

(資料2)

インフルエンザの重症化とサイトカイン、特にインターフェロン産生の機序解明に関する研究

研究分担者 林日出喜 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究要旨

インフルエンザウイルス(IFV)感染の成立、重症化の機序には、ウイルス側、宿主側の因子が複雑に関与し、多様性が示されている。まず、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin の候補を絞り込み、治療標的となりうる分子を推定した。また、ウイルスの感染成立、及び重症化に関わる宿主側の因子のひとつとしてトリプシン様タンパク質分解酵素が明らかになっている。我々は消化酵素として十二指腸上皮で発現しトリプシノーゲンを活性化するエンテロキナーゼ(EK)が、一般のいろいろな培養細胞でも発現しており、トリプシノーゲンを切断、活性化することで、IAV-HA(ヘマグルチニン)のプロセッシングを促進するという、IAV 感染の新たな経路の存在を明らかにした。特に、EK の新しいアイソフォームとして発見した EK-v2 の IAV 感染における役割を明らかにし、その機構を標的とした抗ウイルス薬の開発につながる可能性が示唆された。

A . 研究目的

A 型インフルエンザウイルス (IAV) 初期感染、及びその後の感染拡大の防止に宿主細胞のインターフェロン・シグナル伝達経路が重要な役割を果たしているが、この中心にある分子が IRFs (Interferon regulatory factors) である。我々は IRF2-KO (knock-out) マウスの解析から IRF2 がトリプシノーゲン遺伝子発現、及び細胞内輸送、分泌にかかわることを明らかにしたが、宿主細胞のトリプシン活性は IAV 感染、及びその重症化において重要な働きをしている。そのため、特に IRFs とトリプシン活性化が、IAV の感染成立・拡大、あるいは感染防御にどのように関わるか検討し、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin を同定し、適切な治療につなげることを目的とする。

その過程で、我々は消化酵素として十二指腸上皮で発現しトリプシノーゲンを活性化するエンテロキナーゼ (EK) が、一般のいろいろな培養細胞で

も発現していることを明らかにした。この EK がトリプシノーゲンを切断、活性化することで、IAV-HA(ヘマグルチニン)のプロセッシングを促進するという、IAV 感染の新たな経路が存在する可能性を示してきた。その際、従来から報告のある EK(ここでは簡便性のため EK-v1 と呼ぶことにする)に加え、その酵素活性を有する細胞膜外ドメインに 30 アミノ酸の挿入がある新規アイソフォーム (EK-v2 と呼ぶことにする) をクローニングした。IAV 感染における EK-v1、EK-v2 の役割を明らかにし、その機構を標的とした抗ウイルス薬の開発につなげることも本研究の目的である。

B . 研究方法

1) IAV 感染の主たる標的細胞である肺胞細胞由来の培養細胞株、A549 細胞と H292 細胞は IAV 感染後のウイルス増殖に関して際立った相違が報告されている。A549 細胞ではウイルスが増殖を続けるが、H292 細胞では最初増殖

したウイルスが時間経過に伴いより速やかに排除される。ウイルスの排除に関する宿主側の反応の違いによると考えられ、その原因分子を特定することは、重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin を同定することにつながると考えられた。そのため、インターフェロン(IFN)シグナル伝達遺伝子、IFN 誘導遺伝子群(ISGs)、Toll-like receptor シグナル伝達遺伝子、トリプシノーゲン関連遺伝子、炎症性サイトカイン・ケモカイン類、約 100 種類の遺伝子をクローニング(表 1)して、Real-time PCR 法で各遺伝子の発現量を定量した。

2) ヒトのいろいろな培養細胞での I-IV 型トリプシノーゲン(PRSS1、PRSS2、PRSS3-v2、PRSS3-v1)、及びその活性化する酵素として知られるエンテロキナーゼ(EK)、さらに、細胞膜上に発現しこれまでに IAV-HA(ヘマグルチニン)を切断活性化することが知られている HAT、TMPRSS2、TMPRSS4 の調べるため、それらの cDNAs をクローニングした。

3) これらの培養細胞に IAV を感染させ、ウイルス増殖の程度を IAV-HA の発現量で、宿主のインターフェロン(IFN β)、及び ISGs の誘導を Real-time PCR で、調べた。さらに I-IV 型トリプシノーゲン(PRSS1、PRSS2、PRSS3-v2、PRSS3-v1)、エンテロキナーゼ(EK-v1、EK-v2)、及び細胞膜貫通型セリンプロテアーゼ(HAT、TMPRSS2、TMPRSS4)の発現量も Real-time PCR、及びウェスタンブロットで検討した。

4) 293T 細胞に、EK-v1、EK-v2、PRSS3-v2 を強制発現させた、安定細胞株(293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3)を作成し、IAV を感染させ、一定時間後に培養上清に放出された IAV の量を IAV に対する特異的抗体を

用いて測定した。

5) *in vitro* において EK-v1、EK-v2 が PRSS3-v2 を切断し、そのトリプシン活性を上げるか、293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株のライセートを使い、GPR-pNA を基質としてトリプシン活性を測定した。

6) *in vitro* において EK-v1、EK-v2 により切断、活性化された PRSS3 が、TPCK 処理トリプシン(TPCKT)、あるいは N 末端-アセチル化トリプシン(NAT)と同様に IAV-HA のプロセッシングを行うか調べた。IAV を感染、増殖させた U937 細胞ライセートと 293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株のライセートを使って調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学組み換え DNA 実験安全委員会の承認を受け、その指針に従い実施した。

