

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

細胞障害を起こさないウイルスについての新しい分離法の開発に関する研究

研究分担者	水谷哲也	国立感染症研究所・ウイルス第1部
研究協力者	渡辺俊平・明石博臣	東京大学農学部（渡辺：現・九州大学医学部）
	池田正徳	岡山大学医学部
	塚越博之	群馬衛生環境研究所
	水田克巳	山形県衛生研究所
	野田雅博	国立感染症研究所・ウイルス第3部
	黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
	木村博一	国立感染症研究所・感染症情報センター

### 研究要旨

臨床検体から培養細胞を用いてウイルスを分離する場合、細胞融合や細胞死などの細胞障害を指標としてウイルスの感染の有無を判定する。しかし、既知のウイルスの中には細胞障害を起こさないものも知られている。呼吸器に感染するウイルスの中にも培養細胞に細胞障害を起こさない未知のウイルスが存在しているかもしれない。そこで、本研究では、ウイルス感染時に発現誘導される遺伝子群をウイルス分離の感染マーカーとして使用することを目的とした。すべてのウイルス種に共通した感染マーカーは今のところ見いだせなかったが、インターフェロンの下流として誘導される viperin など数種類の遺伝子が候補となった。

### A. 研究目的

ウイルスのサーベイランスにおいて、培養細胞を用いたウイルス分離は有効な手法のひとつである。ウイルス分離に成功したか否かは、細胞死や細胞融合などの細胞障害性の有無によって判定されている。一般には、細胞障害が観察された培養細胞の上清を新しい細胞に添加して、再び細胞障害を観察することにより、ウイルス分離が確認される。しかしながら、培養細胞に細胞障害を起こすことなく感染が成立するウイルスにおいては、ウイルス分離という手法は必ずしも有効ではない。

一方、多検体を同時に処理できる PCR 法の技術の進歩により、既知の呼吸器ウイルスを高感度に検出することは困難なことではなくなっている。しかし、今までに知られていないウイルス（未知のウイルス）については、ゲノム配列がわからないので PCR を実施できない。近年、我々はこのような未知のウイルスを検出する方法として、Rapid determination system of viral

nucleic acid sequences (RDV 法)を開発した (Mizutani et al. *Emerg. Infect. Dis.* 2007)。RDV 法は2日間でウイルスゲノムの遺伝子断片を高感度に検出できる方法であるが、検査の対象はウイルス分離された培養上清や血清に限られているが、我々は RDV 法を用いてこれまでに 12 の未知・稀少ウイルスを検出し、報告してきた。

そこで、本研究では、未知のウイルスを含んだ検体を培養細胞に添加したときに、細胞障害を起こさない場合であっても、ウイルス感染の有無を判定できるシステムを構築することを目的として、ウイルス感染マーカー遺伝子の検索をおこなった。

### B. 研究方法

培養細胞とウイルス：本研究では、培養細胞として Vero E6、Caco-2、MRC5、Hep-2、A549、RD-18S 細胞を用いた。また、Yokose virus、Canine parainfluenzavirus、Mammalian orthoreovirus 1、Feline calicivirus、Equine herpesvirus 1、Human

adenovirus 1、Human coxsackievirus A16 を用いて感染実験をおこなった。

**RT-PCR**：ウイルス感染細胞・非感染から抽出した RNA について、random primer と SuperScript III を用いて逆転写反応をおこない、GoTaq による PCR をおこなった。本研究では、インターフェロンおよびその下流として発現してくる遺伝子群として、Viperin、Mx1、Mx2、OAS-1、OAS-2、OAS-L、IFN-beta、ISG5、Herc5、CXCL10 を増幅した。また、必要に応じてゲルからバンドを抽出し、塩基配列を決定した。

**Western blot 解析**：ウイルス感染細胞について、MAPKs (mitogen-actiated protein kinases) の抗体を用いて Western blot 解析をおこなった。

**RDV 法バージョン 3.1**：検体に 10X DNase buffer, DNase I (Turbo DNasefree) RNase A (0.001 ug/ul)を加えて、37 度で 30 分間反応した後に、SuperaceIn を加えて RNase を不活化した。次に、Agilent Total RNA isolation mini kit のプロトコールに従い、RNA を抽出し、random primer を用いて Superscript III により逆転写反応をおこなった。ここに RNase H 1 ul 加えて 2 本鎖目の cDNA を合成した。次に Sigma Whole Genome Amplification kit のプロトコールに従い、DNA の fragmentation を行ない、ランダム増幅をおこなった。最後の増幅ステップはキットで推奨されている Taq ポリメラーゼの代わりに、Amplitaq Gold LD を用いた。PCR 産物を精製後、制限酵素 BfuC I と HpyCH4IV で消化し、アダプターを結合した。最後に 1 検体につき 64 通りの PCR 反応をおこない、3%アガロースを用いて PCR 産物を泳動しバンドの確認を行なった。約 150bp 以上のバンドを切り出し、ダイレクトシーケンスをおこなった。

(倫理面への配慮)

患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

## C. 研究結果

### 1) 感染マーカー遺伝子の候補

インターフェロンの発現により様々な遺伝子が発現誘導されることが知られている。これらは IFN-stimulated genes (ISGs)と呼ばれている。ウイルス感染細胞と非感染細胞をマイクロアレイを用いて比較すると、感染細胞で優位に発現上昇の認められる遺伝子群の多くは ISGs である (Yamane et al., Virus Res. 2009)。そこで、本研究では、フラビウイルス科に属する Yokose virus を Vero 細胞に感染させ、ISGs について PCR をおこない、感染細胞と非感染細胞における発現の差を検討した。まず、感染後 24 時間で Viperin、Mx1、Mx2、OAS-1、OAS-2、OAS-L、IFN-β、ISG5、Herc5、CXCL10 の検出を試みたところ、viperin と OAS-L では非感染細胞において検出できなかったのに対して、感染細胞では容易に増幅されていた (図 1)。しかし、その他の ISGs では非感染細胞と感染細胞の有意な差は認められなかった。さらに、ウイルス感染後、viperin と OSA-L の発現を継時的 (24、48、72 時間) に調べると、どの時間においても発現していることが明らかになった (図 2)。以上の結果から、Yokose virus が Vero E6 細胞に感染したときには、ISGs の中でも Viperin と OAS-L は感染マーカーの候補となり得ると考えられた。

### 2) 各種ウイルスにおける ISGs の発現

Vero E6 細胞はよくウイルス分離に使われる培養細胞である。そこで、Vero E6 細胞に様々なウイルスを感染したときに Viperin と OAS-L の発現が誘導されるか否かについて検討した。まず、canine parainfluenzavirus、Mammalian orthoreovirus 1、Equine herpesvirus 1 について検討したところ、canine parainfluenzavirus、Mammalian orthoreovirus 1 感染細胞では、Viperin と OAS-L の発現が誘導されていたのに対して、Equine herpesvirus 1 感染細胞では誘導されなかった (図 3)。特に、Mammalian orthoreovirus 1 は Vero E6 細胞に細胞障害を起こさなかったが、Viperin と OAS-L の発現誘導が認められた。これらのウイルス感染においても、Mx1、Mx2、Herc5 の発現の変化はなかった。

