

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82603
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16289
研究課題名(和文) ヒトメタニューモウイルス及びパラミクソウイルス増殖に関与する宿主因子の網羅的解析

研究課題名(英文) Host factor screen for Human metapneumovirus and paramyxovirus infection and replication

研究代表者
直 亨則 (Nao, Naganori)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・研究員

研究者番号：00781741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ニューモウイルス(RSウイルス及びHMPV)に共通する感染・増殖に必要な宿主因子として、ヘパラン硫酸の生合成に関与する遺伝子B3GAT3、COG6に加えて、ヘパラン硫酸の修飾に関する遺伝子HS6STを同定した。ヘパラン硫酸がHMPV及びRSウイルスの細胞侵入に重要なことはすでに知られているが、ヘパラン硫酸の詳細構造とニューモウイルスの細胞侵入についてはこれまで不明であった。本研究により、ヘパラン硫酸の特定の修飾過程(6-O-sulfation)が、RSウイルス及びHMPVの両方の感染に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では最新の遺伝子編集技術(CRISPR/CAS9システム)を用いて作成したゲノムワイドノックアウト細胞ライブラリーを利用して、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)及びRSウイルスの感染・増殖に必要な宿主因子の同定を行った。その結果、これまで不明であった、HMPV及びRSウイルスの宿主細胞侵入に必要な詳細構造(ヘパラン硫酸の6-O-sulfation)が明らかとなった。本研究成果は未だ有効な治療法の存在しないHMPV及びRSウイルスの治療法開発のための重要な分子基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Several genes including beta-1,3-glucuronyltransferase 3 (B3GAT3), Conserved oligomeric Golgi complex subunit 6 (COG6), and Heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 1 (HS6ST1) were identified as candidate host factors important for both HMPV and HRSV replication. B3GAT and COG6 are involved in heparan sulfate (HS) biosynthesis and HS expression, respectively. HS6ST1 is an enzyme responsible for 6-O-sulfation of HS. HS plays an important role in the entry of HMPV and HRSV. However, the substructures in HS required for HMPV and HRSV infections have poorly elucidated. Our data suggest that 6-O-sulfation of HS is important for both HMPV and HRSV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトメタニューモウイルス RSウイルス 宿主因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトメタニューモウイルス (Human metapneumovirus; HMPV) は、ニューモウイルス科 (Pneumoviridae) ニューモウイルス属 (Metapneumovirus) に分類される。以前 HMPV はパラミクソウイルス科ニューモウイルス亜科ニューモウイルス属に属していたが、国際ウイルス分類委員会 (ICTV) のウイルス分類の変更に伴い、2015 年より現在の分類となっている。HMPV は、2001 年に急性上気道炎、気管支炎、肺炎などの小児の鼻咽頭吸引液から、サル 3 継代目の腎細胞を用いてはじめて分離された。しかし、血清疫学的調査の結果少なくとも 60 年以上前から世界中に流行し、5 歳までにほぼすべての小児が感染するウイルスであることが判明している。長期にわたり発見されなかったのは、HMPV に感受性をもつ細胞株が、非常に限られていること、HMPV による細胞変性効果が弱いこと、分離に時に 2~4 週間を要することなどが、理由と考えられている。HMPV は新生児や乳児に重篤な気管支炎や肺炎を引き起こすことが分かっており、高齢者への肺炎発症リスクも高く、2014 年 1 月に迅速診断キットが保険適応となったこともあり、臨床分野でもますます注目されている。ニューモウイルス科には HMPV と同様ヒトに呼吸器感染症を引き起こすヒトオルトニューモウイルス (旧 RSV) が属している。RSV も HMPV と同様にほぼ全ての小児が幼少期に感染するウイルスであり、新生児や高齢者には重篤な肺炎を引き起こすことがある。RSV、HMPV は特に小児や高齢者を中心に重要な呼吸器感染症ウイルスであるが、承認された特異的な治療法は存在せず、ワクチンについても臨床試験段階、及び研究段階である。RSV 感染症に対してはモノクローナル抗体製剤であるパリミズマブが予防に用いられるが、薬価が効果であり、保険適用の範囲は限られている。

HMPV や RSV が属するニューモウイルス科と近縁のパラミクソウイルス科には、幼児期~小児期における呼吸器疾患の原因ウイルスとして重要なトパラインフルエンザウイルスが属している。このウイルスは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至るまで様々である。ウイルス性気管支炎で入院する幼児の多くがこれらのウイルスに感染していると言われている。成人になってからも容易に再感染を引き起こし、特に高齢者や免疫不全の患者では重症化するとされている。また、髄膜炎、睾丸炎、卵巣炎、難聴、膝炎などを合併する可能性のある流行性耳下腺炎の原因ウイルスであるムンプスウイルスや、非常に感染性が高く、肺炎や脳炎などを合併することのある麻疹の原因ウイルスである麻疹ウイルスもパラミクソウイルス科に属している。ヒトパラインフルエンザウイルス感染症に対する承認された治療法や予防法は存在せず、流行性耳下腺炎や麻疹はワクチンで予防可能であるが、ワクチン接種率は必ずしも十分ではなく、患者の発生が続いており、特異的な治療法は確立していない。

