

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 病態生化学研究室
職・氏名 助教・小池 敦資

研究テーマ：スタチンによるマクロファージ機能調節を介した抗ウイルス活性抑制機構の解析

研究期間：

2018 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日

研究目的：

スタチン系薬剤（スタチン）は、LDL-コレステロール低下作用を主作用にもち、脂質異常症治療薬として世界中で広く使用されている。また、スタチンは血管内皮機能改善作用や心筋保護作用、抗炎症作用、骨形成促進作用などを有することが報告され、これらの多面的な作用に関心が寄せられている。最近では、免疫抑制作用が注目されているが、その分子機構は不明な点も多い。さらに、スタチンの使用により、ウイルス抵抗性が低下するという報告もあり、スタチン系薬剤のもつ免疫抑制作用には問題点も多い。ウイルスの感染初期において、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫系の細胞は、エンドソーム内に局在する Toll 様受容体 3 (TLR3) を介してウイルスの構成成分を認識し、最終的に I 型インターフェロン (IFN- α , IFN- β) やケモカイン、ウイルス複製を抑制する viperin などを含む interferon-stimulated genes (ISGs) を産生することによって、抗ウイルス応答を誘導する。また実験レベルではウイルス 2 本鎖 RNA の模倣アナログである polyinosinic-polycytidylic acid [poly (I:C)] も同様の経路を介して抗ウイルス応答を誘導できることが知られている。本研究では、スタチンによるウイルス抵抗性抑制機構を明らかにすることを目的として、脂質異常マウスやマクロファージ系細胞株を用いて、poly (I:C) によって誘導される抗ウイルス応答に対するスタチンの影響について解析を行った。

研究内容および研究成果：

1. 脂質異常マウスにおける抗ウイルス応答に対するスタチンの影響

脂質異常症患者では、炎症状態が通常とは異なるという報告があるため、はじめに脂質異常を示すマウスを作製し、スタチンの影響を調べた。方法は、6 週齢の C57BL/6J マウスに高脂肪食を 8 週間与えた。次いで、スタチン系薬剤の 1 つであるシンバスタチンを 20 mg/kg の用量で 1 日 1 回、10 日間経口投与を行い、その後、シンバスタチンの投与最終日より 24 時間後に 30 μ g/body の用量で poly (I:C) を経鼻投与し、8 時間後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) および肺を採取した。抗ウイルス応答に関与する IFN- β や CCL5/RANTES, viperin などの遺伝子発現をリアルタイム PCR によって、IFN- β の産生量を ELISA によって調べた。その結果、高脂肪食を与えたマウスは低脂肪食群と比較して、血清中の遊離脂肪酸や LDL-コレステロール、総コレステロールが有意に高値を示した。また、高脂

肪食摂餌マウスに poly (I:C) を投与した結果, IFN- β や CCL5/RANTES, viperin 遺伝子は PBS 投与群と比較して有意に発現が増加した (図 1A). 一方, この poly (I:C) によって増加する遺伝子発現は, シンバスタチンの投与によって有意に抑制された (図 1A). また, IFN- β の産生量もシンバスタチンの投与によって有意に抑制された (図 1B). 以上の結果より, シンバスタチンの投与により, poly (I:C) によって誘導されるマウス肺中の IFN- β や CCL5/RANTES, viperin などの発現は抑制されることが示唆された.

また, BALF 中の細胞を Diff-Quik 染色を用いて観察した結果, いずれの刺激によってもマクロファージが 95%以上を占めていたことから, 肺における自然免疫応答はマクロファージが中心的な役割を担っていることが示唆された (図 1C). そこで, 以降の実験ではマクロファージを用いた解析を行うこととした.

