

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03475

研究課題名(和文) 気道上皮炎症によって決定されるインフルエンザウイルスの宿主域と病原性

研究課題名(英文) Host range restriction and pathogenicity of influenza virus determined by respiratory epithelial inflammation

研究代表者

川口 敦史 (Kawaguchi, Atsushi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90532060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスの感染病態を理解するには、気道上皮組織における感染初期の炎症応答と、マクロファージによって二次的に増幅された過剰な炎症応答を区別し、それぞれの分子機構を理解していく必要がある。気道上皮細胞からの炎症応答誘導を制御するセンサー分子としてMxAを同定し、MxAによって鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染が抑制され、MxAは宿主域の決定因子の一つであることを明らかにした。また、炎症応答によって細胞外に放出されたASCスペckルが細胞間伝播することで、非感染細胞でも過剰な炎症応答(サイトカインストーム)が誘導されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MxAは鳥インフルエンザに対して、季節性インフルエンザよりも強く炎症応答を誘導することが明らかになり、季節性インフルエンザはMxAに対する逃避変異を獲得していることでヒトでの感染能・伝播能を獲得することが示唆された。また、ASCスペckルの細胞間伝播を制御することで、感染症による急性炎症だけでなく、喘息など慢性炎症も制御できることが明らかになり、新たな創薬標的を同定することができた研究成果である。

研究成果の概要(英文)：To understand the pathogenesis of influenza virus infection, it is necessary to distinguish between the inflammatory response in the airway epithelial tissues in the early stages of infection and the excessive inflammatory response amplified secondarily by macrophages. We identified MxA as a sensor molecule that regulates the induction of inflammatory response from airway epithelial cells, and found that MxA suppressed human infection with avian influenza virus, suggesting that MxA is one of the molecular determinants of host range restriction for avian influenza virus. We also revealed that ASC speckles released extracellularly by the inflammatory response are transmitted cell-to-cell and induce an excessive inflammatory response (cytokinesis storm) even in uninfected cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：炎症応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

A 型インフルエンザウイルスは気道上皮細胞に初感染する。それに対し、気道上皮細胞は物理的なバリアとして機能するだけでなく、炎症性サイトカインを産生することでマクロファージや好中球を遊走させ、感染早期での生体防御を惹起する。一方、遊走したマクロファージから連鎖的に炎症性サイトカインが産生され(サイトカインストーム)、気管支炎や肺炎の誘導、および発熱といった全身性の症状につながり、病態は増悪する。よって、インフルエンザウイルスの感染病態を理解するには、気道上皮組織における感染初期の炎症応答と、マクロファージによって二次的に増幅された過剰な炎症応答を区別し、それぞれの分子機構を理解していく必要がある。このサイトカインカスケードの最上流に位置するのが IL-1 $\beta$  であり、その産生にはインフラマソーム複合体の活性化が必須である。インフラマソーム複合体は、NLRP3 に代表される病原体センサー分子とアダプター分子である ASC、およびプロテアーゼである Caspase-1 (Casp-1) から構成され、これらが複合体を形成することで、Casp-1 が自己活性化する。この活性化型 Casp-1 によって、IL-1 $\beta$  前駆体が切断され、成熟型 IL-1 $\beta$  が産生される。インフラマソームは直径が数  $\mu\text{m}$  の細胞内凝集体であり、核近傍の細胞質にスペckルが観察される。マクロファージでは、インフルエンザウイルス感染を認識するセンサー分子として NLRP3 が機能するが、気道上皮細胞では NLRP3 は発現していない。新型インフルエンザウイルスは、自然宿主であるカモから、中間宿主(ブタなど)を経てヒトへと適応することで出現する。その適応には、ウイルス粒子表面のヘマグルチニン(HA)やウイルスポリメラーゼなど、ウイルス遺伝子に適応変異が導入されることが必要である。一方、適応変異に加えて、宿主の生体防御応答からの逃避変異もヒトへの適応に必須であるが、その詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、インフラマソーム複合体に含まれる気道上皮細胞特異的な病原体センサー分子の同定と機能解析を進め、インフルエンザウイルス認識機構を明らかにする。特に、鳥インフルエンザが新型ウイルスとしてヒトでの感染性を獲得するには、生体防御応答からの逃避変異が必要であることが示唆されており、本研究では、気道上皮細胞特異的な炎症応答によって規定されるインフルエンザウイルスの宿主域決定基盤を明らかにする。また、活性化されたインフラマソーム複合体はプリオン様の凝集体を形成し、感染細胞から放出後、マクロファージに貪食されることで自己増殖し、非感染マクロファージでも炎症応答を引き起こす。本研究では、インフラマソームのプリオン様細胞間伝播機構についても解析を進め、病態悪化へと繋がる過剰な炎症応答を引き起こす分子基盤を明らかにし、インフルエンザウイルスの感染病態の解明に資する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 気道上皮細胞特異的なインフラマソームセンサー分子の同定