2. 研究の目的

本研究では初めにニューモウイルス科に属する重要な呼吸器ウイルスである HMPV と RSV について、共通のウイルス増殖・感染に重要な宿主因子を同定する。さらに、公衆衛生上重要なウイルスが複数属するパラミクソウイルス科のウイルスについても、増殖・感染に重要な宿主因子を同定し、ニューモウイルス及びパラミクソウイルスに広く共通する感染メカニズムを解明することを計画している。ニューモウイルス及びパラミクソウイルスに広く共通する感染メカニズムを解明することを計画している。

3. 研究の方法

(1) ウイルス株選定

始めに実験に使用する RSV 及び HMPV 株を選定する。本実験に使用するウイルス株は様々な細胞に感染しやすく、細胞変性効果 (CPE) が強いものが適切なため、複数のウイルス株の CPE や細胞感受性を比較する。RSV では Long 株及び A2 株を、HMPV では CAN97-83 株、JPN03 株、NL/1/99 株、JPS02-76 株を用いる。

(2) ゲノムワイドノックアウト細胞ライブラリー作成

Sanjana NE らが報告している方法でゲノムワイドノックアウト細胞ライブラリーを作成する (Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Nat Methods. 2014 Aug;11(8):783-4.)。具体的には、ウイルスに高い感受性を示す細胞を用いて、CAS9 恒常発現細胞を作成し、作成した細胞にガイド RNA (sgRNA) ライブラリー (12 万種類程度) を有するレンチウイルス群を感染させることにより、それぞれの sgRNA に対応する遺伝子がノックアウトされた細胞ライブラリーを得る。

(3) 細胞ライブラリーへのウイルス接種、及び生残細胞の回収

上記のゲノムワイドノックアウト細胞ライブラリーにウイルスを感染させる。通常の宿主細胞や、ウイルスの感染・増殖に関連のない宿主因子がノックアウトされたライブラリー細胞はウイルスが感染・増殖し、CPE により、細胞死に陥る。しかし、ウイルスの感染・増殖に必要な宿主因子がノックアウトされた細胞ではウイルスが効率的に増殖できず、細胞が生残する。そこで、生残細胞を回収し、ノックアウトされている遺伝子を同定する。

(4) 生残細胞においてノックアウトされている宿主因子の同定

宿主因子に導入された sgRNA には各標的遺伝子に特異的な配列に加えて、解析用のタグ配列

が付与されている。そこで、生残細胞から細胞ゲノムを抽出し、タグ配列に対するプライマーを用いて PCR 法で増幅し、次世代シーケンサー (Miseq, illumina 社) を用いて、sgRNA 配列をシーケンシングする。得られたシーケンシングデータから sgRNA 配列を抽出し、各 sgRNA のリード数を数え、ウイルス非感染細胞ライブラリーのデータと比較することで、生残細胞においてノックアウトされている宿主因子を同定する。

4. 研究成果

(1) ウイルス株の選定

RSV の Long 株と A2 株では、Long 株が A2 株に比して HeLa 細胞や Hep2 細胞に高い感染性を示し、CPE も高度であった。HMPV では用いた 4 株すべてが Vero E6 細胞に高い感染性を示したものの、CPE は弱くその他の細胞 (HeLa 細胞、A549 細胞など) への感染性は限定的であった。そのなかで、CAN97-83 株が HeLa 細胞や A549 細胞に比較的高い感染性を示した。そこで、RSV では Long 株を、HMPV では CAN97-83 株を以降の実験に用いた。

(2) HMPV の感染・増殖に重要な宿主因子の同定

CRISPR/CAS9 システムを用いたゲノムワイドノックアウト細胞ライブラリーを用いたスクリーニングは既に薬物の毒性発現機構の解明等に盛んに用いられている。これらの既存の研究では、細胞ライブラリーを薬物で処理したのちに生残細胞を回収・再培養し、再び薬物で処理するスクリーニングを繰り返し、薬物の毒性に耐性を有する細胞を得ることで、薬物の毒性発現に関連する遺伝子を同定している。また、ウイルス学の分野でも一部の細胞変性効果 (CPE) の強いウイルスについては、ウイルス感染細胞の細胞死を指標に CRISPR/CAS9 システムを用いたゲノムワイドスクリーニングが行われている。今回用いたウイルスの一つである HMPV は感染細胞への細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) が弱く、感染細胞が細胞死に至らないため、通常の方法ではスクリーニングが不可能である。しかし、HMPV 感染細胞は非感染細胞と比較して、分裂・増殖速度が低下する。そこで、本研究ではゲノムワイドノックアウト細胞ライブラリーに HMPV を高い感染価で感染させ、繰り返し継代・培養を繰り返すことで、全細胞ライブラリー中の HMPV 非感染細胞の比率を高めることにより、スクリーニングを行った。その結果、統計学的に有意に HMPV の感染・増殖に関連していると判断された因子を 50 程度同定した。本結果から、CRISPR/CAS9 システムを用いたゲノムワイドスクリーニングは CPE が強く、感染細胞が死滅するウイルスだけではなく、その他のウイルスにも応用可能であることが示された。

