

令和元年6月15日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05192

研究課題名(和文) 気道上皮細胞特異的なインフルエンザ感染に対する炎症応答

研究課題名(英文) Respiratory epithelium-specific inflammatory response against influenza virus infection

研究代表者

川口 敦史 (Kawaguchi, Atsushi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：90532060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：気道上皮組織は、ウイルス感染に反応して、最初に炎症性サイトカインを産生する組織である。サイトカイン反応の結果、感染部位にマクロファージや好中球が誘導されてウイルス感染細胞は除去される。本研究では、気道上皮細胞における炎症応答機構について解析し、気道上皮組織特異的なインフラマソーム受容体を同定した。また、ウイルスが炎症応答を回避するために、ウイルスによって利用される宿主因子についても同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気道上皮組織における炎症応答は感染初期の生体防御に必須であるのに対し、過剰な炎症応答が誘導されることで、発熱や肺炎症状を引き起こす。本研究ではインフルエンザウイルス感染による炎症応答の誘導機構を宿主側及びウイルス側から明らかにし、ウイルス感染による病態発現機構の一部を明らかにすることができた。本研究成果は、今後、インフルエンザ重症例における治療方法の新規開拓へと繋がっていくと期待される。

研究成果の概要(英文)：Respiratory epithelium functions as a first defender against infectious agents by separating the body from external environment and by initially producing inflammatory cytokines. As a result of the cytokine response, macrophages and neutrophils are migrated to the infected tissues to eliminate infectious agents. In this study, we analyzed the inflammatory response mechanism in respiratory epithelial cells and identified respiratory epithelium-specific inflammasome receptors. We also identified host factors that are utilized by influenza virus to evade the inflammatory response.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス 炎症応答 気道上皮組織 サイトカイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気道上皮は、ウイルス感染にตอบสนองして、最初に炎症性サイトカインを産生する組織である。サイトカイン応答の結果、感染部位にマクロファージや好中球が誘導されてウイルス感染細胞は除去される。一方、気道上皮細胞および誘導されたマクロファージから連鎖的に様々な炎症性サイトカインが産生され、気管支炎や肺炎の誘導、および発熱や食欲不振といった全身性の症状につながり、病態は増悪する。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 $\beta$ や TNF- $\alpha$ 等のサイトカインであり、気道上皮におけるその発現制御機構を理解することはインフルエンザウイルス感染の病態の理解には必須である。

### 2. 研究の目的

本研究では、気道上皮細胞における(1)インフラマソームを介した IL-1 $\beta$ の発現制御機構の解明、(2)ウイルスタンパク質 NS1 による炎症性サイトカイン mRNA の転写後制御機構の解明を通して、インフルエンザ感染症の病態の理解に資することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 気道上皮細胞でのインフラマソームを介した IL-1 $\beta$ の発現制御機構

プロテオミクス解析および shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを通して、上皮細胞特異的な新規パターン認識受容体を同定する。また、同定したパターン認識受容体の分子機構解析。認識する危険シグナル (DAMPs) を同定する。

#### (2) 気道上皮細胞での NS1 による炎症性サイトカインの転写後制御機構

気道上皮細胞特異的に NS1 に結合する宿主因子、Epithelium specific NS1 binding protein-1 ; ESNBP-1 による炎症性サイトカイン mRNA 量の制御機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 気道上皮細胞でのインフラマソームを介した IL-1 $\beta$ の発現制御機構

ASC 結合タンパク質のプロテオミクス解析と shRNA ライブラリーを用いたハイコンテントスクリーニング解析により、気道上皮細胞特異的な病原体センサー分子として、ダイナミン様 GTPase である Epithelial specific inflammasome receptor (ESIR) を同定した。

ESIR は I 型インターフェロン (IFN) にตอบสนองして発現するダイナミン様 GTPase であり、リング状のオリゴマーを形成することで、ASC をリクルートし、インフラマソーム複合体形成の足場として機能する。精製した組換えタンパク質を用いた生化学的な実験により、ESIR は ASC の PYD ドメインを認識して、直接結合することを明らかにした。

poly (I:C)処理により IFN 応答を惹起して ESIR を発現誘導後、ウイルスゲノムに結合する塩基性タンパク質である NP をトランスフェクションすることで、インフラマソームが活性化されることを見出し、ESIR は NP を認識することが示唆された。

近交系マウスでは、エキソンの欠失により、ESIR は発現していないため、B6 マウスなど、一般的に用いられる実験用マウスでは、IL-1 $\beta$ は NLRP3 依存的にマクロファージから産生される。そのため、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの骨髄を野生型の B6 マウスに移植すると、インフルエンザウイルスに感染しても IL-1 $\beta$ は産生されなかった。一方、申請者らが構築した ESIR<sup>Tg/Tg</sup> マウスをレシピエントにした場合、気道上皮細胞でインフラマソームが形成されるため、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスからの骨髄移植でも IL-1 $\beta$ は産生された。