C . 研究結果

1) まず、IAV 感染感受性 A549 細胞と抵抗性 H292 細胞での IAV ウイルス量を継時的に測定し、H292 細胞ではウイルスがより速やかに排除されることを確認した(図 1)。次に表 1 にあげた遺伝子の定量を継時的に行い、IAV 感染により 3 倍以上の変化がみられた遺伝子を以下 3 つのグループに分けることができた。

i) 両細胞で同程度発現の上昇がみられた分子: ADAR1、GBP1、GBP2、IFIT1、IFIT2、IFIT3、IFIT5、IFNL3、IRF1、IL6、IRF7、IRF9、ISG15、MDA5、MX1、MYD88、OAS1、OAS2、PKR、RIG-I、TLR3、TNFA(図 2)。

ii) IAV 感染感受性 A549 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子: CCL5、IFNB1、IFNL1、IFNL2、IL17F、STAT1(図 3)。

iii) IAV 感染抵抗性 H292 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子: AIM2、CXCL10、IFITM1、IFITM2、IFITM3、MX2、PYHIN1、STING(図 4)。

2) 従来から報告のあった 25 エクソンからなる EK 遺伝子(EK-v1)に加え、26 エクソンからなる新たな EK 遺伝子アイソフォーム(EK-v2)もクローニングした(図 5)。

3) EK の十二指腸上皮以外での発現や役割については不明な点が多かったが、Real-time PCR 法で調べたほとんどの培養細胞で EK mRNA の発現が観察されたが、HAT、TMPRSS2 及び TMPRSS4 の発現はある程度限られていた(図 6)。また、PRSS1 及び PRSS3 も多くの細胞に発現がみられた(図 7)。

4) EK-v1、EK-v2、PRSS3-v2 を強制発現させた 293T 安定細胞株(図 8)に、IAV を感染させ、80 時間後に培養上清に放出された IAV の量を IAV-HA に対する特異的抗体を用いて測定したところ、他の細胞に比べ、293T-EK-v2 細胞内、及び上清に放出されたウイルスを調べたところ、IAV の顕著な増殖と IAV-HA プロセッシングの更新がみられた(図 9)。

5) 293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株、及び TMPRSS2、TMPRSS4、HAT を一過性に強制発現させた 293T 細胞のライセートを使い、GPK-pNA を基質としてトリプシン活性を測定した。この *in vitro* の系で EK-v1、EK-v2 は PRSS3-v2 トリプシノーゼンを活性化したが、TMPRSS2、TMPRSS4、HAT は PRSS3 を活性化できなかった(図 10、11)。

6) *in vitro* で U937 細胞に由来する IAV ライセートを TPCK 処理トリプシン(TPCKT)、あるいは N 末端-アセチル化トリプシン(NAT)で室温 30 分処理すると、65-kDa の IAV-HA₀ が消失し、代わ

りに 25-kDa の IAV-HA₂ が出現し、IAV-HA のプロセッシングが確認された(図 12)。PRSS3-v2、EK-v1、EK-v2 のみでは IAV-HA のプロセッシングがみられなかったが、PRSS3-v2 により EK-v1 あるいは EK-v2 を活性化させると、トリプシン処理した場合同様に 65-kDa の IAV-HA₀ が消失し、代わりに 25-kDa の IAV-HA₂ が出現し、IAV-HA のプロセッシングが確認された。これらのことから、従来から報告されていた TMPRSS2、TMPRSS4、HAT を介した IAV-HA の活性化経路に加え、PRSS(トリプシノーゼン)の EK(エンテロキナーゼ)による活性化が、IAV-HA のプロセッシングを促進する新たな IAV の感染経路の存在が示唆された(図 13)。

8) これらの細胞に IAV を感染させ、その増殖の程度を IAV-HA の発現量で見たとすると、前述のように H293 細胞に比べ A549 細胞では IAV-HA の発現が確認できた(図 14)。さらに、Huh7 と 293T 細胞ではより顕著な IAV-HA の発現がみられた。これらの細胞では polyI:C をトランスフェクトして RIG-I を活性化した際の IFN β の反応が弱かった(図 15)。特に 293T 細胞では、IFN α 刺激に比べ、polyI:C トランスフェクトによる IFIT1 等の ISGs の発現上昇が充分見られなかった(図 16)。

iii) IAV 感染の際には、図 17 に示すように、IAV RNA を RIG-I が検知し、ストレス顆粒(SG)と複合体を形成し、IPS-1 を介し、IFN α/β 誘導、さらに ISGs(IFN 誘導遺伝子群)の発現を上昇させ、ウイルスの排除を行うと考えられている。293T 細胞にいろいろなインターフェロン・シグナル伝達分子を強制発現させ、IAV 感染への影響をみたところ、活性化型の RIG-I(RIG-I-CA)、IPS-1、IKK ϵ 、IFITM3 及び IRF1 を発現させると、IAV の増殖が明らかに抑制

された(図 18)。活性化型の RIG-I(RIG-I-CA)、IPS-1、IKK ϵ は IFN α/β の発現を誘導することにより、IRF1 は多くの ISGs 発現を誘導することにより、IFITM3 は直接 IAV に作用して、IAV の感染を抑制していると考えられた。したがって、293T 細胞は IPS-1 以降、IFN α/β 発現誘導、それに続く ISGs 発現誘導、IAV 排除の過程は正常に機能しているものの、RIG-I と SG の複合体形成の段階での機能異常が示唆された。