### 3) 衛生研究所において分離されたウイルスを

## 用いた検討

群馬衛生環境研究所・塚越博士により、ヒト検体から分離された Human adenovirus 1 と Human coxsackievirus A16 を各種細胞 (Vero E6、Caco-2、MRC5、Hep-2、A549、RD-18S) に再感染させ、細胞から RNA を抽出し、ISGs について PCR をおこなった (表 1)。これらのウイルスと細胞の組合せでは、Viperin や OAS-L は感染細胞と非感染細胞の間で差はみとめられなかった。しかし、Human adenovirus 1 を MRC5 細胞に感染させた場合には、OAS-1 と Mx1、Mx2、CXCL10 の発現誘導が認められ、A549 細胞では Herc5 が発現した。また、Human coxsackievirus A16 を MRC5 細胞に感染させたときには CXCL10 が発現していた。このように、Viperin とは別の ISGs を感染マーカーとして用いることができることも明らかになった。

## 4) 細胞障害を起こさないヒト検体を用いた検討

塚越博士が MRC5 細胞を用いてヒト検体のウイルス分離を試み際に、細胞障害を起こさなかった 17 検体について、Viperin と OAS-1 の発現を検討したところ、3 検体において発現誘導が認められた (検体番号 6, 7, 8)。これらの細胞の培養上清にはウイルスが含まれている可能性があるため、RNA を抽出して RDV 法を実施した。図 4 には、検体番号 8 の RDV 法の最終 PCR 産物とダイレクトシーケンスの結果を載せた。今回の検討においては、どの検体からもウイルスの遺伝子断片を発見することができなかった。

## 5) Viperin 発現誘導に関わるシグナル伝達系の検索

図 1 で示したように Yokose virus を Vero E6 細胞に感染させると、viperin の発現が誘導された。しかし、Vero E6 細胞はインターフェロンの遺伝子が欠損していることが知られており、確かに IFN-beta の PCR では増幅産物が得られなかった。論文では Viperin はインターフェロンにより誘導されると報告されているが、本研究からインターフェロンの関与無しでも誘導されていることが明らかになった。そこで、一般にウイ

ルス感染時に活性化されてくるシグナル伝達経路 (MAPKs および AKT) に着目して、Western blot 解析をおこなった。図 5 に示すように、ウイルス感染後においても ERK、JNK、p38 などの MAPK や AKT のリン酸化は認められなかったため、これらのシグナル伝達経路は少なくとも Viperin の発現には関与していないことが示唆された。

## D. 考察

本研究では、ウイルスが感染したときに細胞障害を起こさなくてもウイルス感染の有無を判定できるようなマーカー遺伝子の探索をおこなった。最初は Yokose virus と Vero E6 細胞においてインターフェロンの下流遺伝子に着目して検討した結果、Viperin や OAS-L が感染マーカーの候補となった。しかし、種々のウイルスや細胞を用いてさらに検討を加えると、ウイルスによっては Viperin や OAS-L がマーカーとして用いることができない場合もあった。また、別の ISGs の発現誘導に変化がある組み合わせもあった。

すべてのウイルスに共通する感染マーカーを見つけることは重要であるが、viperin は比較的多くのウイルス感染細胞で誘導されるようなこともわかった。本研究で用いたウイルス以外では、Human cytomegalovirus (CMV)、Hepatitis C virus (HCV) など 9 種類のウイルスで感染後に発現誘導が認められたという報告がある。また、Viperin の作用は、HCV では細胞内複製の場 (lipid droplet) においてウイルス蛋白質と結合して、ウイルスの複製を阻止することが知られている。また、Influenza virus では、ウイルス粒子の放出を阻害することが明らかになっている。このように viperin は感染マーカーだけでなく、抗ウイルス作用の面からも重要な ISG である。

Viperin に関する論文は CMV 以外はすべて RNA ウイルスを用いた研究である。CMV の研究ではウイルスによる発現誘導については検討されていないので、DNA ウイルスと viperin の発現については不明な点が多い。本研究においてもアデノウイルス科とヘルペスウイルス科の

DNA ウイルスを用いた場合には viperin の発現は認められなかった。今後、種々の DNA ウイルスを用いた検討が必要である。

Viperin は、Virus inhibitory protein, ER-associated, IFN-inducible の略であり、インターフェロンによって発現誘導されると報告されている。本研究で用いた Vero E6 細胞はインターフェロン遺伝子が欠損していることが明らかになっているが、Yokose virus の感染では明らかに viperin が発現していた。この結果は、viperin がインターフェロン以外の刺激でも発現することを示唆している。本研究では MAPKs と AKT シグナル伝達系路に着目して検討をおこなったが、これらの経路の活性化は認められなかった。SARS コロナウイルスでは Vero E6 細胞に感染すると、p38 MAPK の活性化により細胞死が誘導されることがわかっているが、Yokose virus では p38 MAPK の活性化は起こっていなかった。しかし、感染細胞は 72 時間後に細胞障害が認められる。Western Blot 解析において、活性化したカスパー 3 と 7 が検出されているので、アポ

トーシスによる細胞死が示唆される。Yokose virus の細胞死に至るまでに活性化されるシグナル伝達経路の解明を明らかにすることにより、viperin の発現誘導のメカニズムを解明できるであろう。

#### **E. 結論**

本研究において、細胞障害を起こさないウイルスにおいて Viperin や OAS-L の発現を検討することにより、ウイルス感染の有無を判定できる可能性を示した。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表1. アデノウイルスとコクサッキーウイルスを用いた感染マーカーの検討

Cells	Virus	Virus PCR	OAS-1	Viperin	mx1	mx2	OAS-L	OAS-2	ISG15	IFN-beta	CXCL10	Herc5
Caco-2	Human adenovirus 1	+	+	-	+	+	(+)	+	+	+	(+)	+
	Human coxsackievirus A16	+	+	(+)	+	+	(+)	+	+	+	(+)	+
	Mock	-	+	(+)	+	+	(+)	+	+	+	(+)	+
MRC5	Human adenovirus 1	+	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	+
	Human coxsackievirus A16	+	-	-	-	-	(+)	+	+	(+)	+	(+)
	Mock	-	-	-	-	-	(+)	+	+	(+)	-	(+)
Hep-2	Human adenovirus 1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	Human coxsackievirus A16	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
	Mock	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
VeroE6	Human adenovirus 1	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
	Human coxsackievirus A16	+	+	-	-	-	-	+	+	-	(+)	-
	Mock	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
A549	Human adenovirus 1	+	+	-	+	(+)	+	+	+	+	-	+
	Human coxsackievirus A16	-	+	-	+	(+)	+	+	+	+	-	-
	Mock	-	+	-	+	(+)	+	+	+	+	-	-
RD-18S	Human adenovirus 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Human coxsackievirus A16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Mock	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

