

論文の内容の要旨

論文題目 **Identification and functional analysis of lung-derived exosomal microRNAs upon influenza virus infection**

(インフルエンザウイルス感染における肺由来エクソソーム内 microRNA の同定と機能解析)

氏名 前村 忠

[背景と目的]

インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科に属するマイナス鎖の1本鎖RNAウイルスで、8本の分節化したRNAを自身のゲノムとして有する。ウイルス粒子表面上の蛋白質であるヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)によりウイルス亜型が決定され、これまでにH1N1からH18N11までのウイルスが報告されている。我々は今日まで、1918年のスペイン風邪(H1N1亜型)、1957年のアジア風邪(H2N2亜型)、1968年の香港風邪(H3N2亜型)、そして2009年の豚由来新型インフルエンザ(H1N1亜型)の計4回のパンデミックインフルエンザを経験した。これらパンデミックを引き起こすようなインフルエンザウイルスは季節性の流行を生じるインフルエンザウイルスとは抗原性が大きく異なるため、人類が免疫を獲得していない場合が多く、急速に世界中へと感染が拡大する。パンデミック後はこれらのウイルスは季節性のインフルエンザウイルスとなって季節性の流行を引き起こすようになる。国内だけでも年間1000万人もの季節性インフルエンザウイルスの感染者が存在する。これら季節性インフルエンザウイルスに加え、海外では高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1亜型、H7N9亜型)へのヒト感染例が報告されている。季節性インフルエンザウイルスと比較するとヒトからヒトへの空気感染は生じにくいものの、強い病原性を有しており、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスは50%程度の致死率を有する。このように、インフルエンザウイルスは人類の脅威となっているウイルスの一つであり、予防法や治療法についてより一層の対策が求められている。

インフルエンザウイルスが感染した細胞では、toll like receptors (TLRs) や Retinoic acid inducible gene (RIG)-I などの pattern recognition receptors (PRRs) を介してウイルスゲノムを認識し、抗ウイルス応答を生じる。RIG-I は、インフルエンザウイルスゲノムの2本鎖RNAの5'三リン酸を認識し、下流のアダプター蛋白質である Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) を介して IRF3 や NF- κ B などの転写因子を活性化し、I型インターフェロン(IFN)の産生を引き起こす。近年の研究で、microRNA に代表される宿主由来の non-coding RNA によるウイルス感染時の自然免疫応答の制御が報告されている。エクソソームは、様々な細胞から放出される直径40-100nm

の小胞で、内部に含まれる蛋白質や、mRNA、microRNA(miRNA)などの核酸を標的細胞に運ぶことで細胞間の情報伝達に参与する。これまでに様々なウイルス感染におけるエクソソームの役割について報告がある一方で、インフルエンザウイルス感染におけるエクソソームの機能は明らかになっていない。そこで、インフルエンザウイルスが感染した肺や細胞内において生じる宿主応答メカニズムの詳細な理解は非常に重要であることから、本研究ではインフルエンザウイルス感染時の宿主応答の新規メカニズムとして、エクソソーム内 miRNA の同定およびその機能解析を行うことを目的に研究を行った。

【材料と方法】

インフルエンザウイルス(A/Puerto Rico/8/34;PR8 株)感染マウスモデルを用いて、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のエクソソームをフィルター濾過法と超遠心法で分離・精製し、エクソソームのマーカー蛋白質である CD63 に対するウェスタンブロット法および免疫電子顕微鏡法を用いて BALF エクソソームの存在を確認した。続いて、miRNA マイクロアレイを用いて、感染マウスと非感染マウス間での BALF エクソソーム内 miRNA のプロファイルを網羅的に比較解析し、感染マウスの BALF エクソソーム内に豊富に存在した miRNA を同定した。続いて、2 本鎖 RNA である poly(I:C)をマウスに経鼻投与し、自然免疫応答を惹起した後に、BALF エクソソーム内の miRNA のプロファイルを同定した。次に感染マウスと poly(I:C)経鼻投与マウスの BALF エクソソーム内に共通してみられた miRNA に主に注目し、これら 24 種類の miRNA の抗ウイルス機能を検討した。マウス II 型肺胞上皮細胞由来株化細胞(MLE-12)に合成 miRNA を導入した後、インフルエンザウイルスを感染させ、IFN- β 遺伝子や炎症性サイトカイン遺伝子の発現レベルの変化を評価した。さらに miRNA 導入細胞を用いて、遺伝子発現マイクロアレイと miRNA 標的遺伝子予測データベースを使用し、miRNA の標的遺伝子の探索を行った。最後に血管内皮細胞由来株化細胞(MS1)と MLE-12 細胞を用いて、エクソソームを介した miRNA の細胞間伝達による miRNA の機能解析を行った。