D . 考察

1) 重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin の候補遺伝子としては、IAV 感受性 A549 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子：CCL5、IFNB1、IFNL1、IFNL2、IL17F、STAT1 が第一候補と考えられた。一方、IAV 感染抵抗性 H292 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子：AIM2、CXCL10、IFITM1、IFITM2、IFITM3、MX2、PYHIN1、STING は、むしろ IAV の排除により関わる分子の可能性があると考えられた。実際に、293T 細胞を使った IAV 感染系で IFITM3 による IAV 感染増殖抑制が確認された(図 18)。

2) EK が IAV 感染の成立、重症化に関わる新たなトリプシン様タンパク質分解酵素の一つと考えられた(図 13)。in vitro においては EK-v1, EK-v2 とともに PRSS を活性化する酵素活性、および IAV のプロセッシング能は同程度有していたが、in vivo では EK-v2 が顕著な IAV 感染促進作用を示した(図 9)ことから、新たに発見した EK-v2 が、IAV 感染の成立、重症化に強く関わっている可能性がある。EK-v2 と EK-v1 の違いは 30 アミノ酸の挿入の有無だけで、その部位は細胞の外からアクセスで

きるため、今後、この 30 アミノ酸部位を中心に EK 分子をターゲットとして、IAV 感染の抑制ができるかどうか検討したい。

E . 結論

重症化の早期診断マーカー、SOS シグナルとしての Flu Alarmin の候補分子をある程度絞り込むことができた。また、新たな EK-v2 PRSS HA プロセッシングの経路が、IAV 感染の成立、重症化に関わる可能性が高いことが示唆された。この経路をターゲットとした新たな IAV 感染治療薬の開発につながることを期待される。

F . 健康危険情報

なし。

G . 研究発表(平成 26 年度)

(ア)論文発表

1. Kakoki K, Kamiyama H, Izumida M, Yashima Y, Hayashi H, Yamamoto N, Matsuyama T, Igawa T, Sakai H, Kubo Y. Androgen-independent proliferation of LNCaP prostate cancer cells infected by xenotropic murine leukemia virus-related virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 447, 216-22 (2014).
2. Shigematsu S, Hayashi H, Yasui K, Matsuyama T. SAM domain-containing N-terminal region of SAMHD1 plays a crucial role in its stabilization and restriction of HIV-1 infection. *Acta Med Nagasaki*, 58, 103-111 (2014).
3. Kakoki K, Shinohara A, Izumida M, Koizumi Y, Honda E, Kato G, Igawa T, Sakai H, Hayashi H, Matsuyama T, Morita T,

- Koshimoto C, Kubo Y.
Susceptibility of muridae cell lines to ecotropic murine leukemia virus and the cationic amino acid transporter 1 viral receptor sequences: implications for evolution of the viral receptor. *Virus Genes*. 48, 448-56 (2014).
4. Chua KJ, Kubo Y, Ma Y, Yasui K, Matsuyama T, and Hayashi H. A short variant BTBD2 as a novel negative regulator of IRF-associated signalling. *Int J Integrative Biol*. 14: 31-38, 2013.
 5. Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y. CXCR4-Tropic, But Not CCR5-Tropic, Human Immunodeficiency Virus Infection Is Inhibited by the Lipid Raft-Associated Factors, Acyclic Retinoid Analogs, and Cholera Toxin B Subunit. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 29(2):279-88, 2013
 6. Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv Virol*. 2012:640894. Epub 2012 Dec 6.
 7. Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H. Serum Starvation Activates NF- κ B Through G Protein β 2 Subunit-Mediated Signal. *DNA Cell Biol*. 31(11):1636-44, 2012
- (ア) 学会発表
1. インターフェロン γ によるレトロウイルス感染抑制に関与する新規細胞性因子の同定、久保嘉直、泉田真生、安井潔、林日出喜、松山俊文、第62回日本ウイルス学会学術総会、平成26年11月10~12日 (パシフィコ横浜)
 2. Hayashi H, Identification of poly(I:C)-induce pancreatitis-related genes in IRF2-deficient mice, 3rd International conference on "Current advances in Microbiology and Immunology" June 21-22, 2012 (ULAANBAATAR, MONGOLIA)
 3. インターフェロンG誘導遺伝子GILTによるHIV粒子産物抑制機構の解明、久保嘉直、神山陽香、泉田真生、田中勇悦、安井潔、佐藤祐徳、山本直樹、松山俊文、林日出喜、第61回日本ウイルス学会学術総会、平成25年11月10~12日 (神戸)
 4. ATL細胞株の細胞死をTRAIL-依存性に促進させる生物活性物質のスクリーニング、林日出喜、長谷川寛雄、河野友子、中尾一彦、松山俊文、第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19~21日 (札幌)
 5. 血清枯渇は G Protein β 2 を介した NF- κ B 経路を活性化する、安井潔、河野友子、久保嘉直、原口恵、重松小百合、蔡君柔、松山俊文、林日出喜、第 35 回日本分子生物学会、平成 24 年 12 月 13 日 (マリンメッセ福岡)
- H . 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)**
- | | |
|-----|--------|
| (ア) | 特許取得 |
| なし | |
| (イ) | 実用新案登録 |
| なし | |
| (ウ) | その他 |
| なし | |
1. インターフェロン γ によるレトロウイルス感染抑制に関与する新規細

