急性呼吸不全の病因の1つである。また、RSV 感染は臓器移植医療における成功率、慢性呼吸器疾患患者、年輩者の感染性急性呼吸不全の予後にも深く関連している。現在まで有用な薬剤、ワクチンは未だ開発されておらず、RSV 特有の感染病理が更に解明されなければならない。近年、RSV ワクチン開発において、宿主の IFN α/β による抗ウイルス反応からの回避に関係していると考えられている NS2 遺伝子を標的とした弱毒生ワクチンの臨床研究が進められている。本研究では RSV の IFN 活性からの回避機構において、ウイルスの SOCS 遺伝子発現誘導に着目し検討した。RSV の感染細胞において感染極初期に SOCS1、SOCS3、CIS が誘導された。

A. 研究目的

パラミクソウイルス科ニューモウイルス属の Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) は乳幼児における下気道炎による急性呼吸不全の病因の1つである。また、RSV 感染は臓器移植医療における成功率、慢性呼吸器疾患患者、年輩者の感染性急性呼吸不全の予後にも深く関連している。WHO の 2003 年の死亡率の推計では、RSV 感染による死亡は、感染症においてヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス・C 型肝炎ウイルス、麻疹ウイルスに次ぐ 4 番目である。1960 年代、米国にてホルマリン不活化 RSV ワクチンによる治験が施行され、結果は RSV 初感染時の入院率が

接種群で 80% (2 児死亡)、非接種群で 2% と散々たるものであった。その後の研究で、RSV のエンベロープ蛋白の G 蛋白による TH2 型への免疫誘導が、ホルマリン不活化 RSV ワクチン接種後の病態に深く関与していることが明らかにされた。しかし、現在まで有用な薬剤、ワクチンは未だ開発されておらず、RSV 特有の感染病理が更に解明されなければならない。

これまでウイルスがいかにヒトの免疫系から回避し、発症を引き起こすかが研究されてきた。JAK/STAT 系はインターフェロン (IFN) およびサイトカインの細胞内シグナル伝達系で中心的な役割を担っているが、RSV では感染後、ウイルス遺伝

子がコードする非構造蛋白が、細胞の JAK/STAT 系における STAT1、STAT2 のリン酸化を阻害し、IFN α/β の誘導を抑制し、最終的に感染初期の非特異的抗ウイルス作用から逃れることが明らかになっている。近年、ウイルスによる JAK/STAT 系の抑制機構だけでなく、宿主側の JAK/STAT 系の抑制機構として SOCS (suppressor of cytokine signaling) ファミリーが発見され、さらに C 型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヘルペスウイルス 1 型のウイルス自身による SOCS 遺伝子発現誘導の報告がある。

現在、RSV ワクチン開発において、宿主の IFN α/β による抗ウイルス反応からの回避に関係していると考えられている NS2 遺伝子を標的とした弱毒生ワクチンの臨床研究が進められている。本研究では RS ウイルスのインターフェロン活性からの回避機構において、ウイルスの SOCS 遺伝子発現誘導に着目し検討した。

B. 研究方法

1. 細胞とウイルス。

ヒト咽頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞とウイルスは RSV-A2 株を用いた。ウイルスストックは HEp-2 細胞で RSV を増殖させた後、超遠心で精製し、プラーク法でウイルスの感染価を確認した。また紫外線不活化 RSV は紫外線ランプ (254nm) で 15 分照射し作製した。

2. 細胞における遺伝子発現のリアルタイム RT-PCR による定量。

SOCS1-7 と CIS の 8 種については TaqMan 法 (Applied Biosystems) を用いて定量した。リアルタイム PCR による定量の結果は GAPDH の発現で標準化した。

C. 研究結果

HEp-2 細胞に RSV を感染価 (moi) 3 で感染させ、感染 24 時間後までの感染細胞における、SOCS 遺伝子の発現について、SOCS1-7、CIS の計 8 種の遺伝子についてリアルタイム PCR で検討した (図 1)。生ウイルスと同時に UV 不活化ウイルスについても同様に検討した。SOCS1、SOCS3、CIS 遺伝子は感染数時間以内にピークを伴って誘導され、ピーク時の発現は感染時に比べそれぞれ、9.6 倍、13.8 倍、7.3 倍増加していた ($p < 0.01$)。他の SOCS 遺伝子の発現においては、感染細胞と非感染細胞において優位な差は認められなかった。また、UV 不活化ウイルスを用いた検討でも、感染後優位な変化は認められなかった。

D. 考察

RSV を初めとする RNA ウイルス感染に対して、生体側の STAT1 を介する JAK/STAT 系の活性化により誘導された IFN α/β の抗ウイルス作用は、感染極初期の感染防御の砦である。これまで、SOCS 遺伝子発現とウイルス増殖に関連は C 型肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス 1 型、エンテロウイ

