



Influenza A virus enhances ciliary activity and mucociliary clearance via TLR3 in airway epithelium

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2021-04-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 神谷, 陽輔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003813

博士（医学） 神谷 陽輔

論文題目

Influenza A virus enhances ciliary activity and mucociliary clearance via TLR3 in airway epithelium

（A 型インフルエンザウイルスは、気道上皮の TLR3 を介して線毛活性と粘液線毛クリアランスを増強する）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ウイルス性呼吸器感染症は、A 型インフルエンザウイルス（IAV）などの RNA ウイルスが原因となり、日常臨床でしばしば遭遇する疾患である。軽症例だけで無く時に重度の呼吸不全を引き起こし致命的となるが、その予防や治療において有効なワクチンや抗ウイルス薬の開発は未だ十分でない。よって、宿主の生体防御にはウイルスをいち早く体外に除去するメカニズムが重要となる。

粘液線毛輸送系は、気道に侵入した異物や病原体を物理的に除去する気道の生体防御機構である。気道上皮の線毛運動により粘液と共に異物が運搬されるため、線毛運動は有効な線毛輸送系の維持に主要な役割を果たす。一方、ウイルス感染が気道上皮の線毛運動や線毛輸送系に与える影響は未だ解明されていない。本研究では、マウス気管上皮の組織培養系を用いて、IAV 感染が線毛運動・線毛輸送系に及ぼす作用とその機序を解明することを目的とした。

〔材料ならびに方法〕

動物実験は、浜松医科大学動物実験委員会の承認を得て実施した（H29-064）。野生型（WT）および Toll-like receptor（TLR）3 ノックアウト（KO）マウス（BALB/c マウス、9～11 週齢、雌）より気管組織を採取した。採取した気管を水平方向に切開して気管内面の気道上皮を露出させた後、IAV 含有培養液で気管組織を 1 時間培養して IAV を感染させ、線毛輸送能と線毛運動を非感染群と比較解析した。線毛輸送能の解析として、マウス気管内腔を蛍光ポリスチレンビーズ含有液で満たしてビーズの流れを蛍光顕微鏡とビデオカメラを用いて観察し、ビーズの移動する距離と時間から流体移動速度を算出した。線毛運動の解析では、気管の線毛の先端を墨汁で標識し、線毛先端の動きを高速カメラで撮影して（300 枚/sec）、線毛先端の動きから線毛打頻度（CBF）や有効打速度、回復打速度を算出した。培養上清中の ATP 濃度の測定にはルシフェール 250 プラス（Kikkoman）を用いた。IAV 感染の同定のため、real-time PCR 法で気管組織の IAV RNA を定量評価した。

〔結果〕

WT マウス気管組織培養において、IAV 感染により気道上皮の流体移動速度と CBF は非感染群と比較して有意に増加した。一方、紫外線照射により感染性を消失した不活化 IAV は、流体移動速度の増加を示さなかった。以上より、IAV 感染は早期より気道上皮の線毛輸送能と線毛運動を促進することが明らかとなった。次に、IAV による線毛運動の促進作用における TLR3 の関与を解明すべく、TLR3-KO マウスの気管組織を用いて線毛輸送能・線毛運動を評価した。TLR3-KO マウスでは、IAV 感染による流体移動速度及び CBF の増加はみられず、IAV 感染による線毛輸送能と線毛運動の促進における TLR3 の関与が明らかとなった。

TLR3 シグナルが線毛運動を促進するか検証するため、TLR3 リガンドである polyI: C を培養液に添加して同様の実験を行った。WT マウスにおいて、polyI: C 添加により流体移動速度と CBF は有意に増加した。TLR3-KO マウスでは、polyI: C による流体移動速度と CBF の増加は消失した。以上より、TLR3 シグナルは気道における線毛輸送能と線毛運動を促進すると考えられた。

細胞外 ATP は P2 受容体を介して線毛運動を促進することが知られている。TLR3 シグナルが ATP 放出を誘導するか明らかにすべく、polyI: C 添加・非添加にて気管組織培養を行い、培養上清中の ATP 濃度を評価した。WT マウスでは polyI: C 添加により ATP 濃度は非添加群と比較して増加した。TLR3-KO マウスでは、polyI: C 添加は ATP 濃度に変化を与えなかった。P2 受容体阻害剤（スラミン）を polyI: C と共添加して線毛運動を評価した。スラミンの添加は、polyI: C による流体移動速度及び CBF の増加を抑制した。以上より、polyI: C による TLR3 活性化は ATP 分泌を誘導し、ATP は P2 受容体を介して線毛運動を促進することが明らかとなった。

[考察]

本研究において、IAV 感染は気道上皮における線毛輸送系と線毛運動を促進することを明らかにした。気道上皮細胞がウイルスの侵入に即座に応答して線毛運動を活性化させ、ウイルスの除去を誘導することは、感染初期における宿主の防御応答として極めて合理的であると考えられた。

本研究では、TLR3 シグナルは気道上皮における線毛運動の促進に寄与することを見出した。気道上皮に発現する TLR3 は、ウイルス RNA を認識してインターフェロンなどの抗ウイルスタンパク質の発現を誘導し、初期の抗ウイルス応答に重要な役割を果たすことが知られている。一方、TLR3 シグナルと線毛運動との関連はこれまで不明であった。本研究で見出した“TLR3 シグナルによる線毛運動促進作用”は、TLR3 による新たな気道生体防御機能と位置づけられる。ウイルス感染において、TLR3 シグナルは自然免疫応答として抗ウイルス分子の発現誘導に加えて、線毛運動を促進してウイルス除去を促すことで、生体防御に重要な役割を果たしていると考えられる。

気道上皮細胞は機械的刺激等により ATP を放出し、細胞外 ATP は P2 受容体

を介して線毛運動を促進する。本研究では、TLR3 活性化は気道の ATP 分泌を誘導し P2 受容体を介して線毛運動を促進することを明らかにした。一方、TLR3 活性化による ATP 分泌誘導に関わる細胞内機序は未解であり、今後の検討すべき課題である。

〔結論〕

IAV 感染は、TLR3 活性化による ATP の自己分泌と ATP-P2 受容体経路を介して、気道上皮の線毛活性と線毛輸送能を促進する。