図 1. IAV 感染感受性 A549 細胞と抵抗性 H292 細胞における、感染させた IAV ウィルス量の継時的変化

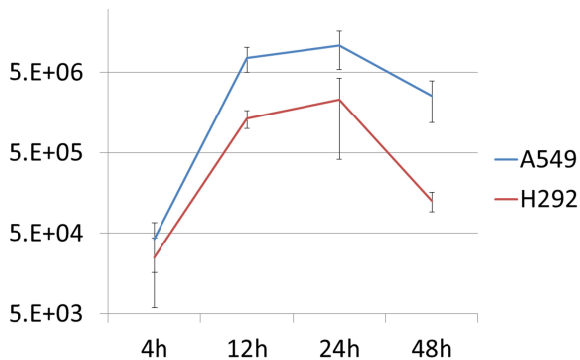


図 2. A549 細胞と H292 細胞の両方で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

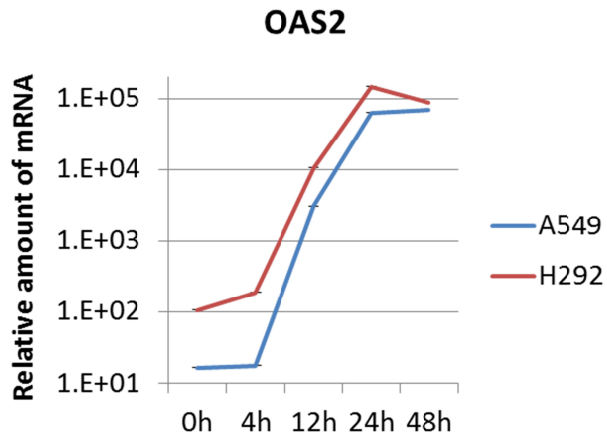


図 3. IAV 感染感受性 A549 細胞で、顕著な発現の上昇がみられた分子の例

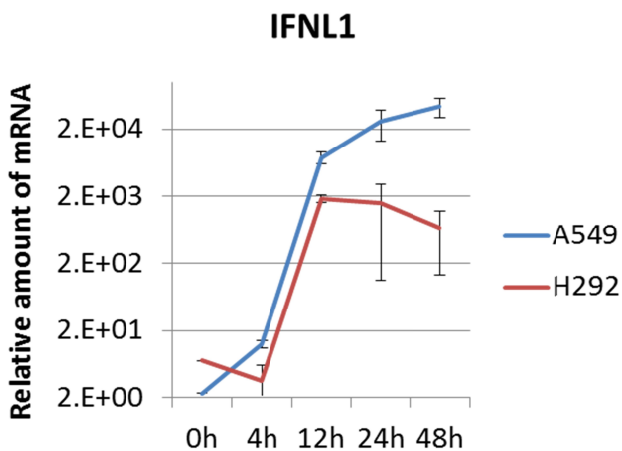


図 4. IAV 感染抵抗性 H292 細胞で、より顕著な発現の上昇がみられた分子

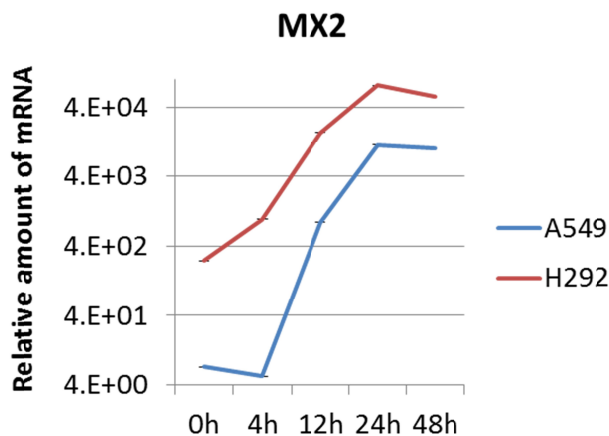


図5. EK(エンテロキナーゼ)遺伝子の構造

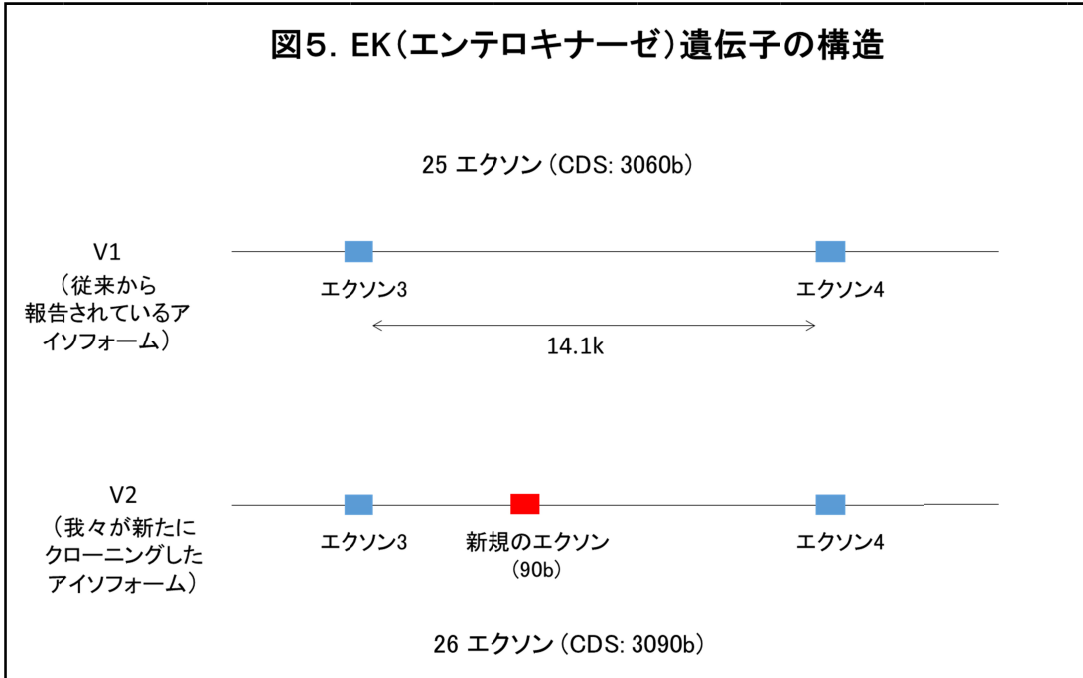