ルスについて論文報告されている。C型肝炎ウイルスでは、コア蛋白を過剰発現させることにより SOCS3 の発現が誘導され、IFN- α によるチロシンのリン酸化が阻害される。ヘルペスウイルス 1 型でも同様に感染にて SOCS3 の発現が誘導される。エンテロウイルスによる心筋炎のモデルでは SOCS1 に対する dominant-negative SOCS1 投与により心筋炎発症が抑制されたと報告されている。RSV では遺伝子がコードする非構造蛋白 (NS1、NS2) が、JAK/STAT 系の STAT1、STAT2 のリン酸化を阻害し、IFN α/β の誘導を抑制し、最終的に感染初期の非特異的抗ウイルス作用から回避することが明らかされている。本研究では、RSV 感染は宿主側の JAK/STAT 系の抑制機構分子 SOCS ファミリーの SOCS1、SOCS3、CIS を誘導し、IFN からの抗ウイルス作用から回避することが推察された。

RSV ワクチンを開発する際、特に小児を対象とした場合、接種対象は新生児、あるいは乳幼児である。新生児、乳幼児の免疫学的な特徴として免疫反応が年長児に比べ弱く、また母親からの移行抗体が児の体内に存在していることが挙げられる。そのため、ワクチンの安全性と強い免疫原性が特に重要である。これまでサブユニットワクチン、ペプチドワクチン、弱毒生ワクチンが検討されてきたが、サブユニットワクチン、ペプチドワクチンはそれぞれ免疫原性、安全性の面の問題を解決せねばなら

ない。弱毒生ワクチンについては弱毒化のコントロールが困難であったが、近年、リバーズジェネティクスの方法で弱毒生ワクチンの作製がより確実になりつつある。弱毒化する遺伝子として、宿主の IFN α/β による抗ウイルス反応からの回避に関係していると考えられている NS2 遺伝子が候補としてあげられ、臨床研究が進められている。我々の今回の研究結果と併せると RSV 感染ではウイルスの NS2 蛋白が宿主側の SOCS 遺伝子の発現を誘導し、JAK/STAT 系の STAT1、STAT2 のリン酸化を阻害し、IFN α/β の誘導を抑制し、最終的に感染極初期の非特異的抗ウイルス作用から回避していると推測される。将来の安全なワクチン開発のためにウイルス遺伝子と SOCS 遺伝子の発現の詳細な更なる検討が必要である。

E. 結語

RSV のインターフェロン活性からの回避機構について検討した。RSV の感染細胞において感染の極初期に SOCS1、SOCS3、CIS が誘導された。RSV の増殖抑制は RSV のインターフェロン活性からの回避機構の抑制により、JAK/STAT 系の活性化によると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

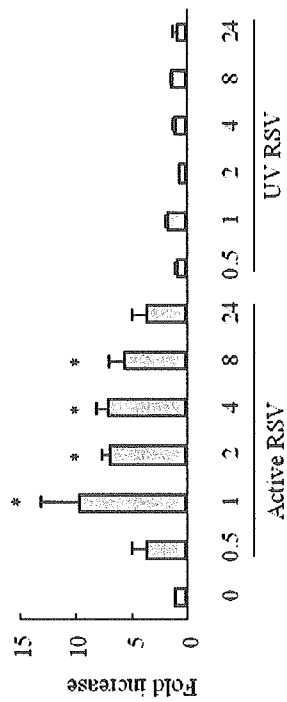
- 1) Kaneko H, Iida T, Aoki K, Ohno S, Suzutani T. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 43:3290-6, 2005.
 - 2) Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Fujii N. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 confers efficient viral replication. *Virology.* 338:173-81, 2005
 - 3) Saijo M, Suzutani T, Morikawa S, Kurane I. Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet-resistant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) derived from a foscarnet-sensitive HSV-1 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 606-611, 2005
 - 4) Peebles R.S.Jr, Hashimoto K, Sheller JR, Moore ML, Morrow JD, Ji S, Elias JA, Goleniewska K, O'Neal J, Mitchell DB, Graham BS, Zhou W. Allergen-induced airway hyperresponsiveness mediated by cyclooxygenase inhibition is not dependent on 5-lipoxygenase or IL-5, but is IL-13 dependent. *J Immunol.* 175: 8253-8259, 2005
 - 5) Hashimoto K, Durbin JE, Zhou W, Collins RD, Ho SB, Kolls JK, Dubin PJ, Sheller JR, Goleniewska K, O'Neal JF, Olson SJ, Mitchell D, Graham BS, Peebles RS Jr. Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT 1 results in airway dysfunction, airway mucus, and augmented IL-17 levels. *J Allergy Clin Immunol.* 116; 550-557, 2005.
 - 6) Hashimoto K, Sheller JR, Morrow JD, Collins RD, Goleniewska K, O'Neal J, Zhou W, Ji S, Mitchell DB, Graham BS, Peebles RS Jr. Cyclooxygenase inhibition augments allergic inflammation through CD4-dependent, STAT6-independent mechanisms. *J Immunol.* 174: 525-532, 2005.
 - 7) 錫谷達夫、石岡賢. HSV の遺伝子とその産物. *日本臨床* 64 巻 増刊号 3: 127-132, 2006
2. 学会発表
- 1) Kaneko H, Kawana T, Suzutani T. Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005.
 - 2) Hashimoto K, Hosoya M, Suzuki H, Peebles RS Jr., Suzutani T. Polymorphism of the promoter region of prostacyclin synthase gene in hospitalized children due to RSV Infection. RSV 2005 Symposium, Oxford, UK September 15-18 2005
 - 3) Zhao D-C, Suzutani T, Hashimoto K. HSV replication up-regulates SOCS 1 and SOCS 3 expression in the FL cells. 12th International Conference on

- Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005.
- 4) Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Yanagida T, Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T. Superinfection of cytomegalovirus with different strain from donors is a major cause of acute rejection in renal transplantation. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005.
 - 5) Nozawa N, Suzutani T, Oomori K, Koyano S, Fukui Y, Baba Y, Ogawa H, Yamamoto Y, Yanagi M, Komura H, Kurane I, Inoue N. Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus (HCMV) infection and their applications. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005.
 - 6) 橋本浩一、細矢光亮、鈴木仁. RSV 感染マウスモデルにおける PGI₂ の RSV 感染症への影響 第108回日本小児科学会学術集会、東京、2005年4月22-24日
 - 7) 橋本浩一、森修一、金子久俊、錫谷達夫. マウス RSV 感染モデルを用いた DSCG の RSV 感染症への影響の検討。 第15回抗ウイルス化学療法研究会、屋久島、2005年5月13、14日
 - 8) 橋本浩一. STAT1 欠損マウスにおける RSV 感染について 第46回日本臨床ウイルス学会、福岡、2005年6月3、4日
 - 9) 橋本浩一、錫谷達夫. STAT1 欠損マウスを用いた RSV 感染症重症化因子の検討 第59回日本細菌学会東北支部会総会、山形市、2005年8月25、26日
 - 10) 石橋啓、橋本浩一、金子久俊、錫谷達夫. サイトメガロウイルス AD169 株の HUVEC への感染とその影響 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月20-22日
 - 11) 橋本浩一、錫谷達夫、石橋啓、金子久俊、細矢光亮. RSV に対する siRNA の in vitro、in vivo における検討 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月20-22日
3. 特別講演
- 1) 錫谷達夫. 水痘と帯状疱疹. 第5回福島感染コントロール研究会 7月16日 郡山市
 - 2) 錫谷達夫. サイトメガロウイルス感染症の話 第4回みちのくウイルス塾 7月17日 仙台市
 - 3) 錫谷達夫. 単純ヘルペスウイルスの免疫回避機能と潜伏感染. 11月7日 南大阪眼科勉強会 大阪府狭山市
 - 4) 橋本浩一. 気管支喘息と RS ウイルス. 第13回 BM アレルギー研究会 12月8日 郡山市

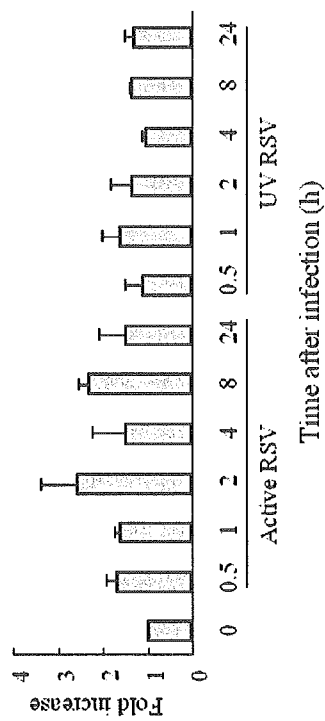
H. 知的財産権の出願・登録状況
準備中

図 1. HEP-2 細胞における RSV 感染後の SOCS 遺伝子発現の検討

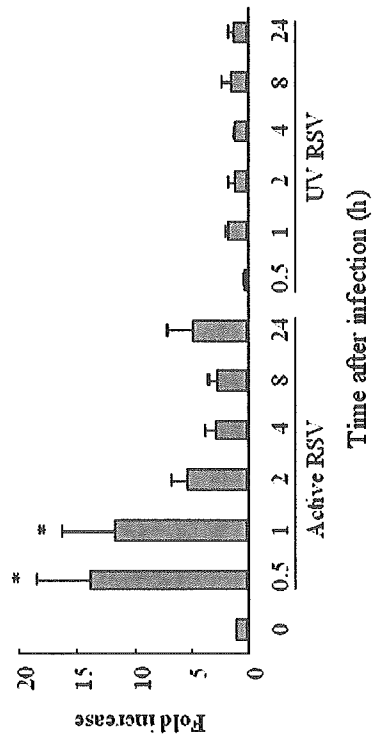
A) SOCS1



B) SOCS2



C) SOCS3



D) CIS

