

令和 2 年 4 月 10 日現在

機関番号：82603
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：17K10133
研究課題名（和文）RSウイルス複製におけるEphrin-B2、RARRES2遺伝子の役割の解明

研究課題名（英文）Studies on the role of Ephrin-B2 and RARRES2 in replication of RS virus

研究代表者
白戸 憲也（Shirato, Kazuya）

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：40415477
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Ephrin-B2とRARRES2のRSウイルス複製における作用を検討するためにCRISPRによるノックアウト細胞を構築し、検討する予定であった。しかし当初使用していたSigmaのプラスミド系が極めて使いづらいものであったことが分かった。Thermoのものがまともである。新型コロナウイルスにより研究が中断され非常に残念である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
非常に残念ながら本研究は十分な成果が得られなかった。

研究成果の概要（英文）：The CRISPR plasmids kit sold by Sigma was not for this study. Thermo kit was better. When SARS-2 pandemic is over, I would like to try again.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RSウイルス Ephrin-B2 RARRES2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RS ウイルスは *Pneumovirus* 科 *Orthopneumovirus* 族に属するマイナス鎖 RNA ウイルスである。世界中に広く分布しており、症状は軽症の感冒様症状から下部気道感染にいたるまで様々で、成人になってからも容易に再感染を起こす。特に、生後 8 週から 30 週齢の乳幼児が感染すると最も症状が悪化し、ウイルス性気管支炎で入院する幼児の 70% が RS ウイルス感染といわれる。また老人や骨髄移植などで免疫抑制がなされている患者等でも重症化し、院内感染や家庭内感染の防止が重要とされている。しかしながら、かつて 1960 年代に行われたホルマリン不活化ワクチン trials では、逆にワクチン接種群のほうで症状が悪化して 2 名が死亡したように、ワクチンの開発は困難であり、2016 年時点で利用できるワクチンはまだない。また効果的な治療法も開発されておらず、抗ウイルス薬の開発も待望されている。

インフルエンザにおけるタミフルは、インフルエンザウイルスが出芽する際に利用するノイラミニダーゼを阻害し、ウイルス複製サイクルをブロックすることで生体によるウイルス排除を促進させる効果がある。このように抗ウイルス薬の標的分子を特定するためにはウイルス複製の詳細な解明が必要であり、我々は RS ウイルス複製に関与する宿主因子の研究を進めてきた。これまでの研究により、RS ウイルス複製に関与する宿主因子として、膜蛋白質である Ephrin-B2 および RARRES2 をピックアップする事に成功している (Virus Res. 2015. 210:213)。そこで本研究ではこれらの遺伝子が RS ウイルス複製サイクルにどのように関与しているかについて詳細な解析を進め、これらの分子が抗ウイルス薬開発の標的たり得るか否かを明らかにすることが目的であった。

2. 研究の目的

先に述べたように RS ウイルス感染症は生後 8 週から 30 週齢の乳幼児が感染すると最も症状が悪化し、ウイルス性気管支炎で入院する幼児の 70% が RS ウイルス感染といわれる。また老人や骨髄移植などで免疫抑制がなされている患者等でも重症化し、院内感染や家庭内感染の防止が重要とされている。全体としてみた場合、その致死率は 0.005 ~ 0.02% であるが、このような集団に限れば RS ウイルス感染による致死率は上昇する。現存する唯一の RS ウイルス感染予防薬として、ヒト化モノクローナル抗体の Palivizumab が商品化されて予防的投与に用いられているが、月一回の筋肉注射を半年近く接種し続ける必要があり、高額なうえ、一部の未熟児にしか保険適用されず、RS ウイルス感受性の幼児、高齢者、免疫不全患者などへの長期投与は事実上不可能である。また RS ウイルス感受性の幼児は流行期毎に入退院を繰り返す傾向があり、保護者の精神的、肉体的な負担は計り知れない。

これまで、RS ウイルスワクチン開発は困難を極めており、現時点でも市販のワクチンは存在していない。しかし 2015 年の 3 月に WHO で行われた RSV surveillance meeting では、2018 年から 2020 年にかけて RS ウイルスに対するワクチンの第 1 弾が承認される見通しと報告された。ワクチンの詳細は Novavax 社の F nanoparticle である。ワクチンの性状から察するに、F 蛋白質に対する抗体を誘導し、感染阻止の効果があるものと推察される。しかし生ワクチンではないため細胞性免疫の誘導はなく、有効年数もおそらく数年であろう。従って、ワクチン実用化の後もインフルエンザのように、抗ウイルス薬の併用による感染コントロールが重要であると考えられる。また免疫不全や、高齢者のケースを考慮すれば、ワクチンが利用可能であるとしても抗ウイルス薬の選択肢をそなえておく必要性は非常に高いと考えられる。本研究により Ephrin-B2 および RARRES2 が RS ウイルス複製サイクルのどのステップで関与しているかを明らかにでき、これらが抗ウイルス薬開発のための標的因子となりうるとわかれば、抗ウイルス薬開発を検討することも可能となる。

これまで、RS ウイルスのウイルス受容体候補に関する論文がいくつか発表されている。Nucleolin、ICAM-1、ヘパリン、anexinII、TLR-4、CX3CR1 などが候補因子として挙げられているが、なかでも Nucleolin はメインのウイルス受容体ではないかと考えられている。Ephrin-B2、RARRES2 と RS ウイルスの関連に注目している研究者は我々の他にいない。