図6. 各種培養細胞における膜貫通型セリンプロテアーゼの発現 -mRNA (PCR)-

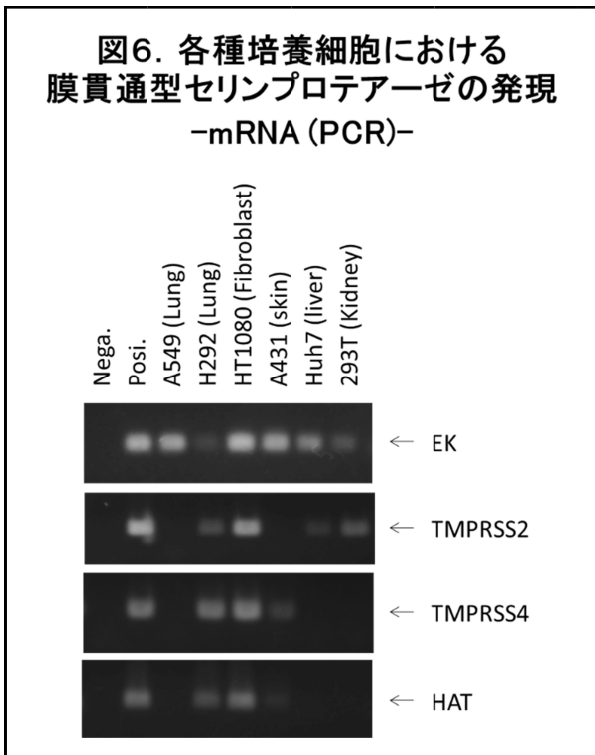


図7. 各種培養細胞におけるトリプシノーゲン遺伝子(PRSSs)の発現 -mRNA (PCR)-

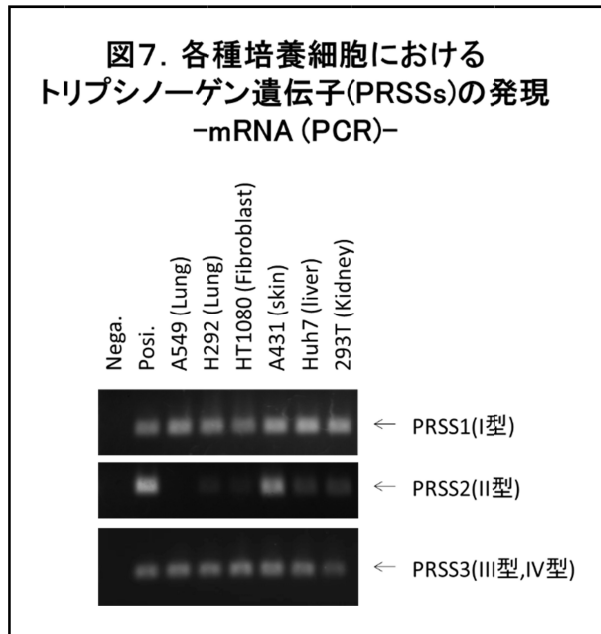


図8. EK-v1、EK-v2を強制発現させた293T細胞

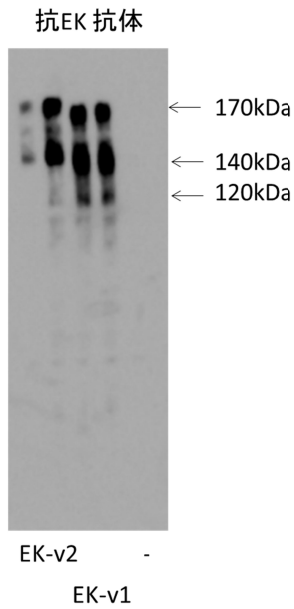


図9. EK-v1、EK-v2及びPRSS3を強制発現させた293T細胞におけるIAV-HAのプロセッシング

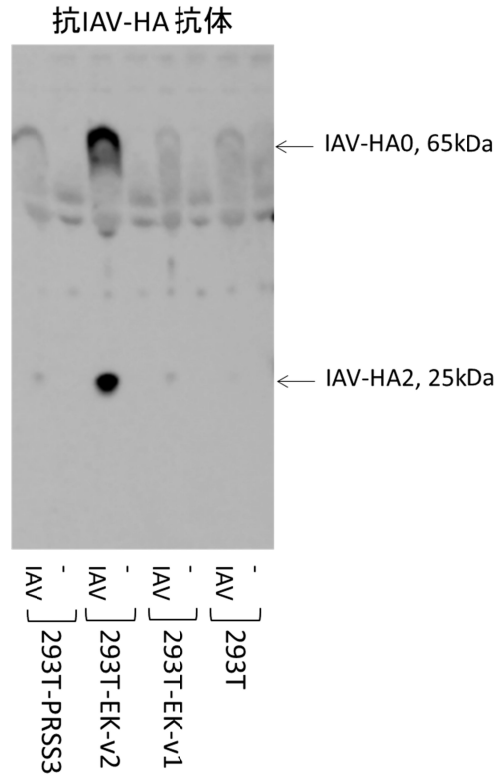


図10. EK-v1、TMPRSS2、TMPRSS4によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