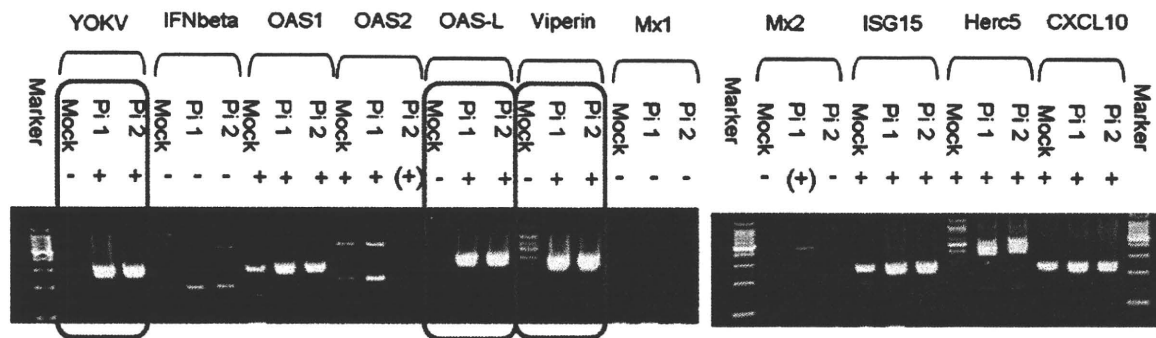


図1 Yokose virus 感染 Vero E6 細胞における ISGs の発現誘導

Pi1、Pi2 は 1 回目と 2 回目のサンプリングによる解析を表している。赤い□で囲んだ部分が非感染細胞と感染細胞で差がある遺伝子を表している。

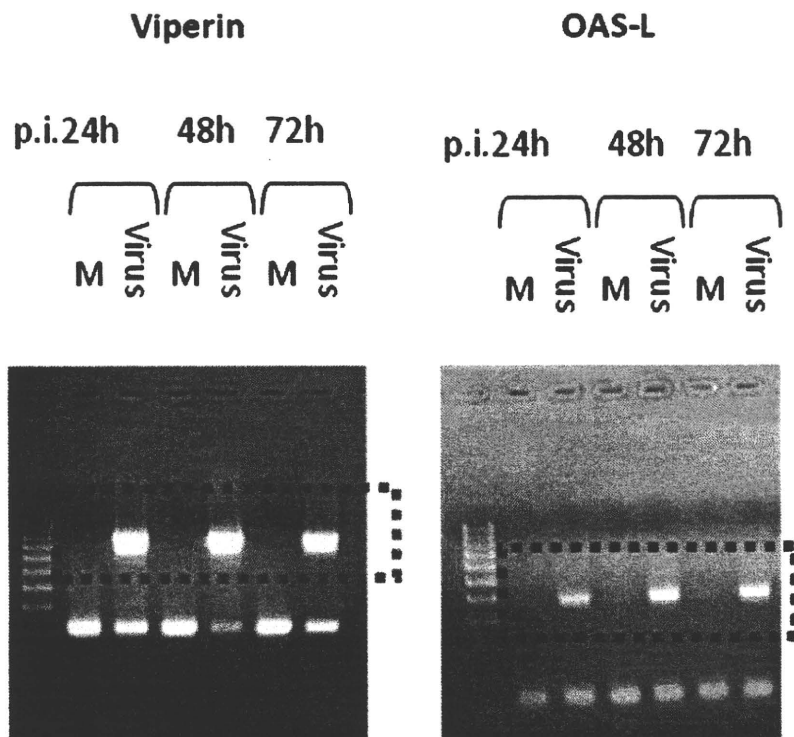


図2 感染マーカーの継時的発現の検討

Yokose virus を Vero E6 細胞に感染後、24、48、72 時間でサンプリングをおこなった。72 時間で細胞障害が観察されるので、24、48 時間においては細胞に変化が無くてもこれらの感染マーカーを調べることにより、Yokose virus の感染の有無を判定できる。

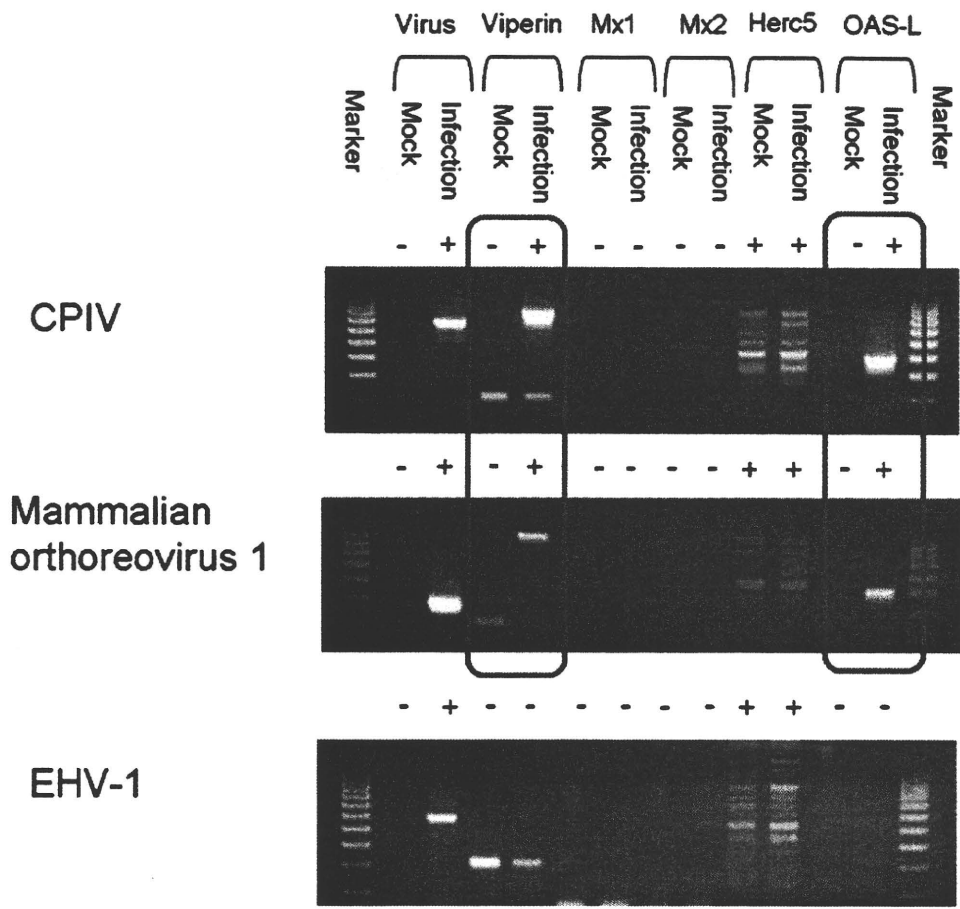


図3 各種ウイルス感染 Vero E6 細胞における ISGs の発現誘導  
 CPIV: Canine parainfluenzavirus、EHV-1: Equine herpesvirus 1  
 赤い□で囲んだ領域は非感染細胞と感染細胞で差があることを示している。