#### (2) 気道上皮細胞での NS1 による炎症性サイトカインの転写後制御機構

ESNBP-1 は、核内に発現する RNA 結合タンパク質である。ESNBP-1 のノックダウン処理により、NS1 存在下でもウイルス感染依存的に TNF- $\alpha$ の産生が誘導される。そこで、ESNBP-1 に結合する宿主因子の探索を行ったところ、機能不明な DNA 結合タンパク質である LENG8 が同定された。LENG8 をノックダウンしたところ、ウイルス感染非依存的に TNF- $\alpha$ が産生されたことから、LENG8 は炎症性サイトカイン遺伝子の転写抑制に関与することが示唆された。通常、炎症性サイトカイン遺伝子の転写は、ヒストン修飾によって抑制され、刺激にตอบสนองして、転写因子やヒストンアセチル化酵素が活性化されることで、転写が誘導される。そこで、ヒストン H3 のリジン 9 番のメチル化レベルを測定したところ、LENG8 のノックダウンにより、顕著に低下することが明らかになった。よって、NS1 は ESNBP-1 と結合し、LENG8 を介して、抑制性のヒストン修飾を維持することで炎症性サイトカイン遺伝子の転写を抑制していると推測される。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 13 件)

1. Involvement of CTCF in transcription regulation of EGR1 at early G1 phase as an architecture factor. Sekiya T, Kato K, [Kawaguchi A](#), Nagata K. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 329. doi: 10.1038/s41598-018-36753-x
2. Influenza A Virus NS1 Protein Suppresses JNK1-Dependent Autophagosome Formation Mediated by Rab11a Recycling Endosomes. Kuroki T, Osari S, Nagata K, [Kawaguchi A](#). *Front Microbiol*. 2018; 9: 3120. doi: 10.3389/fmicb.2018.03120
3. Inhibition of Influenza Virus Infection by *Lentinus edodes* Mycelia Extract Through Its Direct Action and Immunopotentiating Activity. Kuroki T, Lee S, Hirohama M, Taku T, Kumakura M, Haruyama T, Nagata K, [Kawaguchi A](#). *Front Microbiol*. 2018; 9: 1164. doi: 10.3389/fmicb.2018.01164
4. Influenza A Virus Infection Triggers Pyroptosis and Apoptosis of Respiratory Epithelial Cells through the Type I Interferon Signaling Pathway in a Mutually Exclusive Manner. Lee S, Hirohama M, Noguchi M, Nagata K, [Kawaguchi A](#). *J Virol*. 2018; 92(14). pii: e00396-18. doi: 10.1128/JVI.00396-18
5. Biochemical characterization of avian influenza viral polymerase containing PA or PB2 subunit from human influenza A virus. Pham PTV, Turan K, Nagata K, [Kawaguchi A](#). *Microbes Infect*. 2018; 20(6): 353-359. doi: 10.1016/j.micinf.2018.04.003
6. Analysis by metadynamics simulation of binding pathway of influenza virus M2 channel blockers. Sakai Y, [Kawaguchi A](#), Nagata K, Hirokawa T. *Microbiol Immunol*. 2018; 62(1): 34-43. doi: 10.1111/1348-0421.12561
7. Assembly and remodeling of viral DNA and RNA replicons regulated by cellular molecular chaperones. Sekiya T, Hu Y, Kato K, Okuwaki M, [Kawaguchi A](#), Nagata K. *Biophys Rev*. 2018; 10(2): 445-452. doi: 10.1007/s12551-017-0333-z
8. Cellular splicing factor UAP56 stimulates trimeric NP formation for assembly of functional influenza viral ribonucleoprotein complexes. Hu Y, Gor V, Morikawa K, Nagata K, [Kawaguchi A](#). *Sci Rep*. 2017; 7(1): 14053. doi: 10.1038/s41598-017-13784-4
9. RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. Yoshizumi T, Imamura H, Taku T, Kuroki T, [Kawaguchi A](#), Ishikawa K, Nakada K, Koshiba T. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 5379. doi: 10.1038/s41598-017-05808-w
10. Mitotic phosphorylation of CCCTC-binding factor (CTCF) reduces its DNA binding activity. Sekiya T, Murano K, Kato K, [Kawaguchi A](#), Nagata K. *FEBS Open Bio*. 2017; 7(3): 397-404. doi: 10.1002/2211-5463.12189
11. Dynamics of the influenza virus genome regulated by cellular host factors. [Kawaguchi A](#). *Uirusu*. 2017; 67(1): 59-68. doi: 10.2222/jsv.67.59
12. Pre-mRNA Processing Factor Prp18 Is a Stimulatory Factor of Influenza Virus RNA Synthesis and Possesses Nucleoprotein Chaperone Activity. Minakuchi M, Sugiyama K, Kato Y, Naito T, Okuwaki M, [Kawaguchi A](#), Nagata K. *J Virol*. 2017; 91(3) pii: e01398-16. doi: 10.1128/JVI.01398-16
13. Polycomb repressive complex 2 facilitates the nuclear export of the influenza viral genome through the interaction with M1. Asaka MN, [Kawaguchi A](#), Sakai Y, Mori K, Nagata K. *Sci Rep*. 2016; 6: 33608. doi: 10.1038/srep33608