shRNA ライブラリーを複数のクローンずつにプールし、GFP-ASC を恒常発現した気道上皮細胞に導入することで、複数の遺伝子をランダムにノックダウンした細胞株を構築した。インフルエンザウイルスを感染させ、GFP-ASC のスペckル形成を指標にインフラマソームの形成量をハイコンテンツスクリーニングによって定量した。インフラマソーム形成が抑制されていた shRNA プールを、クローン数を減らして再度プールしていくことで、標的遺伝子をスクリーニングした。

#### (2) インフラマソームのプリオン様細胞間伝播機構の解析

GFP-ASC 発現細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、細胞外に放出された ASC スペックルを Percoll を用いた遠心分離により精製した。単球由来 THP-1 細胞に、ホルボールエステルを添加して 3 日間培養することでマクロファージ様細胞に分化させ、ASC スペックルの取り込み機構の解析を行った。

### ( 3 ) ASC スペックルを介した慢性炎症誘導機構の解析

ウイルス感染によって誘導された ASC スペックルが臓器内に蓄積することで、慢性炎症が誘導される可能性を評価するため、野生型マウスもしくは Arf6 マクロファージ cKO マウスに、オボアルブミン (OVA) もしくはコナヒョウダニ (House dust mite ; HDM) 抽出物を免疫した。6 週以上の免疫後、経鼻接種により OVA もしくは HDM 抽出物を気道に投与することで、喘息様症状を誘導した。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) 気道上皮細胞特異的なインフラマソームセンサー分子の同定

shRNA ライブラリーを用いた遺伝学的なスクリーニングにより、気道上皮細胞でのインフラマソーム形成に関与する遺伝子として、CTSL1、MOGS、PTPN7、Sertad2、及び MxA を同定した。特に、MxA をノックダウンすることで、気道上皮細胞特異的に強くインフラマソーム形成が抑制されたのに対し、マクロファージでは同様なインフラマソーム形成阻害は観察されなかった。MxA はダイナミン様 GTPase であり、インターフェロン応答性の生体防御に関与する遺伝子である。一方、近交系マウスでは、エキソンの欠失により MxA が発現していないため、広く感染実験に用いられる BALB/c や B6 マウス等では、NLRP3 依存的にマクロファージからのみ、IL-1 $\beta$  が産生される。そこで、ヒト MxA を導入したトランスジェニックマウス (hMxA-Tg) を用いて感染実験を行ったところ、感染早期に IL-1 $\beta$  が産生され、炎症応答による強い感染防御が誘導された。よって、MxA は *in vivo* でもウイルス感染依存的な炎症応答制御に関与することが示唆された。また、MxA は鳥インフルエンザに対して、季節性インフルエンザよりも強く IL-1 $\beta$  産生を誘導することが明らかになり、季節性インフルエンザは NP 遺伝子に MxA に対する逃避変異を獲得していることも示唆された。

### ( 2 ) インフラマソームのプリオン様細胞間伝播機構の解析

細胞外に放出された ASC スペックルは、近隣の貪食性の細胞に取り込まれることで非感染細胞でも炎症応答を誘導することができる。そこで、ASC スペックルをマクロファージに添加し、IL-1 $\beta$  産生量を評価したところ、顕著な炎症応答が誘導された。一方、同様な貪食細胞で炎症応答能をもつ好中球では、ASC スペックルによる IL-1 $\beta$  産生は観察されなかった。次に、アクチンフィラメント依存的な貪食能に関与する低分子量 GTPase である Arf6 をマクロファージ特異的にノックアウトしたところ、マクロファージへの ASC スペックルの取り込みが顕著に抑制され、ASC スペックルは貪食によってマクロファージに取り込まれることが明らかになった。特に、Arf6 マクロファージ cKO マウスでは、気道上皮細胞からの炎症応答は維持されるが、ASC スペックルの細胞間伝播による過剰な炎症応答 (サイトカインストーム) を抑制することができ、マウスの生存率は改善されることも明らかになった。