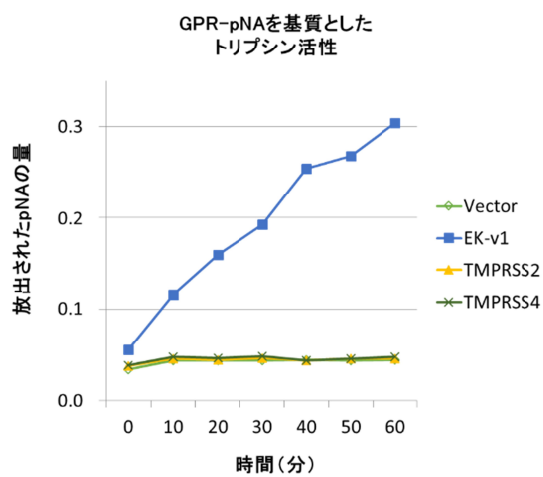
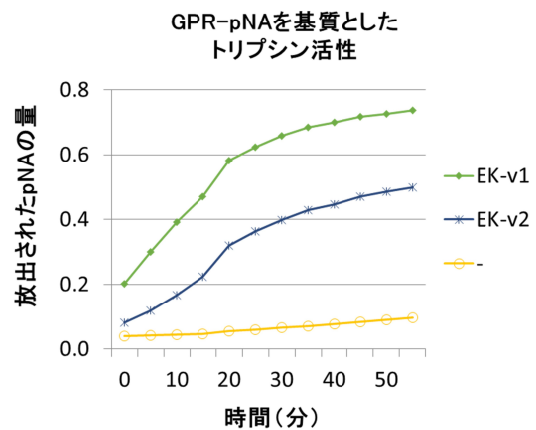


図11. EK-v1、EK-v2によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化



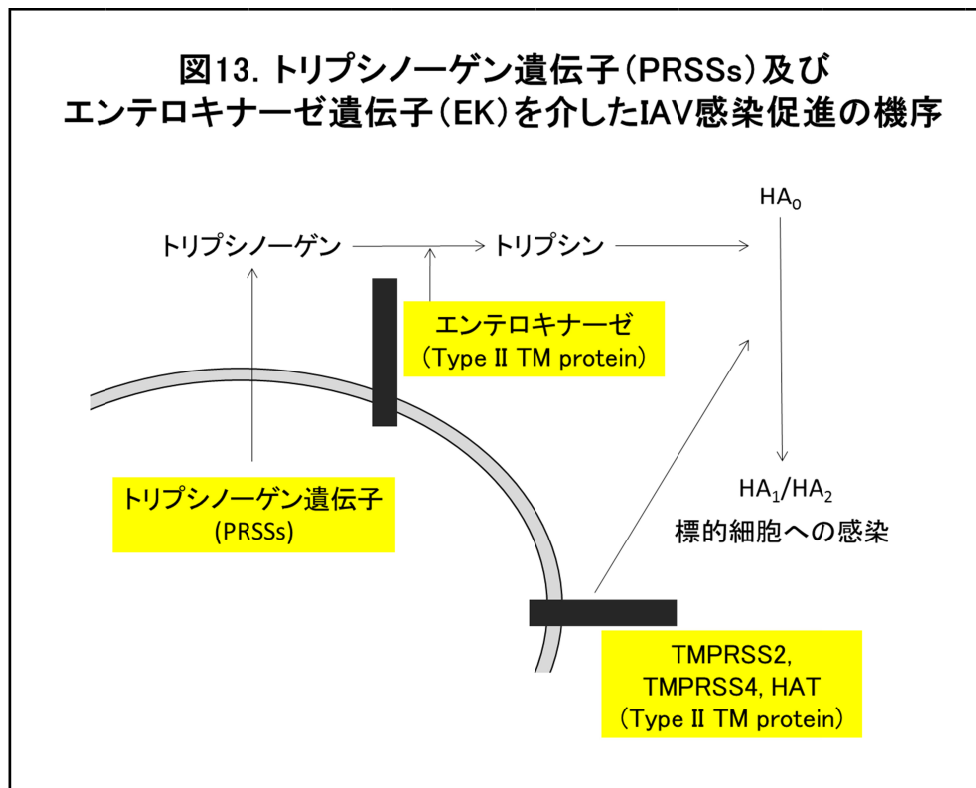
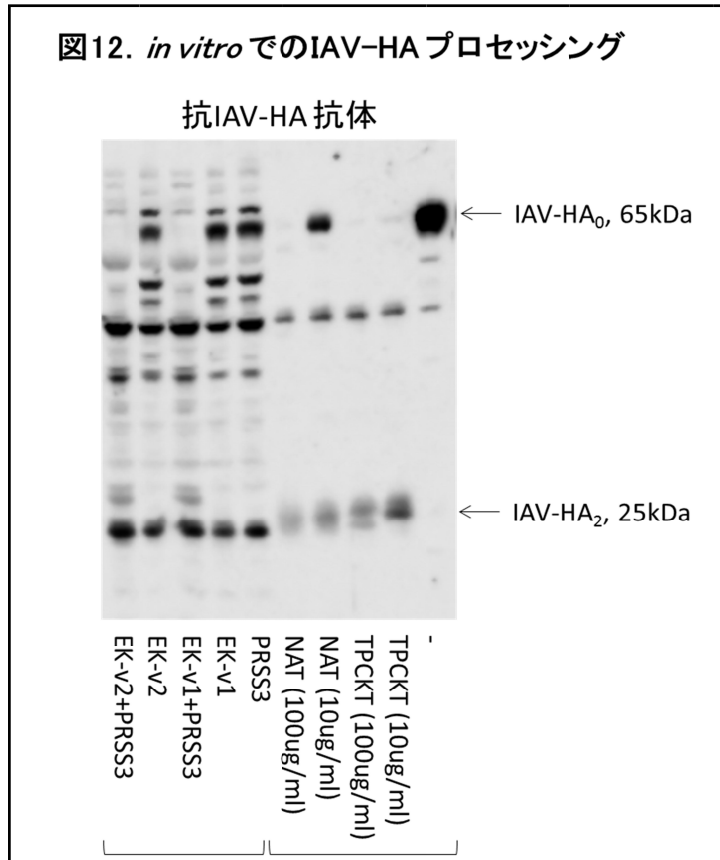
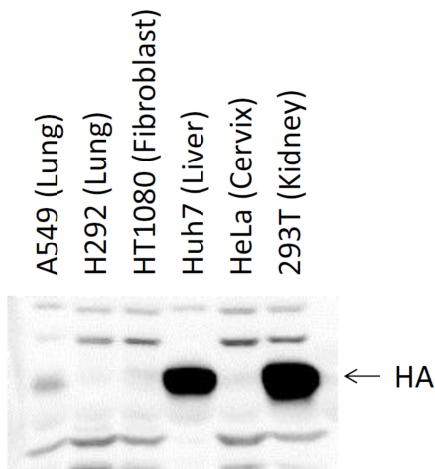


