

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02374

研究課題名(和文) カルシウム拮抗薬による猫伝染性腹膜炎ウイルス増殖阻害機構の解析

研究課題名(英文) Study of inhibitory mechanism of feline infectious peritonitis virus proliferation by calcium antagonist

研究代表者

田中 良和 (TANAKA, YOSHIKAZU)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：50291159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ネココロナウイルス強毒株(FIPV)感染による猫伝染性腹膜炎(FIP)は致死率の高い感染症であるが、ワクチンや抗ウイルス薬で著効を示すものはない。FIPVの脱殻にはエンドソーム内のカテプシンがpH依存性に作用するため、我々はカルシウムイオン(Ca²⁺)がpHを制御することに着目し、数種のカルシウム拮抗薬によるウイルス複製阻害効果を発見した。逆に細胞内Ca²⁺量を増強させるサブシガルギン、イオノフォア抗菌薬の各存在下でも全てウイルス複製阻害効果を認めた。本結果からエンドリソソーム内のCa²⁺濃度がカテプシンに与える影響は大きく、脱殻時にpH酸性条件が非常に重要な因子であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

猫の飼育頭数は犬の頭数が減少しているのに反して増加傾向にあり、飼い猫の約7%を占めるFIPによる死亡頭数はオーナーにとって深刻な問題である。また、FIPは世界中の猫で猛威をふるっており、現時点でワクチン開発もなされていない現状もあり、抗FIP薬の開発に注目が集まっている。本研究は既存の認可済み薬を利用でき、新たな毒性試験や副反応を検討する必要がないことから臨床現場で早急に応用可能である。また、人や産業動物の重症コロナウイルス感染症にも利用することが可能となることから社会的、公衆衛生的意義のある重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：Feline infectious peritonitis (FIP) caused by the highly virulent strain of feline coronavirus (FIPV) is a fatal disease, and no vaccines or antiviral drugs have shown significant efficacy. Since cathepsins in the endosomes act on the uncoating of FIPV in a pH-dependent manner, we focused on the fact that calcium ions (Ca²⁺) regulate pH and discovered the inhibitory effects of several calcium antagonists on virus replication. Conversely, we also observed inhibitory effects on virus replication in the presence of thapsigargin and ionophore antibiotics, which increase intracellular Ca²⁺ levels. These results indicate that the concentration of Ca²⁺ in endo-lysosomes significantly affects cathepsins, and that acidic pH conditions are crucial factors during uncoating.

研究分野：感染症学

キーワード：猫伝染性腹膜炎 ネココロナウイルス カルシウムイオンチャンネル フォスファチジルイノシトールリン酸 抗ウイルス剤 細胞内蛋白質輸送 イオノフォア抗菌薬

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネココロナウイルス強毒株 (FIPV) 感染による猫伝染性腹膜炎 (FIP) は、子ネコの死因の約 7% を占め、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。本感染症に対するワクチンは無く、このため、国内外において様々な抗ウイルス薬の開発研究が行われてきたが、臨床的に著効を示すものはなかった。通常、エンドソームに取り込まれた微生物は、その後エンドソームとリソソームが融合し、ファゴリソソームの形成により酵素分解される。また、この際、細胞内小器官のクロストークによる Ca 依存性小胞輸送機構が重要な役割を担うことが分っている。これに対し FIPV は標的細胞であるマクロファージに吸着後、ファゴソーム、初期エンドソームを経て形成された 後期エンドソーム内で分解されずに脱殻する。そしてウイルスゲノムが脱殻後、宿主由来の膜成分を劇的に変化させて、2 層の脂質 2 重膜を特徴とした DMVs (Double Membrane vesicles) を形成する。この中に、ウイルスの転写・複製装置が局在しており、ウイルスゲノムを複製、または転写・翻訳する。この DMVs は宿主由来の小胞体膜から形成されること (Ke`vin Knoops et al. PLoS Biol, Vol.6 (9) e226, 2008)、小胞体の内部環境の変化が DMVs 形成に影響を与えることが報告されている (Ke`vin Knoops et al. J.Virol, 833-46, 2010)。