【結果と考察】

免疫電子顕微鏡法により、インフルエンザウイルス感染時のBALF内にはエクソソームが存在していることが明らかとなった(図1)。さらに、インフルエンザウイルス感染後、経時的にエクソソームのマーカー蛋白質の発現が増加したことから、感染に対する宿主応答としてBALFへ放出されるエクソソームが増加したと考えられた。miRNAマイクロアレイの結果、インフルエンザウイルス感染後、経時的にエクソソーム内に豊富に存在するmiRNAの種類が増加することが明らかとなった。さらに、インフルエンザウイルス感染時とpoly(I:C)投与時のBALFエクソソームにおいて、共通のmiRNAが豊富に存在していたことから、インフルエンザウイルス感染時にBALFエクソソーム内に存在するmiRNAは、自然免疫応答に関与している可能性が示唆された。

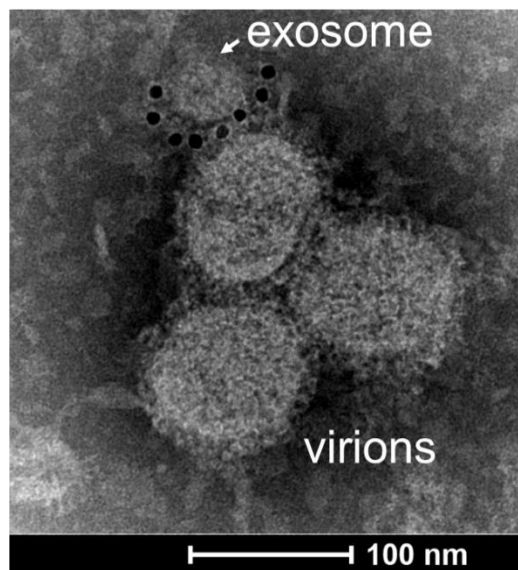


図1. インフルエンザウイルス感染マウスのBALFに金粒子でラベルされたエクソソームが確認された

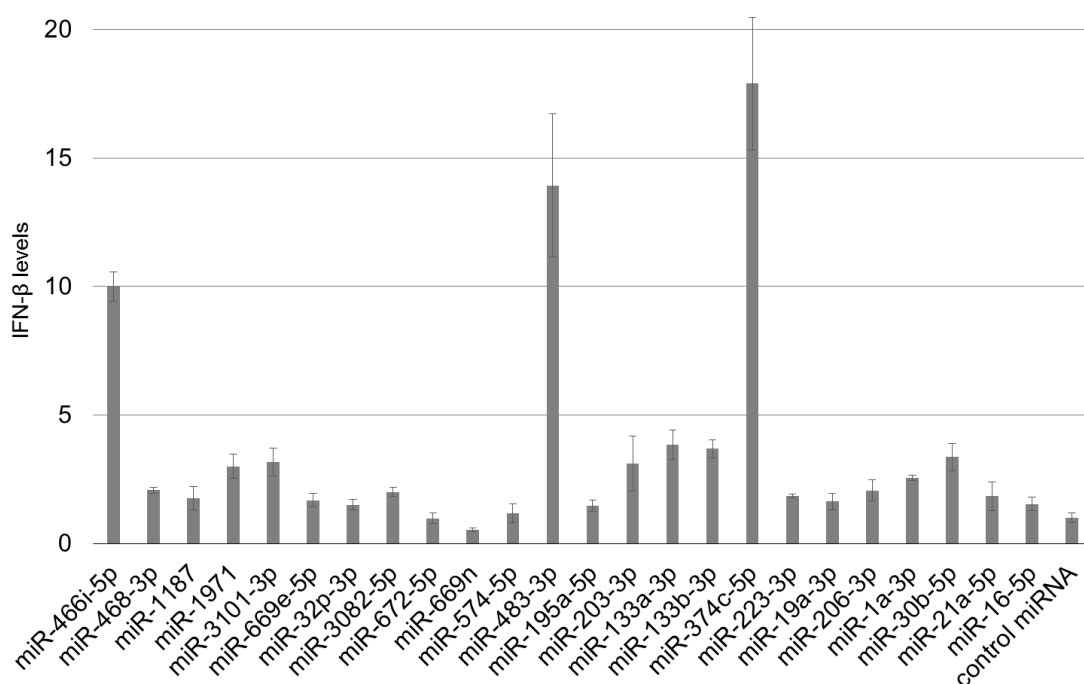


図2. miR-466i-5p, miR-483-3p, miR-374c-5p導入細胞ではIFN-β遺伝子発現が増加した

インフルエンザウイルス感染マウスと poly(I:C) 投与マウスの BALF エクソソーム内に共通して豊富に存在した miRNA を中心に選抜し、それらの機能解析を行った。MLE-12 細胞に miRNA を導入し PR8 株を感染させたところ、miR-466i-5p、miR-483-3p、miR-374c-5p を導入した細胞において感染初期の抗ウイルス応答に重要な因子である IFN- β や炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加した(図 2)。これら 3 種類の miRNA の中で、miR-483-3p を導入した MLE-12 細胞では、培養上清中の IFN- β が最も強く誘導された。