ウイルス受容体とウイルス構造蛋白質の結合をブロックすることは、直接のウイルス感染の阻止につながるため、抗ウイルス薬の標的分子としては第 1 候補ともなりうる。今回我々が注目している Ephrin-B2 や RARRES2 は、実験手段として感染後 3 日目のウイルス力価を指標としてピックアップしたため、ウイルス複製のどのサイクルで関与しているかが明らかではない。Ephrin-B2 はヘニパウイルスのレセプターであることが報告されており(Nature. 2005. 436:7049)、RS ウイルスの(co)receptor である可能性もあるが、ウイルス粒子の放出や cell-to-cell の拡散に関与している可能性もある。タミフルもウイルス感染を阻止するわけではないが、効果的な抗ウイルス薬として実用されており、Ephrin-B2、RARRES2 が複製サイクルの後期に関係しているとしても、抗ウイルス薬の標的となりうると思う。

抗ウイルス薬の開発と言っても、ゼロからのスタートであれば途方もない時間がかかるであろう。しかし、予め、作用部位が特定できればその作業は非常に軽減されると思う。宿主蛋白質とウイルス蛋白質の結合がウイルス複製に関与しているならばそれらをブロックするような薬剤のデザインが必要である。一方宿主蛋白質の何らかの生理活性がウイルス複製を促進している場合は、蛋白質の生理活性を阻害するような薬剤をデザインする必要がある。前者の場合、宿主蛋白質とウイルス蛋白質の結合部位の特定も叶えば薬剤のデザインは非常に効率的となるだろう。Ephrin-B2 は結晶構造の解析が報告されているし(Dev Cell. 2001. 1:83)、RS ウイルスも F(J Virol 2011. 85:7788)、G (Curr Top Microbiol Immunol. 2013. 372:83)、N(Science 2009. 326:5957)、M2 - 1(PNAS 2014 111:1580)などいくつかの蛋白質で結晶構造解析がなされている。本研究の成果とこれらの知見を合わせて活用することが可能であれば、薬剤デザインの労力も軽減されることになると思う。

3 . 研究の方法

本研究は Ephrin-B2、RARRES2 が RS ウイルス複製のどのステップで作用するかを特定することが第 1 の目標である。そのためにもまず、CRISPR ゲノム編集技術を用いて Ephrin-B2、RARRES2 遺伝子ノックアウト細胞を作成する。そしてそれらの細胞を用い、細胞侵入、脱殻、RNA 合成、集合、出芽のどのステップで作用しているかをレポーター遺伝子発現 RS ウイルス等を用いて解析する。また併せて、Ephrin-B2、RARRES2 が真に生体で RS ウイルス複製に関与しているかを確認するため、ヒトプライマリ呼吸器上皮細胞の Air-Liquid Interface 培養と siRNA を用いて試験を行う。第 2 に、Ephrin-B2、RARRES2 が RS ウイルス蛋白質と相互作用しているか否かを免疫沈降等の試験を行い解析する。という計画であった。

4 . 研究成果

本実験を遂行するにあたり、「CRISPR ゲノム編集技術を用いて Ephrin-B2、RARRES2 遺伝子ノックアウト細胞を作成する。」が非常に重要であるが、これが極めて困難であった。

RS ウイルス高感受性細胞である HEp-2、HeLa、呼吸器上皮由来の A549 細胞を用い、CRIPR

はオフターゲット効果を抑えるために、Sigma の Paired nickases を用い、さらに 1 つのターゲットについて 2 種のプラスミドを用いた。ノックアウトは標的配列をプライマーとした RT-PCR で確認し、標的配列がノックアウトされていれば PCR で増幅産物は見られなくなり、選択が可能であると考えられた。まずは Ephrin-B2 のシングルノックアウト細胞を作製できたと想定していた。いくつかのクローンが取れたと思われ、ウイルスの細胞侵入に関する実験を行っていたが、実験結果が極めて安定しないことに気づき、得られていたノックアウト細胞について PCR によるバンド長確認、遺伝子配列の解析を行い、確実なノックアウト細胞のクローンが得られていないと判定した。PCR で確認出来ていても継代している間にもとに戻っていると考えられた。クローニングがうまくいっていない、2 対の染色体が完全にノックアウト出来ていない可能性が考えられた。使っていたのは Sigma 社の CRISPR 関連試薬であり、3 つのプラスミドを形質導入する必要があるが、実験条件を詳細に検討しなおしたところ、肝心の Cas9 発現プラスミドの形質導入効率が極めて低く、カタログ通りのスペックを全く発揮できておらず、形質導入条件の検討をいろいろ行ったが、目的の細胞に対し、十分な導入効率を得る条件が設定できなかったため、試薬そのものの変更を検討した。その結果、Thermo 社の試薬が良さそうに思えたため、これらによるノックアウト細胞の最構築を行うことにした。しかし、Thermo 社のプラスミドは 1 つのプラスミドに Cas9、ガイド RNA、選択用の CD4 分子が搭載されているが、これに目的のガイド RNA を挿入することが極めて不安定で困難であった。カスタマサポートのサポートもあり、2 標的のうち 1 クローンは取れたが、もう 1 つはプラスミド全長をベクタービルダーで完全合成しなければ得られなかった。これらのプラスミドを用い、ようやくノックアウト細胞のクローンがいくつか入手できたが、新型コロナウイルス(SARS2)の発生に伴い、国研の担当部署として職務専念義務があり、すべての基礎研究を中断せざるを得なくなったため、本研究で目的とした実験を行うことが出来なかった。プラスミドの作製に想定外の時間がかかり、実験期間中に十分な試験が行えなかったのが残念である。SARS2 のパンデミックが制圧された暁には実験を再開したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuya Shirato	4. 巻 63
2. 論文標題 Detecting Amplicons of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 407-412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----