(3) RSV の感染・増殖に重要な宿主因子の同定

当初、ノックアウト細胞ライブラリーにウイルスを感染させ、生残細胞を培養して、再度ウイルスを感染させて生残細胞を再び回収する過程を繰り返して、より重要な (ウイルス感染に必要不可欠な) 宿主因子を同定する予定であった。しかしながら、HeLa 細胞ノックアウトライブラリーに RSV を感染させると、一部の細胞は他の細胞よりも長期間生残するものの、最終的には全ての細胞が死滅し、細胞培養とウイルス感染を繰り返すことは不可能であった。そのため、ノックアウト細胞ライブラリーに高濃度でウイルスを接種し、一定期間培養したのちに生残細胞を回収した。この方法では、前述のウイルス感染と細胞培養を繰り返す方法に比べて、ウイルス感受性の細胞が確立的に生残細胞に混入する可能性が高くなるため、同様の実験を複数回繰り返すことで、真にウイルス抵抗性の細胞 (ウイルスの感染・増殖に必要な宿主因子がノックアウトされた細胞) を検出できる確率を高めた。その結果統計学的に有意に RSV の感染・増殖に関連していると判断された因子を 70 程度同定した。

(4) RSV と HMPV に共通した感染・増殖に重要な宿主因子

RSV と HMPV に共通な宿主因子としてヘパラン硫酸の生合成にかかわる遺伝子が多数同定された。ヘパラン硫酸が HMPV 及び RS ウイルスの細胞侵入に重要なことはすでに知られているが、ヘパラン硫酸の詳細構造とニューモウイルスの細胞侵入については不明であった。本研究ではヘパラン硫酸の生合成に関与する遺伝子 (B3GAT3、COG6) に加えてヘパラン硫酸の修飾 (6-O-sulfation) に関与する HS6ST1 が同定されており、RSV 及び HMPV の細胞侵入にはヘパラン硫酸の 6-O-sulfation が重要であることが強く示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Nao Naganori, Sato Ko, Yamagishi Junya, Tahara Maino, Nakatsu Yuichiro, Seki Fumio, Katoh Hiroshi, Ohnuma Aiko, Shirogane Yuta, Hayashi Masahiro, Suzuki Tamio, Kikuta Hideaki, Nishimura Hidekazu, Takeda Makoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Consensus and variations in cell line specificity among human metapneumovirus strains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0215822 ~ 0215822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naganori Nao, Toshiyuki Yamaji, Tsuyoshi Sekizuka, Kazuya Shirato, Makoto Takeda
2. 発表標題 Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors important for Pneumovirus replication.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naganori Nao, Ko Sato, Miwako Saikusa, Makoto Takeda1, Hidekazu Nishimura
2. 発表標題 Human metapneumovirus with 180 nucleotide-duplication in the G gene detected in Sendai city, Japan.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naganori Nao, Toshiyuki Yamaji, Tsuyoshi Sekizuka, Kazuya Shirato, Makoto Takeda
2. 発表標題 Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors important for Pneumovirus replication.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naganori Nao, Ko Sato, Fumio Seki, Junya Yamagishi, Maino Tahara, Yuta Shirogane, Hidekazu Nishimura, Makoto Takeda
2. 発表標題 Characterization of clinical and laboratory strains of human metapneumovirus
3. 学会等名 THE 9TH ASIAN CONGRESS OF PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASES, Fukuoka, Japan, November 11 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naganori Nao, Ko Sato, Fumio Seki, Junya Yamagishi, Hidekazu Nishimura, Makoto Takeda
2. 発表標題 The characteristics of recent clinical isolations of human metapneumovirus in Japan
3. 学会等名 The 2018 Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting, Verona, Italy, June 20 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naganori Nao, Ko Sato, Miwako Saikusa, Hidekazu Nishimura, Makoto Takeda
2. 発表標題 The evolution of human metapneumovirus G gene
3. 学会等名 第20回環太平洋新興再興感染症会議、日米医学協力計画急性呼吸器感染症部会会議, Shenzhen, China, January 10 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naganori Nao, Ko Sato, Fumio Seki, Junya Yamagishi, Yuta Shirogane, Hidekazu Nishimura, Makoto Takeda
2. 発表標題 Characterization of recently isolated clinical and commonly used recombinant laboratory strains of human metapneumoviruses
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2018
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----