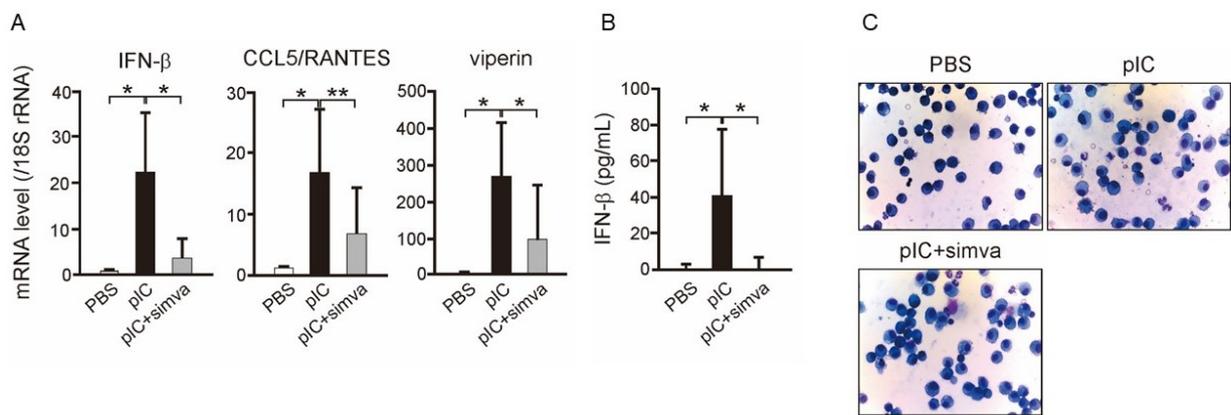


図 1. 脂質異常マウスの肺における抗ウイルス応答に対するスタチンの影響

C57BL/6J マウスに高脂肪食を 8 週間与え, 次いでシンバスタチンを 10 日間経口投与し, 最終投与から 24 時間後に poly (I:C) を経鼻投与した. (A) 刺激 8 時間後の肺組織中における IFN- β や CCL5/RANTES, viperin 遺伝子発現, (B) 気管支肺胞洗浄液中 (BALF) に産生された IFN- β 量, BALF 中の細胞の Diff-Quik 染色像 (C). pIC; poly (I:C), simva; simvastatin, * p <0.01, ** p <0.05.

2. マクロファージにおける抗ウイルス応答に対するスタチンの影響

細胞は, マウスマクロファージ系細胞株 J774.1 細胞を用いた. 方法は, 細胞を播種後, シンバスタチンあるいはピタバスタチンをそれぞれ 100 nM の濃度で培地中に添加し, 48 時間培養後, 10 μ g/mL の poly (I:C) で刺激し, IFN- β や CCL5/RANTES, viperin 遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR で, IFN- β の産生量を ELISA によって調べた. その結果, poly (I:C) の刺激によって誘導される IFN- β や CCL5/RANTES, viperin の遺伝子発現は, シンバスタチン, ピタバスタチンの処理によって有意に抑制された (図 2A). また, IFN- β の産生も同様に抑制された (図 2B). 以上の結果より, シンバスタチンやピタバスタチンはマクロファージにおける IFN- β や CCL5/RANTES, viperin などの発現誘導を抑制することが示唆された.

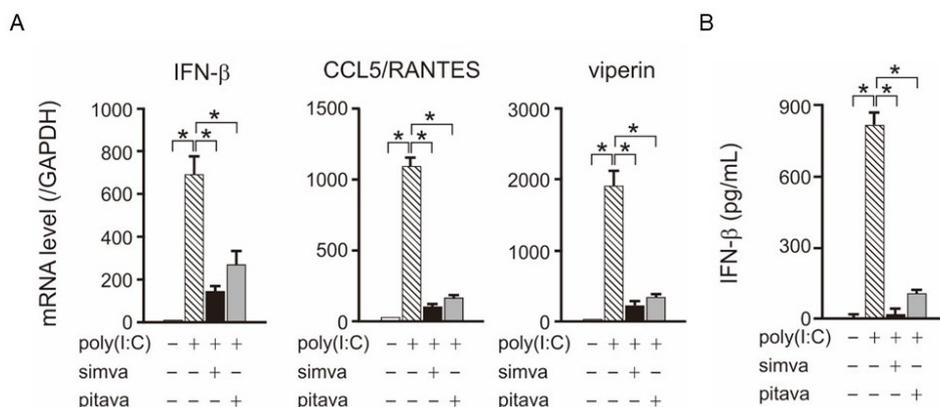


図 2. マクロファージにおける抗ウイルス応答に対するスタチンの影響

J774.1 細胞をシンバスタチンあるいはピタバスタチンを含む培地で 48 時間培養後, poly (I:C) を添加した. (A) poly (I:C) 添加 4 時間後の IFN-β や CCL5/RANTES, viperin の遺伝子発現, (B) 20 時間後の IFN-β 産生量を定量した. simva; simvastatin, pitava; pitavastatin, * $p < 0.01$.