miR-483-3p による作用は MAVS 依存的であり、転写因子である IRF3 と NF- κ B の活性化を生じることで IFN- β や炎症性サイトカインの発現を正に制御している可能性が示唆された。遺伝子発現マイクロアレイの結果、miR-483-3p 導入細胞ではウイルス RNA の認識に重要な RIG-I シグナル経路を負に制御する因子である RNF5 遺伝子の発現が低下しており、かつ RNF5 遺伝子の 3' UTR には miR-483-3p と相補的な配列が存在した。配列特異的なルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、RNF5 は miR-483-3p の標的遺伝子であることが示唆された。さらに遺伝子発現マイクロアレイの結果から、IFN- β の発現への関与が予想された遺伝子を文献で検索後に選抜し、siRNA による機能的スクリーニングを行った結果、miR-483-3p の標的遺伝子候補の中で CD81 遺伝子の発現抑制が IFN- β の発現増加を引き起こすことが明らかとなった。RNF5 と同様に CD81 は miR-483-3p の直接の標的遺伝子となっていることが明らかになった。この結果から、miR-483-3p は RNF5 と CD81 の発現を同時に抑制することで、抗ウイルス応答に重要な IFN- β の発現を増加することが示唆された。

PR8 株に加えて、その他のインフルエンザウイルス株を感染させたマウスにおいても BALF エクソソーム内の miR-483-3p 量の増加は共通して認められたため、インフルエンザウイルス感染に対する宿主応答として保存されたメカニズムであると考えられた。さらに高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させたマウスでは、BALF だけでなく血清中のエクソソームからも miR-483-3p が高度に検出された。miR-483-3p が血管内皮細胞における炎症の惹起に関与することを疑い、MS1 細胞における miR-483-3p の機能を検証した。その結果、エクソソームを介して伝達された miR-483-3p により、インフルエンザウイルスに感染した MS1 細胞での炎症性サイトカイン遺伝子発現の増加が生じることが明らかとなった。

本研究によって、インフルエンザウイルス感染時に肺から放出されるエクソソームに含まれる miRNA には I 型 IFN 産生を亢進する作用があることを初めて明らかにすることができた。以上の結果から、インフルエンザウイルスに感染した生体内ではエクソソームを介した種々の細胞間での抗ウイルス作用ネットワークの存在が示唆された。