図 14 . 各培養細胞に IAV を感染させ、24 時間後に抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルス

の増殖を調べた。



フェクトして RIG-I を活性化 16 時間後の IFN β の発現を Real-time PCR で調べた。

IFN β 遺伝子発現

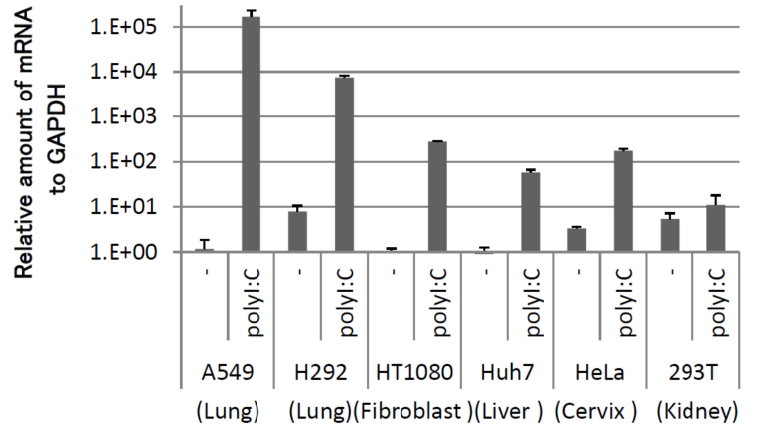


図 15 . 各培養細胞に polyI:C をトランス

図 16 .各培養細胞を IFN α 刺激、あるいは polyI:C トランスフェクトして RIG-I を活性化し、16 時間後に、ISGs の一つである IFIT1 の発現を Real-time PCR で調べた。

IFIT1 遺伝子発現

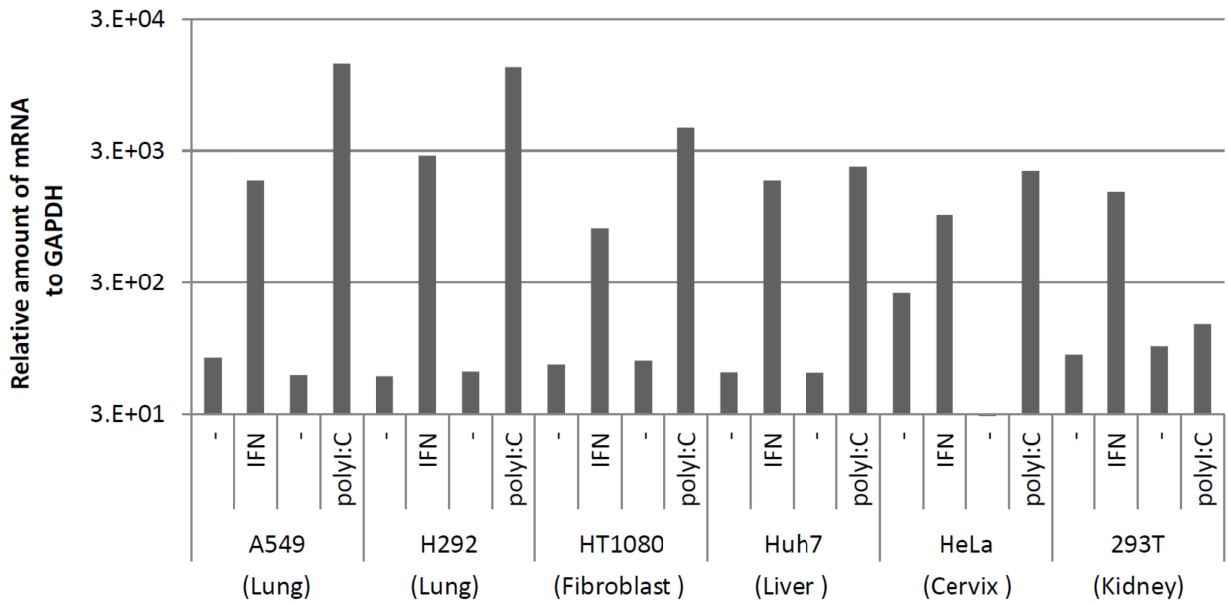


図 17 .