3. TLR3 の発現や poly (I:C) の細胞内への取り込みに対するスタチンの影響

スタチンによる抗ウイルス応答抑制機構の解析を行った. まず, poly (I:C) を認識する受容体である TLR3 の発現に対するスタチンの影響を調べた. 細胞内の TLR3 の発現量はウェスタンブロッティングによって調べた. その結果, シンバスタチン, ピタバスタチンは TLR3 の発現に影響しないことが示された (図 3A). 次に, rhodamine 標識した poly (I:C) を用いて, poly (I:C) の細胞内への取り込みに対するスタチンの影響を調べた. その結果, シンバスタチン, ピタバスタチンは rhodamine 標識した poly(I:C) の細胞内への取り込みに影響しないことが示された (図 3B and C). 以上の結果より, スタチンは TLR3 の発現や poly(I:C) の細胞内への取り込みには影響しないことが示された.

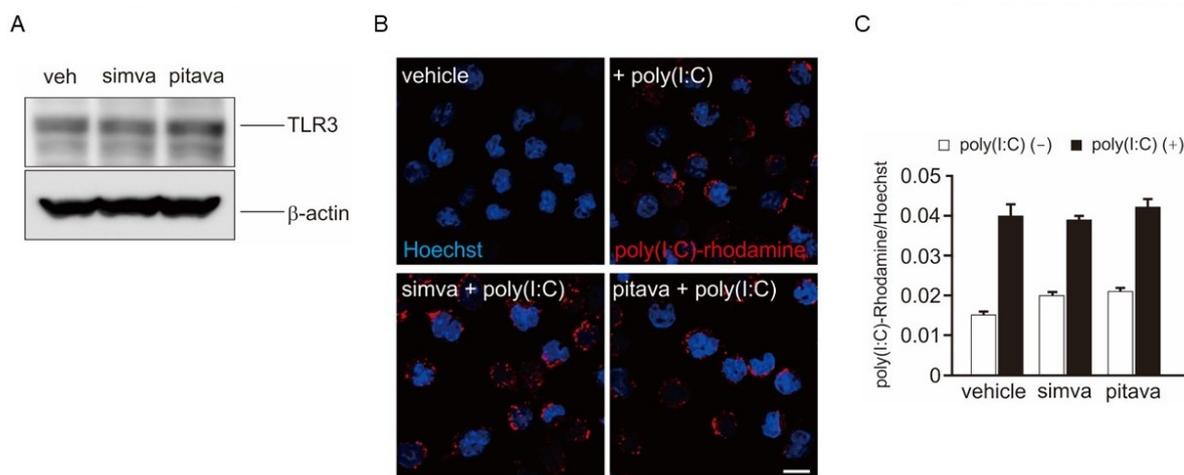


図 3. TLR3 の発現や poly (I:C) の細胞内取り込みに対するスタチンの影響

(A) J774.1 細胞をシンバスタチンあるいはピタバスタチンを含む培地で 48 時間培養後の TLR3 の発現, (B) rhodamine-poly (I:C) を添加し, 2 時間後の細胞内への取込みを観察し, (C) その際の rhodamine の蛍光量の定量した. simva; simvastatin, pitava; pitavastatin.

4. 転写因子 IRF3 や STAT1 に対するスタチンの影響

TLR3 がウイルス 2 本鎖 RNA や poly (I:C) によって刺激されると、そのシグナルが下流へと伝わり、転写因子 IRF3 を活性化し、IFN- β や CCL5/RANTES, viperin などを含む ISGs の発現を誘導することが知られている。さらに、IFN- β は IFN 受容体を介して、STAT1 などの転写因子を活性化し、ISGs の発現誘導を促進する。そこで、IRF3 や STAT1 に対するスタチンの影響をウェスタンブロッティングによって調べた。その結果、poly (I:C) 刺激後、30 分以内に IRF3 はリン酸化 (活性化) され、STAT1 は 180 分以内にリン酸化されることが示された。一方、シンバスタチン、ピタバスタチンで処理した細胞では、IRF3, STAT1 のリン酸化は、顕著に抑制された (図 4)。以上の結果より、スタチンは IRF3 や STAT1 の活性化を抑制することによって、IFN- β や CCL5/RANTES, viperin などの発現誘導を抑制することが示唆された。

