

令和元年5月24日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15382

研究課題名(和文)猫伝染性腹膜炎の治療薬開発に向けた創薬ターゲットの網羅的スクリーニングによる同定

研究課題名(英文) Screening for drug-target of feline infectious peritonitis

研究代表者

佐藤 由佳 (Sato, Yuka)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：10781015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コロナウイルス感染においてレセプターの種特異性が重要であり、猫伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)の病原性獲得にはレセプター選択性の変化が関与していると報告されていることから、cDNAライブラリーを用いた新規レセプターの同定を試みた。既知のFIPVレセプターであるfAPNをノックアウトした細胞から作製したcDNAライブラリーをレンチウイルス遺伝子発現システムによりネコ以外の様々な動物種の細胞に導入した。その後FIPVの粒子産生が認められた細胞をスクリーニングした。いくつかの候補遺伝子が発見されたので、今後その遺伝子をクローニングし、FIPV感染に重要かどうかを確認後、役割を解析していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FIPVの新規レセプターの発見はFIP特異的な治療薬の開発および臨床応用につながるだけでなく、FIPVの新たな増殖機構を解明するのに重要な知見である。また既知のFIPVレセプターであるfAPNをマウスなどの他種の細胞に発現させるとFIPVが増殖可能になることから、FIPVと他のコロナウイルスは類似した宿主因子を利用して増殖していることが考えられる。コロナウイルス感染症は獣医学領域において、またSARSやMERSなど人に急性で重篤な症状を引き起こすことから医学領域においても非常に重要であり、これらのコロナウイルス感染症の新規治療法の開発への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：It is reported that receptor specificity is important for coronavirus entry into host cells and the selectivity changes are involved in pathogenicity of feline infectious peritonitis virus (FIPV). Therefore, we decided to identify novel receptors by cDNA library screening. We made lentiviral cDNA libraries from knockout cells of fAPN that is known as FIPV receptor and transduced them into different types of cells except for feline cell lines. Then, we screened the cells that have productive viral particles. We are planning to subclone the candidate genes and analyze the role of that gene in infected cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：猫伝染性腹膜炎 コロナウイルス スクリーニング cDNAライブラリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

猫伝染性腹膜炎（FIP）は、ネココロナウイルス（FCoV）の突然変異により強毒化した猫伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）によって発症する。FIP は子ネコの死因の約 5% を占めており、発症するとほぼ 100% 死に至ることから、ネコにおいて重要な感染症である。国内外のグループが FIP 治療薬の開発に向けて研究を推進しているが、*in vivo* において薬効が認められない、毒性が強いなどの理由からすべて実用化に至っておらず、FIP に有効な治療薬の開発が必要不可欠である。またコロナウイルスの種選択性には種特異的なレセプターが必要であり、レセプターを標的としたウイルスの感染制御が重要である。さらに FCoV が強毒化したと考えられている FIPV がネコへの病原性を獲得するにはレセプターの選択性の変化が関与しているとも言われており、新規レセプターの同定が重要である。申請者らは、これまでの研究成果で以下のことを明らかにした。

- (1) ネコ細胞株 fcwf-4 細胞において免疫抑制剤シクロスポリン（CsA）が FIPV の複製および転写を抑制する
- (2) CsA 結合タンパク質シクロフィリン（Cyp）A および CypB が FIPV の複製に重要である
- (3) Cyp と同様なシャペロン作用を有する Pin1 が FIPV の複製を増強する
- (4) CsA が FIP 自然発症ネコにおいて臨床症状を寛解させる

CsA は FIP 自然発症ネコに効果を示すが、使用方法によっては治療効果を示さない個体や CsA による副作用が生じる個体もみられること、さらに FIPV が突然変異を生じやすいウイルスであることから FIP に特異的な複数の治療薬の開発が喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では FIP の根治を目指し、新たな治療薬を展開するための基盤構築を進める。申請者は、これまでに CsA の FIPV 複製阻害効果を明らかにした。この知見をもとに FIPV に対する新規阻害剤およびレセプターを同定することを目的とし、以下の通り研究を遂行する。

- (1) ルシフェラーゼもしくは蛍光タンパク質を発現する組換え FIPV を作製し、FIPV 増殖を阻害する化合物を効率良く検出する。5 万種類の化合物の FIPV 阻害効果を網羅的に検証し、スクリーニングでヒットした化合物に関してより詳細な検証を行う。
- (2) 既知の FIPV に対する宿主のレセプターは feline aminopeptidase N（fAPN）のみであり、多くのウイルスが感染に複数のレセプターを利用することを鑑みれば、FIPV は fAPN 以外のレセプターを使用している可能性が十分に考えられる。まず CRISPR/Cas9 システムを用いて fAPN ノックアウト細胞を作製する。次にその細胞の cDNA ライブラリーを作製してレンチウイルス遺伝子発現システムによりヒト細胞に導入し、FIPV の新規レセプターが発現したことにより FIPV の粒子産生が生じるようになった細胞をスクリーニングする。