申請者はエンドソーム内の分解酵素が pH 依存性に作用するため、pH を制御する Ca イオンで活性化されるカルシニューリン蛋白質に着目し、そのシグナルを阻害するサイクロスポリン A (CsA) が FIPV 複製阻害効果をもつと予測した。この仮説に従い、FIPV 感染培養細胞を CsA 処理すると薬用量依存的にウイルス複製阻害効果が認められた (Tanaka et al. Vet. Res. 2012, 30; 43(1):41)。また、FIP 自然発症猫において CsA 治療が寛解作用を持つことも明らかにした (Tanaka et al. Vet. Rec. Case Rep. 2015, 3: e000134)。しかし、FIP 自然発症ネコに対する CsA 治療で、多くの個体は寛解を示すが、個体によって無効であり、副作用として下痢・嘔吐を起こすものもある。さらに FIPV が遺伝子変異の生じやすいウイルスであることから複数の治療薬の開発が緊急課題となっている。

2. 研究の目的

本研究は申請者が発見した“Ca 拮抗薬による FIPV 複製阻害作用”の機序を解明するために研究を行う。具体的にはウイルス複製時に必要とされる Ca 依存性小胞輸送機構に関わる因子を同定し、その作用機序を解析する。さらにその結果から詳細なウイルス複製機構を明らかにし、予防薬・治療薬の開発基盤を構築することが最終的な目的である。そのために以下の研究をおこなう。

ウイルス複製阻害作用がウイルス増殖のどのステップの阻害によるものかを明らかにする (ウイルス吸着阻害、細胞内ウイルス遺伝子複製阻害、出芽阻害など)。

各 Ca 拮抗薬の標的 Ca チャンネル蛋白質がウイルス複製に与える影響を解析する。

Ca チャンネル蛋白質に結合するウイルス側因子の同定を行う。

3. 研究の方法

イオノフォア抗生剤存在下での TCID50

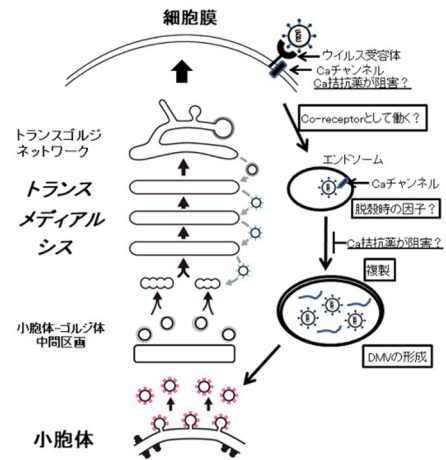
(1) Ca 拮抗薬によるウイルス複製阻害作用がウイルス増殖のどのステップの阻害によるものかを明らかにする(ウイルス吸着阻害, 細胞内ウイルス遺伝子複製阻害, 出芽阻害など: 右図参照).

ウイルス吸着阻害効果の解析: 吸着の段階における阻害効果を解析するため, Ca 拮抗薬存在下, 細胞融合が起こらない 4 条件で蛍光標識ウイルスをマクロファージに感染後, 細胞表面での吸着効率を共焦点レーザー顕微鏡で解析・評価する.

細胞内ウイルス遺伝子複製阻害効率の解析: 感染細胞

を用いて Ca 拮抗薬存在下と非存在下でのウイルス遺伝子増幅効率を定量 PCR 法で比較解析する.

ウイルス出芽様式の変化を調べる: 細胞内オルガネラ(小胞体, ゴルジ装置, ミトコンドリア, 細胞質など)に対する特異抗体を用いて Ca 拮抗薬存在下と非存在下でウイルス粒子の局在変化を共焦点レーザー顕微鏡で調べる.



(2) Ca チャンネル蛋白質がウイルス複製に与える影響を解析する.

阻害作用のある Ca 拮抗薬の各標的 Ca チャンネル遺伝子 (TPC1 や Cav1.1 など) をクローニングし, FIPV 感受性細胞での遺伝子強制発現とそれによるウイルス増幅効率への影響を定量 PCR 法で解析する.

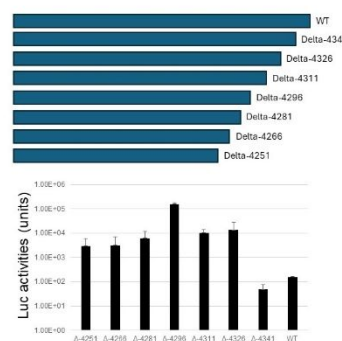
ウイルス増幅に関する各 Ca チャンネル遺伝子をノックアウト (KO) あるいはノックダウン (KD) し, 各細胞におけるウイルス遺伝子の複製効率を解析・評価する.