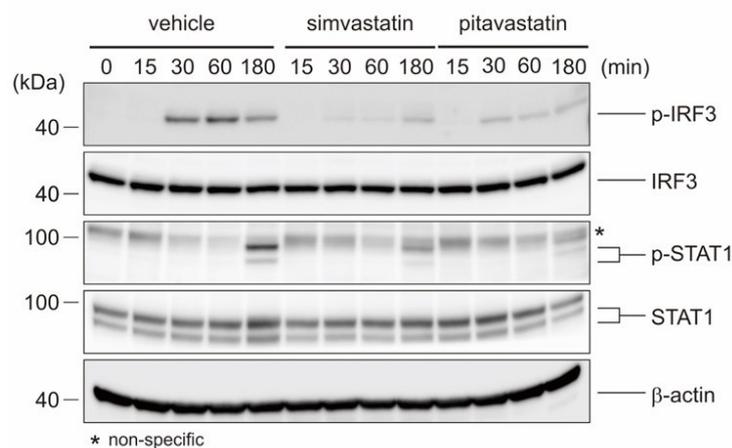


図 4. IRF3 や STAT1 の活性化に対するスタチンの影響

J774.1 細胞をシンバスタチン、ピタバスタチンを含む培地で 48 時間培養後、poly(I:C) を添加し、IRF3, STAT1 のリン酸化の経時的変化をウェスタンブロッティングによって評価した。

5. スタチンによる抗ウイルス応答抑制作用に対するメバロン酸経路の関与

スタチンは HMG-CoA 還元酵素を抑制することによって、メバロン酸以降の生合成を阻害し、コレステロールやゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) などの生合成も阻害する (図 5A)。そこで、スタチンで処理する際に、培地中にメバロン酸やコレステロール、GGPP を添加することによって、スタチンによる抗ウイルス応答抑制作用への影響を調べた。その結果、シンバスタチン、ピタバスタチンによって抑制される IFN- β や CCL5/RANTES, viperin などの遺伝子発現は、メバロン酸や GGPP の添加によって回復した (図 5B)。一方、コレステロールの添加では、回復効果は見られなかった (図 5B)。また、シンバスタチンによって抑制される IRF3 や STAT1 のリン酸化もメバロン酸や GGPP の添加によって回復することが示された (図 5C)。以上の結果より、メバロン酸や GGPP の添加によってスタチンの抑制効果は回復することが明らかになった。