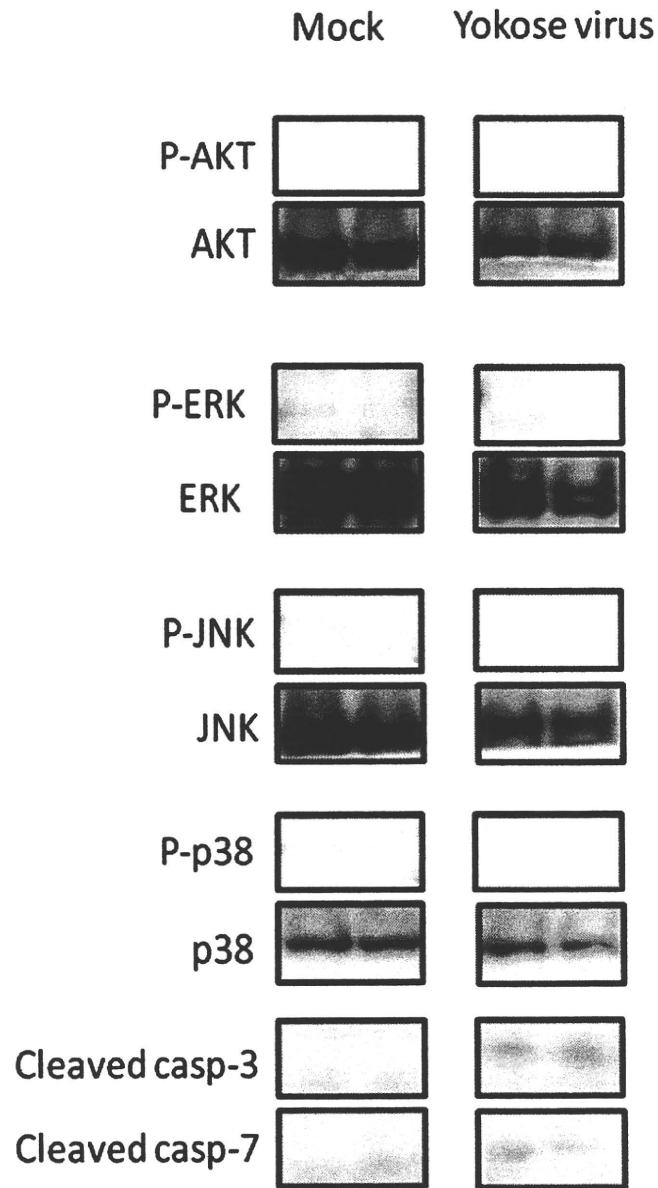


図4 Yokose virus 感染細胞におけるシグナル伝達経路の解明  
リン酸化抗体を用いた Western blot 解析をおこなった。Cleaved casp は活性化カスプーを認識する抗体である。



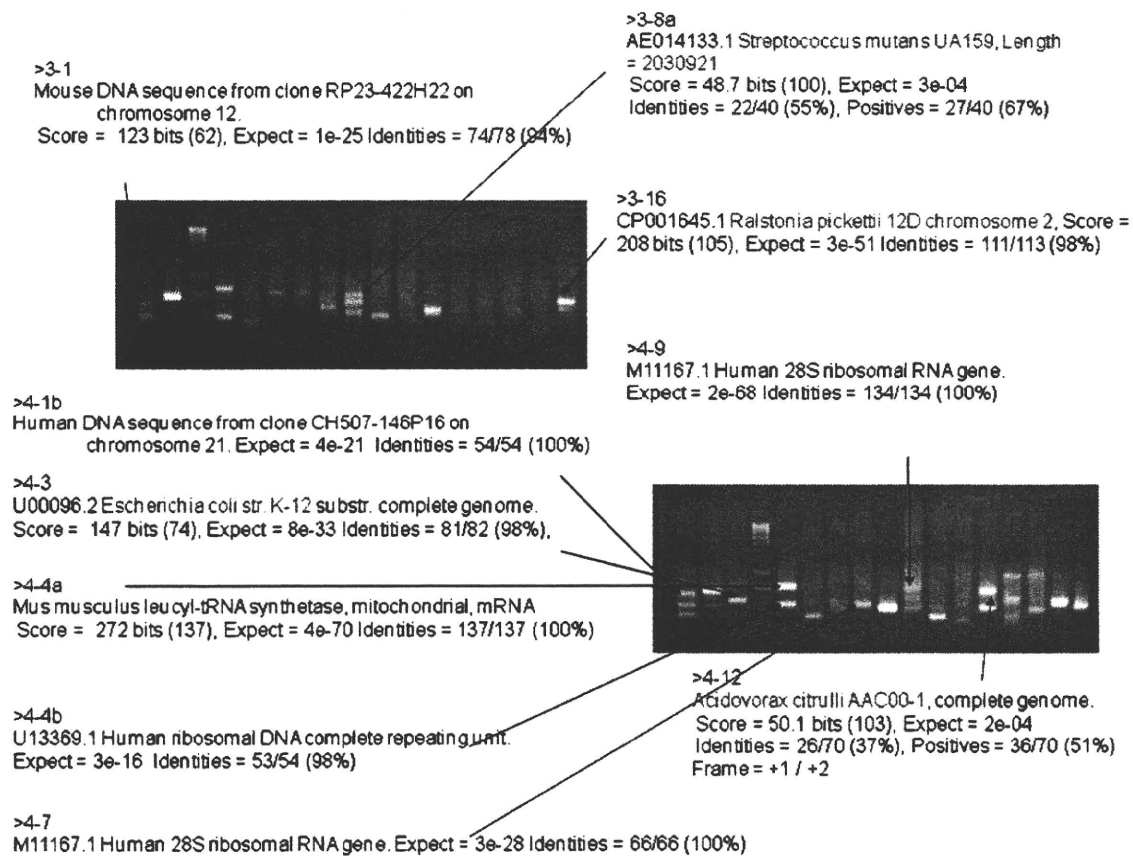


図 5. 検体番号 8 を用いた RDV 法解析例

RDV 法の最終 PCR 産物の電気泳動像と、ダイレクトシーケンスの結果得られた遺伝子配列について GenBank の Blast 検索をおこなった。

パラインフルエンザウイルス 3 型感染ヒト肺線維芽細胞によって産生が誘導されるサイトカインと  
シグナル伝達経路との相互関係に関する研究

研究代表者 木村博一 国立感染症研究所感染症情報センター  
研究協力者 吉住正和 塚越博之 小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所  
岡山吉道 日本大学大学院  
野田雅博 国立感染症研究所

### 研究要旨

幼少期における呼吸器ウイルス感染は、喘息の発症と増悪に密接に関連していることが強く示唆されている。また、呼吸器に存在する線維芽細胞は、喘息患者に生じる気道リモデリングに重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、パラインフルエンザ 3 型(HPIV3)感染ヒト肺線維芽細胞(MRC-5 細胞)が産生するサイトカインのプロファイリングを行うとともにサイトカイン産生に重要なシグナル伝達機構解明を目的とした研究を行った。その結果、HPIV3 感染 MRC-5 細胞は、種々の炎症性サイトカインや気道リモデリングに関連するサイトカインを多量に産生することが明らかになった。また、このサイトカイン産生には I $\kappa$ B キナーゼと p38MAPK のリン酸化が密接に関与することも明らかになった。以上のことから、HPIV3 の感染によって引き起こされる大量のサイトカイン産生は、過剰な炎症を惹起するだけでなく、気道過敏性の亢進および気道リモデリングの増悪機構に関与することが示唆された。

### A. 研究目的

呼吸器ウイルスは、単にかぜ様症候群を引き起こすだけでなく、ある一定の割合で気管支炎や肺炎などの重症呼吸器感染症を引き起こすことがよく知られている (1)。本邦において、重症呼吸器感染症による年間死亡者数は推定で 10 万人を超えており、少なからず呼吸器ウイルスの関与が推定されているが、その実態は不明である。また、2000 年以降、新型インフルエンザ A(H1N1)pdm や重症急性呼吸器症候群(SARS)ウイルスが出現し、重症呼吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。特に、乳幼児においては、RS ウイルス(RSV)やヒトメタニューモウイルス(HMPV)感染による呼吸器感染症は重症化しやすい傾向がある (2, 3)。

幼少期におけるこれらの呼吸器ウイルス感染は、喘鳴の発症や増悪の病態に関与しており、さらに喘息の発症・増悪(virus-induced asthma)の誘導に深く関与することが報告されている (4, 5)。この病態には、ウイルス感染によって、感染細胞から産生が誘導されるさまざまなサイトカインが深く関与することも示唆されている (6, 7)。また、これらのサイトカイン産生と気道リモデリングには、肺組織に多く含まれる線維芽細胞が深く関与していることが推察される (8)。そこで、本研究においては、HPIV3 感染肺線維芽細胞によって惹起されるサイトカイン解析ならびにサイトカイン産生に関与するシグナル伝達機構解明を目的とした以下の内容の研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス

ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型(C243)を Vero E6 細胞にて培養・増殖した後、ショ糖密度勾配法を用いて回収したウイルス液を試料として用いた。

### 2. 細胞

ヒト胎児線維芽細胞 (MRC-5, ATCC; CCL-75)を、常法により培養した後、マイクロプレートに播種した。

### 3. サイトカインおよびリン酸化シグナルタンパクの測定

MRC-5 細胞に 0.1 または 1 MOI の HPIV を感染後、6, 24, および 48 時間後の細胞上清を採取し、これらの試料中に含まれる 27 種類のサイトカイン解析を行った。さらに、この HPIV 感染細胞から産生されたサイトカインとシグナルタンパク産生との関連性について検討するため、HPIV 感染 MRC-5 細胞のリン酸化シグナル関連タンパク質について解析も行った。

## C. 研究結果

感染 24 時間後では、炎症性サイトカインの IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、抗炎症性サイトカインの IL-1ra、Th1 サイトカインの IFN- $\gamma$  および IL-2、Th2 サイトカインの IL-4、IL-5 および IL-10、造血因子の G-CSF および GM-CSF、好中球遊走サイトカインの IL-8 および IP-10、好酸球遊走サイトカインの eotaxin、および RANTES 等、多くのサイトカインが有意に産生された(図 1)。また、PIV 感染により、IkB、および p38 MAPK のリン酸化が有意に増強したが、Akt のリン酸化は増強しなかった(図 2)。さらに、IkB、および p38MAPK のシグナル伝達経路とサイトカイン産生との関係について、それぞれの特異的阻害剤(BMS-345541、および SB203580)を用いて調べたところ、HPIV によって誘導された多くのサイトカインの産生が明らかに阻害された(図 1)。

## D. 考察

本研究により、HPIV3 感染によって、ヒト線維芽細胞が IkB、および p38 MAPK のシグナル経路を介して多くのサイトカインを産生・放出することが明らかになった。これらの多量のサイトカイン産生とサイトカインバランスの不均衡が、部分的にはあるが喘息の病態生理や気道リモデリングに関与していることが示唆された。

また、今回の結果から、HPIV3 は、肺の気道上皮細胞のみならず線維芽細胞にも感染し、種々のサイトカイン産生を亢進することも明らかになった。このことは、HPIV3 感染によって生ずる重症化、特にサイトカインストームへの関与も示唆する。さらに、これらのシグナル伝達経路として IkB および p38 MAPK のリン酸化が特異的に関与していることも推察された。結論として、HPIV3 感染による肺線維芽細胞の炎症性サイトカインを中心としたサイトカインの異常産生による生体反応機構は、単に呼吸器感染症として、急性の気道炎症を惹起するだけでなく、喘息の発症や増悪および気道リモデリング等の重要な機構になっていると考えられる。

## E. 結論

本研究により、HPIV3 感染によりヒト肺線維芽細胞から、種々のサイトカイン産生が誘導されることが明らかになった。この産生機構には、IkB キナーゼおよび p38MAPK のリン酸化が重要であることが判明した。また、産生された多量のサイトカインが種々の病態、サイトカインストーム、喘息の発症増悪および気道リモデリングに関与することも推察された。

## F. 参考文献

1. Johnston, S. L. Overview of virus-induced airway disease. Proc. Am. Thorac. Soc. 2004; 2: 150-156.

2. Stein, R. T., Sherrill, D., Morgan, W. J., Holberg, C. J., Halonen, M., Taussig, L. M., Wright, A. L., and Martinez, F. D. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354: 541–545.
3. Hermos CR, Vargas SO, McAdam AJ. Human metapneumovirus. *Clin Lab Med.* 2010; 30:131-48.
4. Kotaniemi-Syrjänen, A., Vainionpää, R., Reijonen, T. M., Waris, M., Korhonen, K., and Korppi, M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111:66–71.
5. Martinez, F. D. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2003; 22: S76–S82.
6. Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 3546–3556.
7. Barrett, N. A., and Austen, K. F. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*; 2009; 31: 425–437.
8. Puxeddu, I., Bader, R., Piliponsky, A. M., Reich, R., Levi-Schaffer, F., and Berkman, N. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117: 103–110.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M.

Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front in Virol* in press.

- 2) Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int.* in press.

- 3) Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Sep;63(5):378-80.

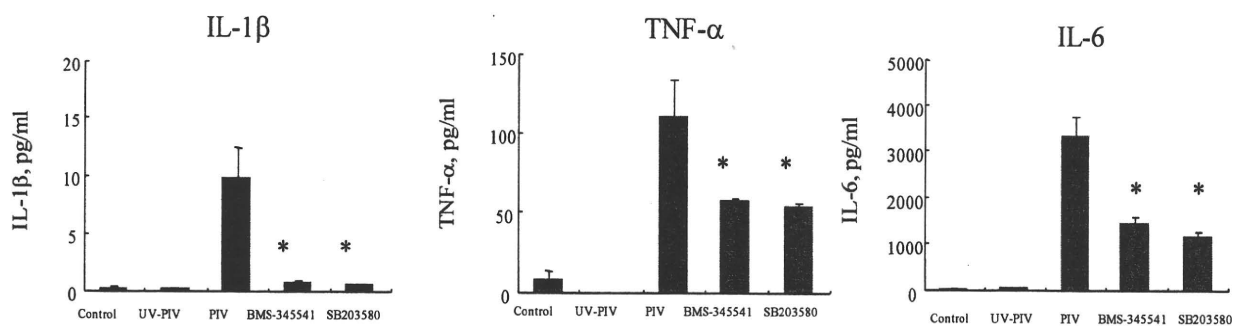
- 4) Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Seto J, Mizuta K, Ahiko T, Tsukagoshi H, Nagano M, Noda M, Mizutani T, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis.* in press.

- 5) Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol.* in press.