### ( 3 ) ASC スペックルを介した慢性炎症誘導機構の解析

Arf6 マクロファージ cKO マウスでは、ASC スペックルを介したサイトカインストームが抑制

されることから、喘息様炎症応答による慢性炎症モデルでも解析を行った。マクロファージ特異的な Arf6 の欠損により、IL-4、IL-5、IL-13 など Th2 応答が減弱し、喘息様症状が改善されていた。これらの結果より、Arf6 を抑制することで ASC スペックルの細胞間伝播を制御できることが明らかになり、Arf6 がサイトカインストーム特異的な炎症応答を制御するための創薬標的になることを示唆する研究成果である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Konno S, Kobayashi K, Senda M, Funai Y, Seki Y, Tamai I, Schukel L, Sakata K, Pillaiyar T, Taguchi A, Taniguchi A, Gutschow M, Muller CE, Takeuchi K, Hirohama M, Kawaguchi A, Kojima M, Senda T, Shirasaka Y, Kamitani W, Hayashi Y.	4. 巻 65
2. 論文標題 3CL Protease Inhibitors with an Electrophilic Arylketone Moiety as Anti-SARS-CoV-2 Agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 2926 ~ 2939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c00665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lee SangJoon, Ishitsuka Akari, Kuroki Takahiro, Lin Yu-Hsien, Shibuya Akira, Hongu Tsunaki, Funakoshi Yuji, Kanaho Yasunori, Nagata Kyosuke, Kawaguchi Atsushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Arf6 exacerbates allergic asthma through cell-to-cell transmission of ASC inflammasomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e139190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.139190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato Kohsuke, Kawaguchi Atsushi, Nagata Kyosuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Template activating factor-1 epigenetically regulates the TERT transcription in human cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97009-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Guo Youjia, Kawaguchi Atsushi, Takeshita Masaru, Sekiya Takeshi, Hirohama Mikako, Yamashita Akio, Siomi Haruhiko, Murano Kensaku	4. 巻 296
2. 論文標題 Potent mouse monoclonal antibodies that block SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100346 ~ 100346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SENBAS AKYAZ Burcak, PIRINCAL Aysegul, KAWAGUCHI Atsushi, NAGATA Kyosuke, TURAN Kadir	4. 巻 44
2. 論文標題 Interaction of influenza A virus NS2/NEP protein with the amino-terminal part of Nup214	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY	6. 最初と最後の頁 82~92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3906/biy-1909-49	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lee SangJoon, Ishitsuka Akari, Noguchi Masayuki, Hirohama Mikako, Fujiyasu Yuji, Petric Philipp P., Schwemmler Martin, Staeheli Peter, Nagata Kyosuke, Kawaguchi Atsushi	4. 巻 4
2. 論文標題 Influenza restriction factor MxA functions as inflammasome sensor in the respiratory epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.aau4643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川口敦史
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染に対するMxAインフラマソームによる気道上皮組織炎症応答
3. 学会等名 第34回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関屋健史, 甲斐平康, 山縣邦弘, 広浜美香子, 大川詩乃, 川口敦史
2. 発表標題 濃厚接触者を対象にしたSARS-CoV-2の感染性を決定するSNP変異の探索
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國本航平, 黒木崇央, 竹内恒, 川口敦史
2. 発表標題 脂質キナーゼPI5P4K依存的なインフルエンザウイルスとコロナウイルスの初期増殖機構
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大川詩乃, Mojica Aileen, 川口敦史
2. 発表標題 SARS-CoV-2感染における性差の化学遺伝学的な解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiro Kuroki, Kohsuke Kato, Kyosuke Nagata, Atsushi Kawaguchi
2. 発表標題 Influenza viral budzone formation in concert with vesicular transport of viral genome ensures functional integrity of virions for immune evasion
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口敦史
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染による気道上皮組織特異的な炎症応答
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口敦史
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染による気道上皮組織特異的な炎症応答
3. 学会等名 第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akari Ishitsuka, SangJoon Lee, Atsushi Kawaguchi
2. 発表標題 MxA confers antiviral activity against influenza virus infection via inflammasome complex formation
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Kuroki, Atsushi Kawaguchi
2. 発表標題 Identification of cellular factors for dynamics of Rab11a-positive endosomes regulated by influenza virus infection
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Sekiya, Mikako Hirohama, Atsushi Kawaguchi
2. 発表標題 Regulatory mechanism of respiratory epithelium-specific inflammatory response upon influenza virus infection by a novel NS1 binding protein
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 SangJoon Lee, Kyosuke Nagata, Atsushi Kawaguchi
2. 発表標題 MxA inflammasome restricts the host range of influenza A viruses in respiratory epithelium
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口敦史
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染に対するMxAインフラマソームによる気道上皮組織特異的な炎症応答機構
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関