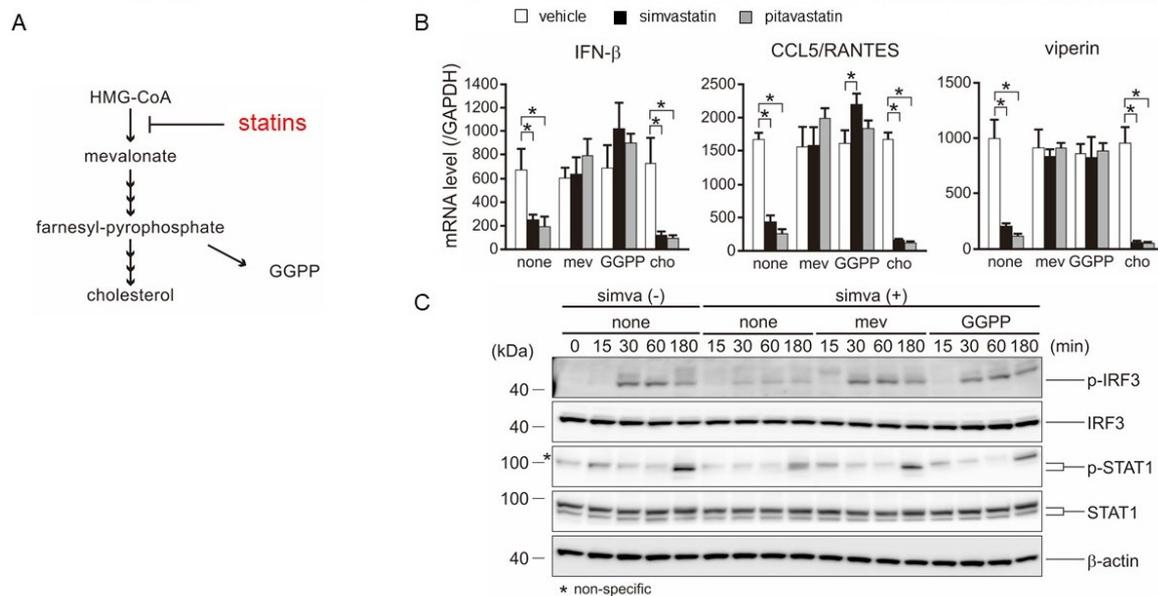


図5. スタチンの抗ウイルス応答抑制作用に対するメバロン酸経路の関与

(A) コレステロールの生合成経路. (B) J774.1 細胞をシンバスタチン, ピタバスタチンを含む培地で 24 時間培養後, メバロン酸, コレステロール, グラニルグラニルピロリン酸を添加し, さらに 24 時間培養した. 次いで, poly (I:C) を添加し, 4 時間後の IFN- β や CCL5/RANTES, viperin の遺伝子発現を解析し, (C) poly (I:C) 添加後の IRF3, STAT1 のリン酸化の経時的変化を調べた. GGPP; geranylgeranyl pyrophosphate, cho; cholesterol, mev; mevalonate, simva; simvastatin, * $p < 0.01$.

6. スタチンによるマクロファージに対する抗ウイルス応答抑制機構

本研究によって, スタチンはマウス肺およびマクロファージの抗ウイルス応答の誘導に関与する IFN- β や CCL5/RANTES, viperin などの発現を抑制することが明らかになった. また, このスタチンによる抑制機構は, poly (I:C) の刺激によって活性化する転写因子 IRF3 や STAT1 の抑制に起因することが示唆された. さらに, スタチンによる抗ウイルス応答抑制作用はコレステロールの補充では回復せず, GGPP の補充によって回復することが明らかになった. 以上の結果より, スタチンによる抗ウイルス応答抑制作用は, 細胞内の GGPP が減少し, その結果, IRF3 や STAT1 の活性化が抑制されたものと考えられた (図 6). つまり, GGPP は TLR3 を介した IRF3 や STAT1 の活性化経路に関与していることが示唆された. 今後は, GGPP の関与について詳細な解析を進めていく予定である.

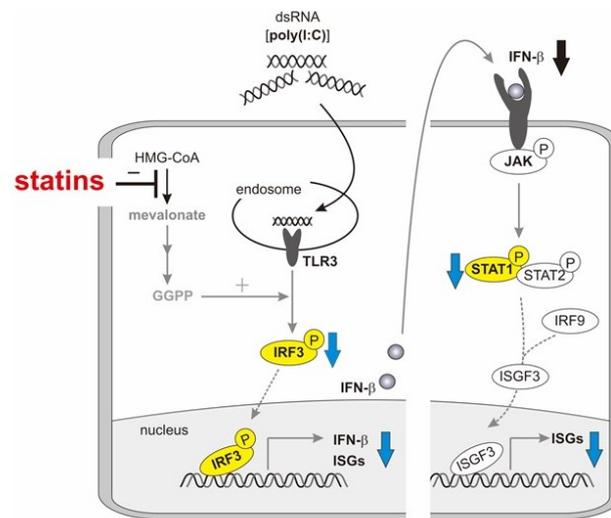


図6. スタチンによる抗ウイルス応答抑制機構の概念図

ISGF3; interferon-stimulated gene factor 3

成果発表：

<原著論文>

- ・ 投稿中

<学会発表>

- ・ スタチン系薬剤による Toll-like receptor 3 (TLR3) シグナル経路抑制機構の解析, 小池敦資, 藤森功, 日本薬学会第 140 年会, 2020 年 3 月
- ・ Effects of statins on the inflammatory response of macrophage activation through the TLR3 signaling pathway. Koike A, Tsujinaka K, Fujimori K, ASCB/EMBO 2019 meeting, 2019 年 12 月
- ・ スタチン系薬剤によるマクロファージの Toll-like receptor 3 を介した抗ウイルス作用抑制機構の解析, 小池敦資, 辻中海斗, 藤森功, 第 92 回日本生化学大会, 2019 年 9 月
- ・ スタチン系薬剤による Toll-like receptor 3 を介した抗ウイルス作用抑制機構の解析, 小池敦資, 辻中海斗, 藤森功, 第 66 回日本生化学大会近畿支部例会, 2019 年 5 月
- ・ Toll-like receptor (TLR) 3 を介したマクロファージの活性化機構に及ぼすスタチン系薬剤の影響, 小池敦資, 辻中海斗, 天野富美夫, 藤森功, フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2018 年 9 月