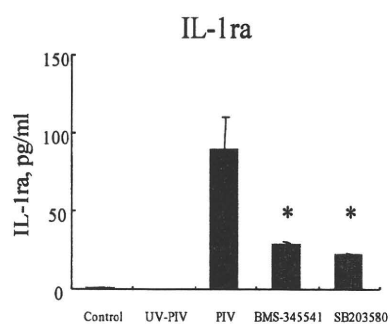
## H. 知的財産の出願・登録状況

なし

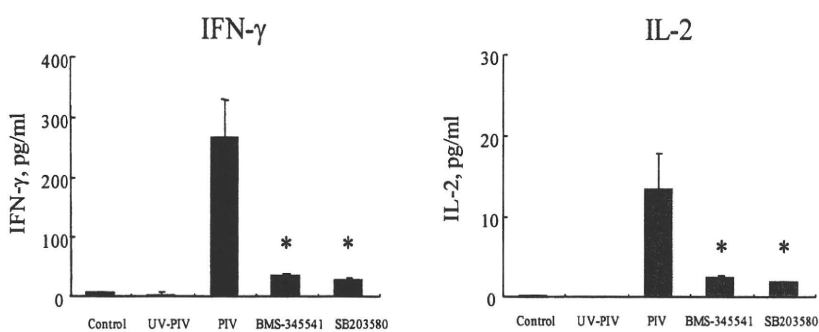
## Proinflammatory cytokines



## Anti-inflammatory cytokine



## Th1 cytokines



## Th2 cytokines

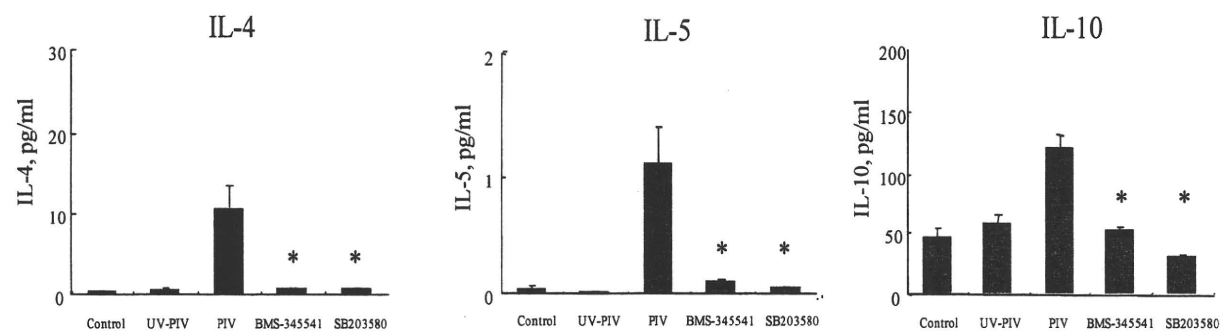
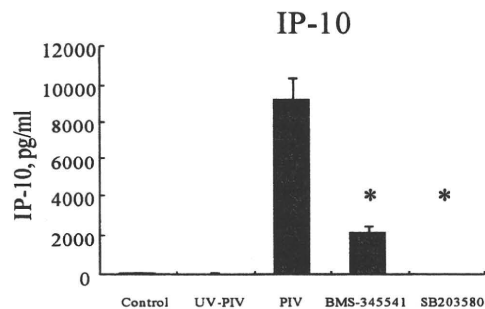
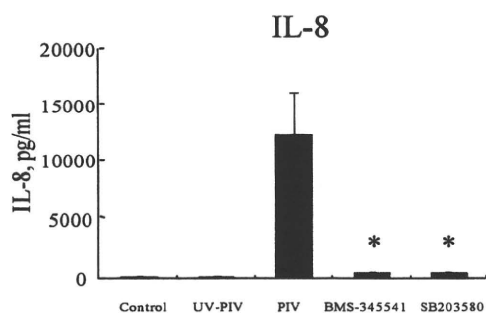
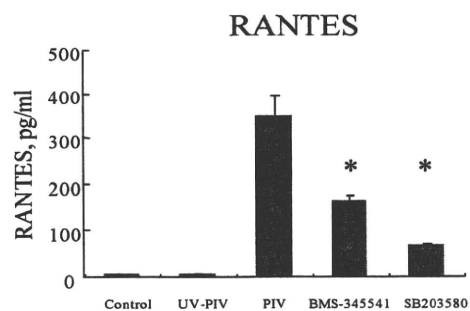
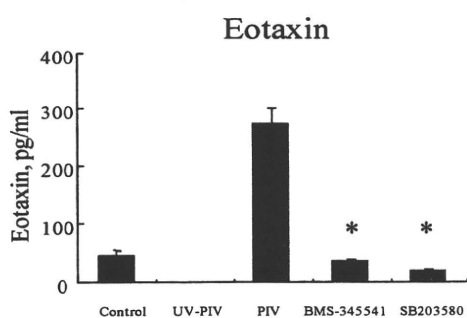


図1 パラインフルエンザウイルス感染肺線維芽細胞からのサイトカイン産生

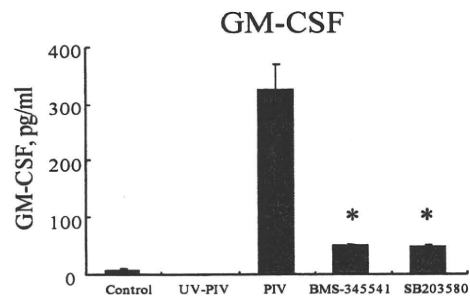
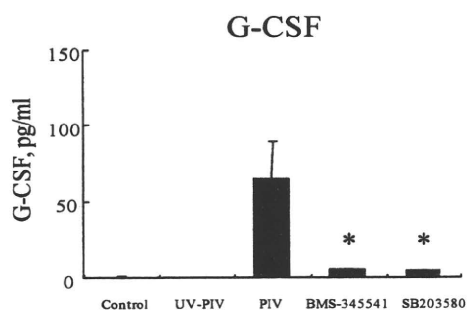
## Neutrophil recruitment-inducing cytokines



## Eosinophil recruitment-inducing cytokines



## Granulopoiesis-inducing cytokines



## Tissue remodeling-related cytokines

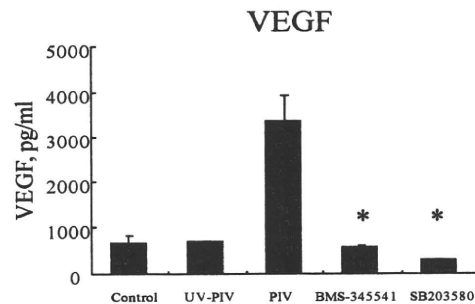
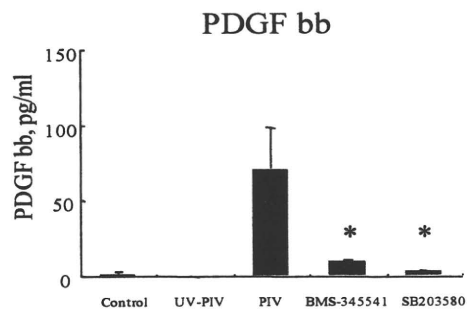


図1 パラインフルエンザウイルス感染肺線維芽細胞からのサイトカイン産生 (続き)