IAV感染とストレス顆粒(SG)

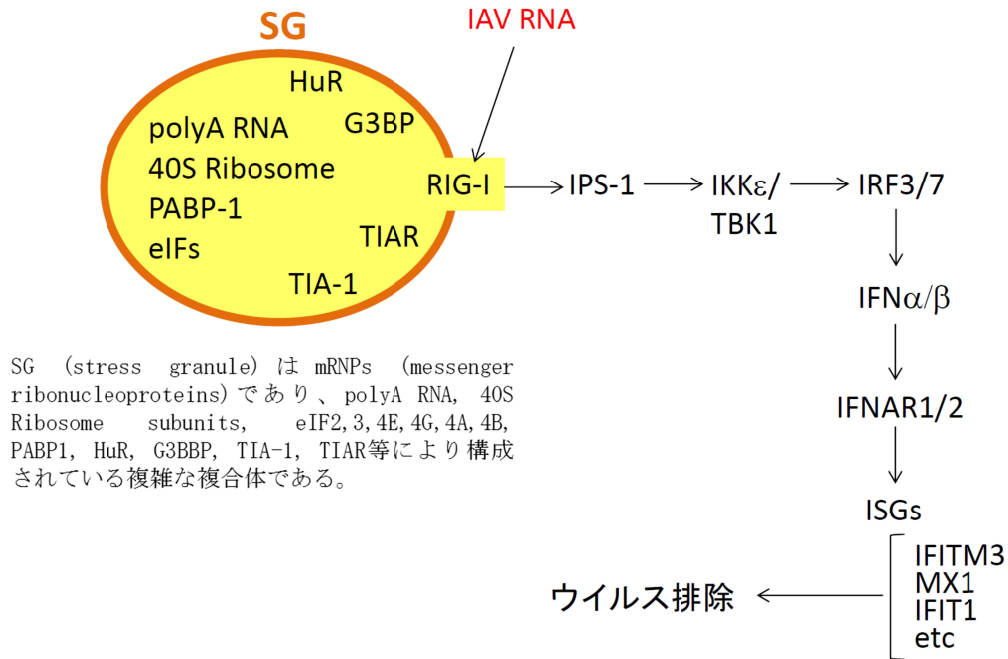


図 18 . 293T 細胞にいろいろなインターフェロン・シグナル伝達分子を強制発現させた後、IAV を感染させ、抗 IAV-HA 抗体を用いてウイルスの増殖を調べた。

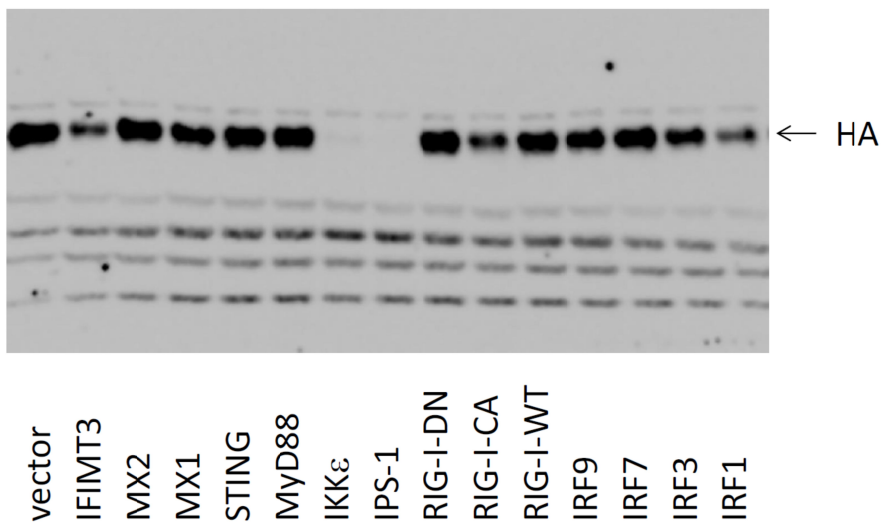


表1. ヒト・インターフェロン(IFN)、サイトカイン・シグナル伝達関連遺伝子

IFNシグナル伝達遺伝子	IFN誘導遺伝子群(ISGs)	Toll-like receptor関連遺伝子	トリプシン関連遺伝子	サイトカイン・ケモカイン類
CARDIF(IPS-1,MAVS)	ADAR1(G1P1)	ASC	ChymotrypsinC	CCL2
IFNA21(Alpha)	AHSG	FADD	Enterokinase	CCL5
IFNA6	AIM2	IkBA	PRSS1	CXCL10
IFNAR1 (Receptor)	ANXA10	IkBB	PRSS2	CXCL13
IFNB (Beta)	APOBEC3G	IKKA	PRSS3-v1	IL10
IFNG(Gmma)	CASP1	IKKB	PRSS3-v2	IL12p40
IFNGR1 (Receptor)	CASP2	IKKe	PRSS3-v3	IL17B
IFNL1(Lambda)	DR4	IRAK1	PRSS3-v4	IL17F
IFNL2	DR5	IRAK4	TMPRSS2	IL1B
IFNL3	FETUB	IRAKM		IL2
IRF1	GBP1	NALP1		IL33
IRF2	GBP2	NALP3		IL4
IRF3	IFIT1	NEMO		IL6
IRF5	IFIT2	p50		IL8(CXCL8)
IRF7	IFIT3	p65		IL9
IRF9	IFIT5	TLR2		TGFB
MDA5	IFITM1	TLR3		TNFA
MYD88	IFITM2	TLR4		
RIG-I	IFITM3	TLR7		
STAT1	ISG15(G1P2)	TLR9		
TBK1	MX1	TRADD		
TRIF	MX2	TRAF2		
	OAS1	TRAF6		
	OAS2			
	OASL			
	PKR			
	PYHIN1			
	REG3G			
	RNaseL			
	STING			
	TSPAN1			