### [学会発表](計 26 件)

1. ウイルスポリメラーゼの動態構造から読み解く新型インフルエンザの Outbreak [川口敦史](#) 筑波大-KEK 連携セミナーシリーズ 第 5 回 2019 つくば (招待講演)
2. Respiratory epithelium-specific inflammasome restricts influenza A virus infection. [Kawaguchi A](#). Symposium on influenza and other infections 2019 東京 (招待講演)
3. Molecular mechanism of host responses against influenza virus infection. [Kawaguchi A](#). Infectious disease symposium 2019 Ho Chi Minh (ベトナム) (招待講演)
4. インフルエンザウイルス感染に対する気道上皮組織特異的な炎症応答機構 [川口敦史](#). 都医学研セミナー 2019 東京 (招待講演)
5. 多様なコンフォメーションの解析を可能にするクライオ電子顕微鏡解析 岩崎憲治, [川口敦史](#). 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 横浜
6. Influenza A virus infection induces apoptosis and pyroptosis in respiratory epithelial cells in a mutually exclusive manner. [Kawaguchi A](#). Asian-Pacific Centenary Spanish 1918-flu Symposium 2018 深圳 (中国) (招待講演)
7. Influenza virus NS1 protein inhibits selective autophagy induced by virus genome recognition. Kuroki T, Osari S, Nagata K, [Kawaguchi A](#). 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 京都
8. Influenza virus restriction factor MxA functions as inflammasome receptor in respiratory epithelium. Lee SJ, Nagata K, [Kawaguchi A](#). 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 京都

9. Inhibition of type I IFN production in avian influenza virus-infected macrophages. Kameyama K, Nagata K, Kawaguchi A. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 京都
10. インフルエンザウイルスの宿主域に關与する転写型ウイルスポリメラーゼの機能構造. 川口敦史. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 横浜 (招待講演)
11. Intracellular Localization of phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate is altered by influenza virus infection Nguyen DLV, Nagata K, Kawaguchi A. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017 大阪
12. Recycling endosome-mediated influenza virus genome transport is required for the assembly of stable viral particles. Kuroki T, Nagata K, Kawaguchi A. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017 大阪
13. クロマチン結合因子 CTCF による EGR1 遺伝子の G1 期初期における転写制御機構 関屋健史, 永田恭介, 川口敦史. 第 14 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 2017 湯河原
14. インフルエンザウイルスゲノムの小胞媒介性輸送機構はウイルス膜タンパク質のアセンブリを促進する 黒木崇央, 永田恭介, 川口敦史. 第 14 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 2017 湯河原
15. Novel role of ESIR inflammasome in respiratory epithelial cells during influenza A virus infection. Lee SJ, Kawaguchi A. 第 14 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 2017 湯河原
16. 小胞輸送系を介したインフルエンザウイルスゲノムの細胞内動態制御機構 川口敦史 東京大学医科学研究所共同研究拠点事業 平成 28 年度若手研究者シンポジウム 2017 東京 (招待講演)
17. 構造生物学的解析とそれに基づく創薬 川口敦史 TIA かけはしワークショップ 放射光利用における新分野開拓のための連携形成 2017 つくば (招待講演)
18. Biochemical and structural analysis of capping reaction of influenza viral polymerase. Kawaguchi A. The Sixth China-Japan Bilateral Symposium on All Influenza Viruses 2017 北京 (中国) (招待講演)
19. インフルエンザウイルス vRNP の輸送の方向性を決定する分子機構 原田芳美, 川口敦史. 第 13 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 2016 湯河原
20. CRM1 によるインフルエンザウイルスの核外輸送複合体の形成機構 山下俊, 川口敦史. 第 13 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 2016 湯河原
21. インフルエンザウイルスゲノム細胞内輸送と協調したウイルス粒子形成機構 黒木崇央, 川口敦史. 第 13 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 2016 湯河原
22. 小胞輸送系を介したインフルエンザウイルス子孫 vRNP 複合体の細胞内動態 川口敦史. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 横浜 (招待講演)
23. Viral budzone formation in concert with influenza virus genome transport using recycling endosomes. Kuroki T, Nagata K, Kawaguchi A. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 札幌
24. In situ detection of M1-NS2 complex formation essential for nuclear export of the influenza virus genome. Yamashita S, Asaka MN, Nagata K, Kawaguchi A. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 札幌
25. Influenza A virus infection induces caspase-1 dependent cell death with pro-inflammatory cytokines in human lung epithelial cells. Lee SJ, Nagata K, Kawaguchi A. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 札幌
26. Dynamics of the influenza virus genome regulated by cellular host factors. Kawaguchi A. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：

種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：夏目 徹

ローマ字氏名：Tohru Natsume

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：研究センター長

研究者番号（8桁）：00357683

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。