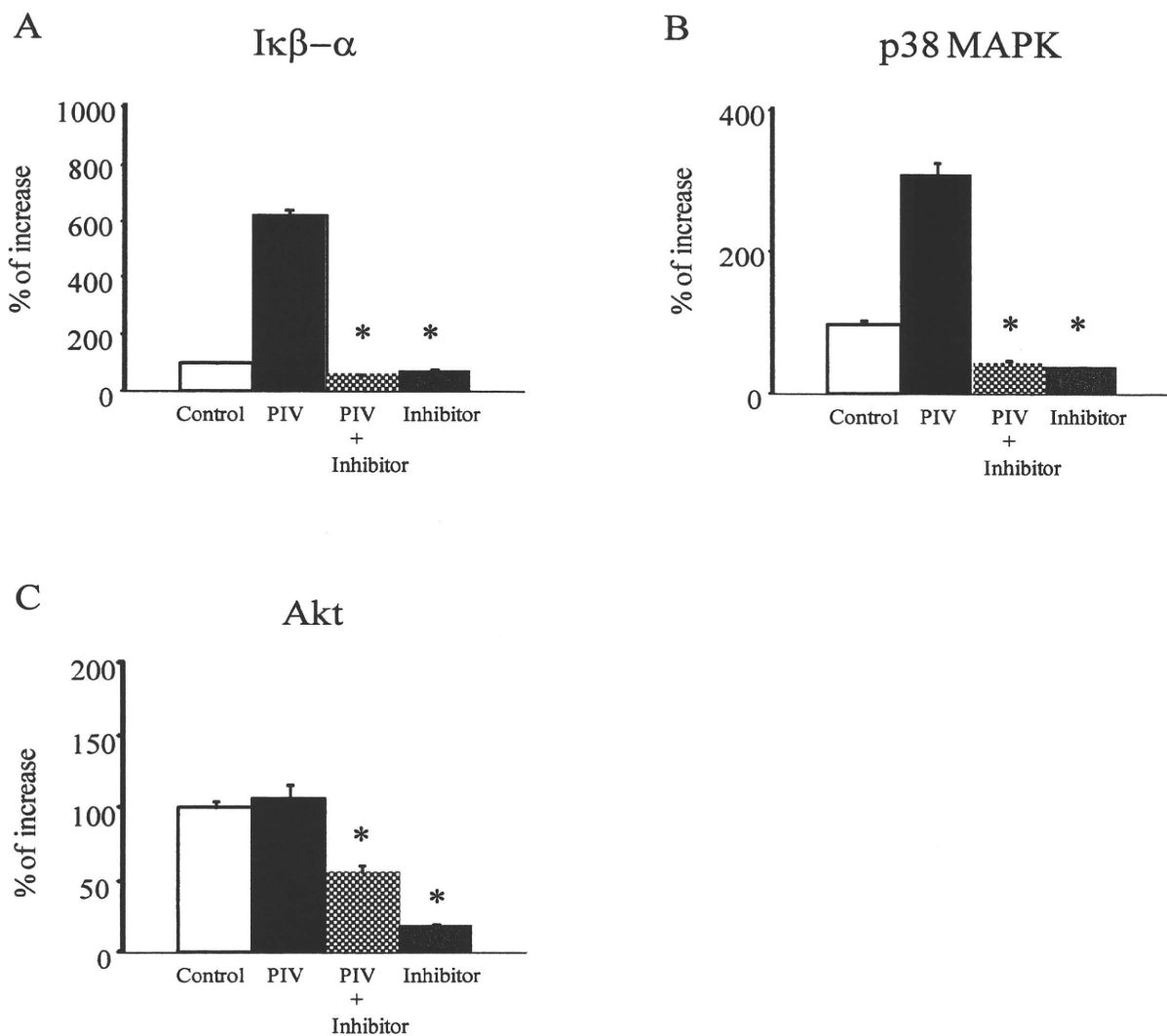


図2 パラインフルエンザウイルス感染肺線維芽細胞からのリン酸化シグナルタンパク産生

呼吸器感染ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究

研究分担者	竹田 誠	国立感染症研究所ウイルス第三部
研究協力者	水田克巳	山形県衛生研究所
	野田雅博	国立感染症研究所ウイルス第三部
	酒井宏治	国立感染症研究所ウイルス第三部
	白戸憲也	国立感染症研究所ウイルス第三部
	加納和彦	国立感染症研究所感染症情報センター
	加藤 篤	国立感染症研究所ウイルス第三部
	松山州徳	国立感染症研究所ウイルス第三部
研究代表者	木村博一	国立感染症研究所感染症情報センター

### 研究要旨

多くの呼吸器感染症ウイルスがその増殖のために宿主のタンパク分解酵素（プロテアーゼ）を利用して、ウイルスの膜融合タンパクが、プロテアーゼによって開裂を受けることによって、はじめて膜融合活性を発揮することができるためである。本研究では、ヒトパラインフルエンザウイルス1型、2型、3型について解析を行った。従来から、ヒトパラインフルエンザウイルス2型、3型には、細胞のゴルジ装置に普遍的に発現しているプロテアーゼ Furin を利用できる株があることが知られてきた。Furin を利用できる株を培養細胞で増殖させる場合には、培養液にトリプシンを添加する必要が無い。われわれは、ヒトパラインフルエンザウイルス1型にもトリプシンを必要としない株（hPIV1-09-2130 株）があることを見出した。しかしながら、hPIV1-2130 株の膜融合タンパク質（F タンパク質）は、Furin による開裂モチーフを有しておらず、Furin を用いない未知の機構によって、トリプシン非依存的に増殖すると予想された。さらに、本研究では、ヒトパラインフルエンザウイルス1型、2型、3型が、肺に発現している膜貫通型プロテアーゼ TMPRSS2 を利用して増殖することを明らかにした。これらの知見は、ヒトパラインフルエンザウイルス1型、2型、3型による肺炎発症の病態解明につながると考えられる。

### A. 目的

肺炎などの下気道感染症を起こすウイルスは、多数知られている。代表的なものは、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス（1型、2型、3型、4型）、SARS（重症呼吸器症候群）コロナウイルス、インフルエンザウイルスなどである。多くの呼吸器感染症ウイルスにおいては、そ

の増殖のために宿主のタンパク分解酵素（プロテアーゼ）が必要であり、そのようなプロテアーゼの発現が、気道上皮に限局していることが、それら呼吸器感染症ウイルスが肺や気道などで増殖する主な理由のひとつと考えられている。ウイルスの増殖にプロテアーゼが必要である理由は、ウイルスの膜融合タンパクが、プロテアーゼによって開裂を受けること



によって、はじめて膜融合活性を発揮することができるからである。しかしながら、そのような働きを持つ宿主のプロテアーゼが、実際に何であるのかは、最近になるまで、不明であった。2004年に Garten らが (International Congress Series 1263:218-221)、ならびに2006年に Bottcher らが (J Virol 80:9896-8)、季節性インフルエンザウイルスの膜融合タンパク質 (HA タンパク質) を開裂する宿主プロテアーゼが、肺に発現している膜貫通型プロテアーゼ TMPRSS2 であることを発見した。2008年にわれわれは、ヒトメタニューモウイルスの膜融合タンパク質 (F タンパク質) もまた、TMPRSS2 で活性化 (開裂) されること

(Shirogane et al. J Virol 82:8942-6)、さらに2009年に、スペイン風邪インフルエンザウイルスの HA タンパク質が、TMPRSS2 ならびに TMPRSS4 で活性化されることを明らかにした (Chaipan et al. J Virol 83:3200-11)。本研究班の活動を通じて、SARS コロナウイルスもまた、TMPRSS2 を利用して増殖することを松山らが証明している (Matsuyama et al. J Virol 2010. 84:12658-642010)。

本研究では、パラインフルエンザウイルス (1型、2型、3型) の膜融合タンパク質 (F タンパク質) を活性化するプロテアーゼを明らかにするとともに、パラインフルエンザウイルス (1型、2型、3型) の増殖機構を明らかにすることを目的とした。

## B. 方法

【ウイルス株と細胞】山形県にて水田克巳らが山形衛生研究所にて2008年、ならびに2009年に分離したパラインフルエンザウイルス1型2株 (09-2130株、09-2272株)、パラインフルエンザウイルス2型2株 (08-1869株、09-2331株) ならびにパラインフルエンザウイルス3型

2株 (09-1547株、09-1835株) を用いた。加えて緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現組換えマウスパラインフルエンザウイルス1型 (センダイウイルス) (SeV-GFP) を用いた。細胞は、Vero細胞、ならびに TMPRSS2 を恒常的に発現した Vero細胞 (Vero/TMPRSS2) を用いた。

【ウイルス増殖、プラーク形成】Vero細胞、あるいは Vero/TMPRSS2細胞に各ウイルスを低 MOI (~0.01) で感染させ、トリプシン未添加の培養液で培養し、経時的に細胞変成効果を観察した。SeV-GFP については、感染細胞の広がり GFP の蛍光を指標に蛍光顕微鏡にて観察した。Vero細胞、あるいは Vero/TMPRSS2細胞に段階希釈した各ウイルス液を感染させ、トリプシン未添加のメチルセルロース含有培養液にて培養し、プラーク形成の有無について解析した。