3. 研究の方法

- (1) 化合物ライブラリーを用いた FIPV 阻害剤のスクリーニング

FIPV 特異的な治療薬を開発するために、FIPV を対象とした阻害剤のスクリーニングを行う。まずは FIPV の増殖を効率良く検出するために組換え FIPV を作製する。

- ① ルシフェラーゼもしくは蛍光タンパク質を発現する組換え FIPV（Luc/GFP-FIPV）の作製
マウス肝炎ウイルス（MHV）を用いた FIPV の組換えはすでに報告されており、Luc/GFP-FIPV は作製可能である。組換えウイルスの作製はその工程が多少煩雑であるが、作製方法が確立できればすべてのアッセイが効率良く推進可能となる。
- ② 化合物ライブラリーを用いた FIPV 阻害剤の網羅的スクリーニング
ネコ細胞株 fcwf-4 細胞を化合物プレートに培養し、Luc/GFP-FIPV を感染させ、ウイルス阻害効果のある化合物をプレートリーダーで検出する。さらにスクリーニングでヒットした化合物に関して細胞毒性試験やウイルス増殖阻害能などをより詳細に解析する。

- (2) FIPV レセプターの同定

効率的に FIPV レセプターを発見するために、既知の FIPV レセプターである fAPN 遺伝子をノ

ックアウトした細胞から cDNA ライブラリーを作製し FIPV 新規レセプターを同定する。

- ① fAPN ノックアウト fcwf-4 細胞の cDNA ライブラリー作製
まず CRISPR/Cas9 システムを用いて fAPN ノックアウト fcwf-4 細胞を作製する。fAPN 遺伝子が完全にノックアウトされているかをタンパク質発現およびシーケンシングにより確認する。次に fAPN ノックアウト fcwf-4 細胞の cDNA ライブラリーを作製する。
- ② FIPV レセプター同定
ネコ以外の細胞種に fAPN を発現させることにより低増殖効率ではあるが、ウイルス粒子を産生できることが報告されている。①で作製した fAPN ノックアウト fcwf-4 細胞の cDNA ライブラリーをレンチウイルス遺伝子発現システムによりヒト細胞に導入する。次に(1)-①で作製した Luc/GFP-FIPV を感染させ、ウイルスが増殖するようになった細胞をスクリーニングする。PCR 増幅後、シーケンシングによりレセプターを同定する。

4. 研究成果

(1) 化合物ライブラリーを用いた FIPV 阻害剤のスクリーニング

- ① ルシフェラーゼもしくは蛍光タンパク質を発現する組換え FIPV (Luc/GFP-FIPV) の作製
組換えウイルスの作製には成功したが、Luc もしくは GFP の発現量が十分ではないこと、ウイルスを継代する度に消失していくことなどからスクリーニングに使用するには適していなかった。そのため BAC を用いて組換えウイルスを作製する方法に変更した。BAC システムは一度確立されてしまえば安定して組換えウイルスが作製できることが期待されるが、作製および確認に時間を要する。すでに作製を開始している。
- ② 化合物ライブラリーを用いた FIPV 阻害剤の網羅的スクリーニング
ルシフェラーゼもしくは蛍光タンパク質を発現する組換えウイルスが作製され次第着手する。

(2) FIPV レセプターの同定

- ① fAPN ノックアウト fcwf-4 細胞の cDNA ライブラリー作製
fAPN ノックアウト fcwf-4 細胞を作製し、fAPN の発現消失および FIPV が感染しなくなることを確認した。作製した fAPN ノックアウト細胞の cDNA ライブラリーをレンチウイルスベクターにクローニングした。
- ② FIPV レセプター同定
作製した fAPN ノックアウト fcwf-4 細胞の cDNA ライブラリーをレンチウイルス遺伝子発現システムによりネコ以外の様々な動物種の細胞に導入した。細胞を限界希釈し 96 ウェルプレートで培養後、FIPV を感染させた。当初はルシフェラーゼもしくは蛍光タンパク質を発現する FIPV を感染させウイルスが増殖するようになった細胞をスクリーニングする予定だったが、通常の FIPV を感染させ細胞変性効果の有無および RT-PCR 等によりウイルス感染を検出した。FIPV の増殖が 36 種類の細胞で認められたので、PCR 増幅後シーケンシングによりレセプター候補遺伝子を同定した。今後これらの遺伝子をクローニングし、FIPV レセプターとしての機能の確認および FIPV 感染における役割について検証していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Miyamoto R, Kurita S, Tani H, Kobayashi M, Sugiura S, Shigihara S, Sato Y, Tanaka Y, Tamura K, Bonkobara M. Establishment and characterization of a cell line from a feline histiocytic sarcoma. 2018. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 201: 72-76. DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.05.011, 査読有
- ② Tanaka Y*, Sato Y*, Sasaki T. (*equal contribution), Feline coronavirus replication is affected by both cyclophilin A and cyclophilin B. 2017. *Journal of General Virology*. 98(2): 190-200. DOI: 10.1099/jgv.0.000663, 査読有

〔学会発表〕（計1件）

①田中良和、佐藤由佳、ネココロナウイルス増殖過程におけるシクロフィリン要求性について、第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月15日、鹿児島大学

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。