

研究成果報告書

1. 研究課題名：RS ウィルスの重症化素因および新規治療薬候補の探索

2. 研究代表者氏名：宇田 和宏

3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

[背景と目的] Respiratory syncytial virus (呼吸器合胞体ウイルス: RSV) は、主に乳幼児で下気道感染症（気管支炎、細気管支炎、肺炎等）を引き起こす病原体である。免疫系が未発達な乳幼児や基礎疾患有する高齢者において、重症化リスクが高い。RSV 感染症の臨床像の興味深い点として、同じ基礎疾患のない年代の乳幼児であっても、上気道炎程度で自然軽快する軽症例と、細気管支炎や肺炎となり入院を要する重症例がある点である。同一ウイルス株であってもこのような現象が確認されることから、これまでにホスト側の要因について検討がなされ、いくつかの遺伝子多型との関連が報告されているが、依然として未知の重症化機序の存在が懸念されている。本研究では実験系を用いて RSV の重症化素因を探査し、その機序を明らかにすることで RSV の重症化予防や新規の治療薬開発に繋げることを目的とした。

[方法]

本検討では、既報のゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study ; GWAS) により抽出された一塩基多型(SNPs)に注目し、各候補遺伝子の発現調整を行い、細胞モデルでの感染価の増減を評価した。RSV の細胞実験系は上皮系不死化細胞である HEp2 細胞を用いた。RSV (long 株) を MOI : 0.01 で 1.5 時間吸着し、48 時間後に細胞内および上清中の RSV の感染価を測定した。候補遺伝子の mRNA を siRNA で knockdown した状態で RSV の感染価の変化を定量 PCR 法およびプラーク法で評価した。

[結果]

既報の中から、肺での発現量が多い遺伝子 5 つをリストアップし、スクリーニング評価を行った。その結果、「遺伝子 C」を knockdown した細胞では、細胞上清中の感染価の有意な上昇を認めた。一方「遺伝子 A」を knockdown した細胞では、上清中の感染価および細胞内でのウイルスゲノムが有意に低下していた。

図 1：遺伝子 A-D を knockdown した状態での感染価 (A:プラーク法) 、N ゲノム発現量 (B:qPCR)

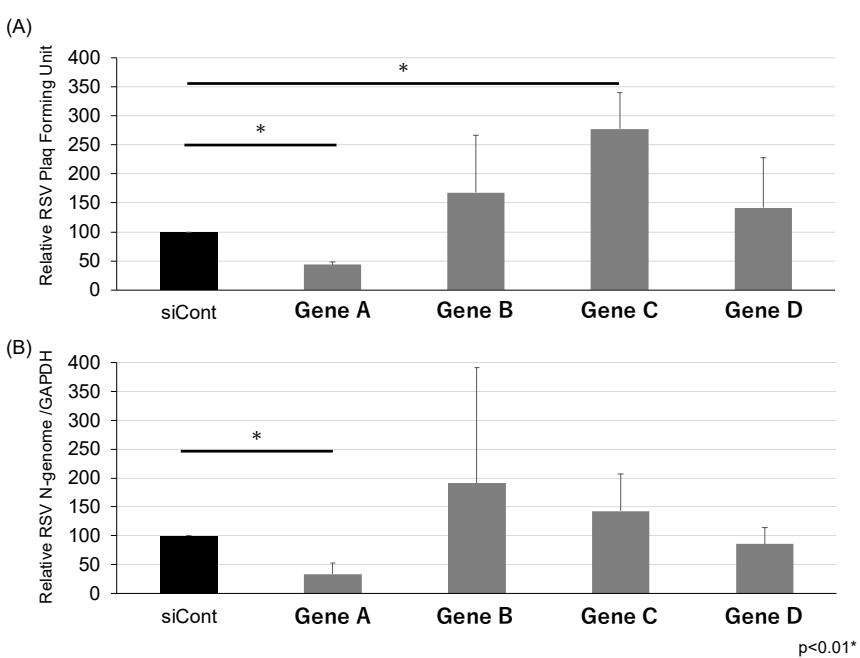
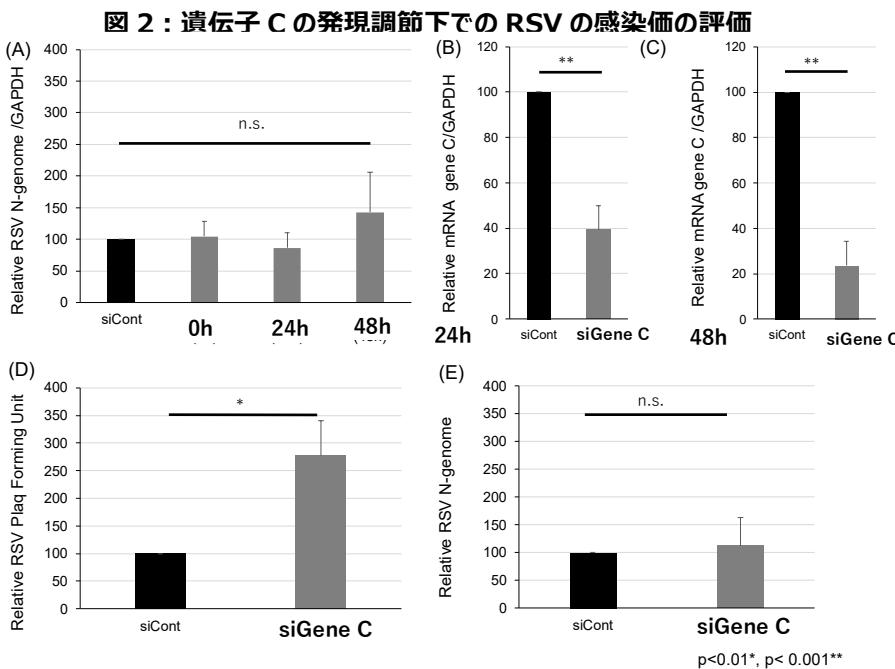


図1の結果をうけ、我々は遺伝子Cに注目した。HEp2細胞を用いて、遺伝子Cをknockdownした状態でRSVを吸着させ、0時間後、24時間後、48時間後で、細胞内のウイルスゲノム量を評価した（図2A）。なお、前提条件として遺伝子CのsiRNAを用いてknockdownした際のmRNAの発現量が低下していることを確認している（図2B、2C）。さらに上清中のRSVの感染価（ブラーク法）は上昇していることも明らかとなった。一方で上清中のRSVのNのゲノムの発現量（qPCR）では有意差を認めなかった（図2E）。



上記の実験結果からは、遺伝子Cは不完全なウイルス粒子の作成に関与し、knockdownで感染価が上昇することから、なんらかの防御因子として機能する可能性が示唆された。

次に、遺伝子Cによってコードされる「蛋白C」は細胞膜に存在しており、細胞膜上でRSウイルスの表面抗原であるF蛋白、G蛋白、SH蛋白のいずれかの相互作用を来たしているのではないかと考え、各々のプラスミドを作成し、共免疫沈降反応で評価し、蛋白CとRSVの表面抗原との結合を確認した。さらに、HEp2細胞での免疫染色により、両者の蛋白が細胞内でco-localizationしていることを確認している。

[今後の展望]

我々の実験データからは「蛋白C」は、RSVの表面抗原と結合することで、出芽のタイミングで不完全なウイルス粒子の形成に関与している可能性を考慮している。

今後は、非過剰発現下（内在性の蛋白C）での共免疫沈降反応で同様の結果が得られるか、を確認し、論文として投稿予定である。