【塩基配列解析】パラインフルエンザウイルス1型2株 (09-2130株、09-2272株) の全ゲノム塩基配列を解析し、両者の配列の違いを明らかにした。Ka/Ks 値解析を行い、アミノ酸置換の集積するタンパク質ならびにその領域について明らかにした。

【構造モデルの作成】すでに X線結晶構造解析が行われ構造が明らかになっている類縁ウイルスの F タンパク質、HN タンパク質のデータを用いて、パラインフルエンザウイルス1型2株 (09-2130株、09-2272株) の F タンパク質、HN タンパク質の構造モデルを作成するとともに、その2株間で見られたアミノ酸置換の位置を、立体構造モデル上に示した。

【組換えウイルスの作成】米国 NIH/NIAID、Schmidt Alexander 博士らと MTA を取り交わし、彼らの樹立した GFP 発現ヒトパラインフルエンザウイルス1型の組換えウイルス作製系を利用する。

### C. 結果

【ウイルス増殖、プラーク形成】パラインフルエンザウイルス1型09-2130株、パラインフルエンザウイルス2型08-1869株、ならびにパラインフルエンザウイルス3型09-1547株は、Vero細胞でトリプシン非依存的に多段階増殖し、Vero細胞に多核巨細胞形成を伴う強い細胞変成を引き起こした(表1)。一方、パラインフルエンザウイルス1型09-2272株、パラインフルエンザウイルス2型09-2331株、パラインフルエンザウイルス3型09-1835株、ならびにSeV-GFPは、Vero細胞で(トリプシンの添加なしでは)多段階増殖せず、Vero細胞に明らかな細胞変成を引き起こさなかった(表1)。Vero細胞の場合とは異なり、Vero/TMPRSS2細胞を用いた場合には、全てのウイルス株が、多段階増殖し、Vero/TMPRSS2細胞に強い細胞変成を引き起こした(表1、図1)。Vero/TMPRSS2細胞では、全ての株が多段階増殖し、強い細胞変成を引き起こしたが、パラインフルエンザウイルス1型09-2272株、パラインフルエンザウイルス3型09-1835株、およびSeV-GFP感染性細胞においては、多核巨細胞形成は、見られなかった(表1)。全てのウイルス株が、Vero/TMPRSS2細胞でプラークを形成したが、パラインフルエンザウイルス1型09-2272株、パラインフルエンザウイルス2型09-2331株、パラインフルエンザウイルス3型09-1835株、ならびにSeV-GFPは、Vero細胞ではプラークを形成しなかった(図2)。

【塩基配列解析】パラインフルエンザウイルス1型2株(09-2130株、09-2272株)間において、Fタンパク質の開裂部位にアミノ酸配列の違いはみられなかった(ともに塩基性アミノ酸は1つしかなく、すなわちFurin認識モチーフを有していなかった)(表2)。パラインフルエンザウイルス1型2株(09-2130株、09-2272株)

のKa/Ks値の解析結果から、HN、P、Cタンパク質にアミノ酸が特に集積していることが明らかになった(表3)。一方、Mタンパク質のアミノ酸配列は同一であった。また、N、F、Lタンパク質のアミノ酸配列も非常に良く保存されていた(表3)。パラインフルエンザウイルス1型2株(09-2130株、09-2272株)間において、Fタンパク質には、7個のアミノ酸置換が、HNタンパク質には24個のアミノ酸置換が見られた(表4、表5)。

【構造モデルによる解析】パラインフルエンザウイルス1型2株(09-2130株、09-2272株)のFタンパク質ならびにHNタンパク質の立体構造モデルを作製できた。2株間に見られたアミノ酸置換の場所を立体構造モデル上にマッピングすることができた(図3、図4)。

【組換えウイルスの作成】2010年6月にベルギーで開催されたマイナス鎖RNAウイルス会議に出席し、米国NIH/NIAID、Schmidt Alexander博士らと研究内容について今後の共同研究について協議した。MTAを取り交わし、GFP発現ヒトパラインフルエンザウイルス1型の組換えウイルス作製系の分与を頂くことが決まった。

### D. 考察

インフルエンザウイルス(季節性、スペイン風邪)、ヒトメタニューモウイルス、SARSコロナウイルスのみならず、ヒトパラインフルエンザウイルス1型、2型、3型、ならびにマウスパラインフルエンザウイルス1型(センダイウイルス)もまた、TMPRSS2を用いて多段階増殖できることが証明できた。今後、TMPRSS2が、これらのウイルスを活性化する主要なプロテアーゼであるかどうかを解析する計画である。TMPRSS2やトリプシン無しでも、多段階増殖できるヒトパラインフルエン

ザウイルス1型が存在することが明らかになった。Fタンパク質の開裂部位を見る限り、Furinでも開裂しないと予想できる。呼吸器感染症パラミクソウイルス活性化の新しいメカニズムの解明につながるかもしれない。今後、Fタンパク質やHNタンパク質の構造モデル解析の結果、また、タンパク質の発現実験、組換えウイルスを利用した実験などを通じて、その機構を明らかにする計画である。

#### **E. 結論**

(1) ヒトパラインフルエンザウイルス1型、2型、3型、ならびにマウスパラインフルエンザウイルス1型(センダイウイルス)が、TMPRSS2を用いて多段階増殖できることが証明できた。(2) TMPRSS2やトリプシン無しでも、多段階増殖できるヒトパラインフルエンザウイルス1型が存在することが明らかになった。これらの結果は、ヒトパラインフルエンザウイルスによる肺炎発症機構の解明、将来的な抗ウイルス剤開発につながる重要な知見であると考えられる。

#### **F. 健康危機情報**

なし

#### **G. 研究発表**

なし

表1 Vero 細胞ならびに Vero/TMPRSS2 細胞での増殖性や細胞変成効果の比較

virus	strain	Vero			Vero TMPRSS2		
		Multiple growth	CPE	Syncitium-formation	Multiple growth	CPE	Syncitium-formation
hPIV1	09-2130	++	++	+	++	++	++
	09-2272	(±)	(±)	(-)	++	++	(-)
hPIV2	08-1869	++	++	++	++	++	++
	09-2331	(±)	(±)	(-)	++	++	++
hPIV3	09-1547	++	++	++	++	++	++
	09-1835	(±)	(±)	(-)	++	++	(-)
SeV	SeV-GFP	(±)	(±)	(-)	++	++	(-)

表2 09-2130 株、09-2272 株の F タンパク質開裂部直前のアミノ酸配列の比較

Virus	Six amino acids immediately preceding the cleavage site (downward arrow)						
hPIV1 09-2130	Asp	Asn	Pro	Gln	Thr	Arg	↓
hPIV1 09-2272	Asp	Asn	Pro	Gln	Thr	Arg	↓

表3 09-2130 株、09-2272 株の各ウイルスタンパク質読み枠の Ka/Ks 値

	Ka	Ks	Ka/Ks
N	0.0017	0.0876	0.0189
P	0.0213	0.0879	0.2429
C	0.0117	0.0727	0.1606
M	0	0.0968	0
F	0.0056	0.0875	0.0634
HN	0.0207	0.0873	0.2366
L	0.0029	0.087	0.0332