で明らかとなった標的 Ca チャンネル蛋白質と各ウイルス蛋白質との結合性を共免疫沈降法, プルダウンアッセイ法, FRET 法などにより解析し, 標的 Ca チャンネル蛋白質に応答するウイルス蛋白質の同定とその作用機序を考察する.

4. 研究成果

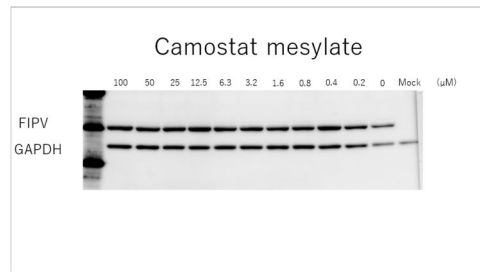
Ca 拮抗薬によるウイルス複製阻害作用がウイルス増殖のどのステップの阻害によるものかを明らかにするために FIPV スパイク (S) 蛋白質を外被蛋白質に持ち, レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を有する組換えレンチウイルスの作成を試みた. この組換えウイルスを FIPV 複製感受性細胞に感染させルシフェラーゼ解析を行った. しかし S 蛋白質の全長を有するレンチウイルスのルシフェラーゼ活性は, ほぼ検出できなかった. このため, カルボキシル末端からアミノ酸を 5 残基ずつ欠失させた S 蛋白質を有する新たな組換えレンチウイルスを作成し,

Luciferase assay of deletion mutants of FIPV-79-1146 strain S protein



ルシフェラーゼ解析を行った結果, 細胞膜貫通領域近くまで欠失させた変異 S 蛋白質 (4296) を有するものが最も活性が高かった. Ca チャンネル拮抗薬存在下でこの S 変異体組換えレンチウイルスを感染させ各拮抗薬の FIPV 複製阻害効果を比較解析した. 結果, L 型 Ca チャンネル拮抗薬であるベラパミル, アムロジピンにおいて FIPV 複製阻害効果が認められた.

次いでウイルスの吸着後の細胞膜表面における S 蛋白の開裂を阻害する目的で蛋白分解阻害剤であるキャモstattメシレート存在下で FIPV を感染させ、ウェスタンブロット法による細胞内ウイルス蛋白量を解析した。しかし、キャモstattメシレートによるウイルス S 蛋白の開裂阻害効果は全く認められなかった。これは SARS コロナウイルス 2 型で知られるキャモstattメシレートの S 蛋白開裂阻害効果と異なり、FIPV の S 蛋白は細胞膜表面で開裂しないことを意味する。



一方、エンドソームに局在するカテプシンは、エンドソーム内酸性条件下で活性を有し、FIPV の S 蛋白を開裂することで膜融合を誘導することが報告されている。このため、エンドソームからのウイルスゲノムの放出(脱殻)を阻止することを目的とし、エンドソーム内カテプシンの活性阻害をイオノフォア抗菌薬によって行った。イオノフォア抗菌薬は何れもエンドソームへの Ca イオンの取り込みを阻害し、エンドソーム内の pH をアルカリ性に上昇させる作用がある。この結果、バリノマイシン、ナイジェリシン、サリノマイシンを低濃度で培養液中に添加することで、FIPV の複製を完全に阻害した。逆に細胞内への Ca イオンの取り込みを促進させる目的でイオノマイシンを添加したところ、イオノフォア抗菌薬添加時と同じく FIPV の複製を完全に阻害した。この結果は、FIPV 脱殻時にエンドソーム内の至適 pH と至適 Ca イオン濃度が要求されることを意味する。

	コントロール TCID50/mL	阻害薬存在下
Salinomycin (12.5 μM)	550,000	検出限界以下
Valinomycin (25 μM)	550,000	検出限界以下
Nigericin (6.3 μM)	440,000	検出限界以下

さらに FIPV のエンドソームに取り込まれてからの動態に着目し、エンドソームに発現する Ca チャンネル、Two pore channel (TPC1 および TPC2) のクローニングを行った。これらの遺伝子を細胞に強制発現させ FIPV 感染後、定量 PCR 解析とウェスタンブロット解析によってウイルス複製量を比較した。この結果、TPC の発現下ではウイルス複製阻害効果が認められた。また、FIPV 感受性ネコ細胞培養株 (fcwf-4) を用いてこれらの遺伝子を CRISPR-Cas9 系によりノックアウトしてもウイルス複製が抑制された。これらの結果から、ウイルス脱殻時においてエンドソーム内の至適カルシウム濃度が重要であることがわかった。

今後、標的 Ca チャンネル蛋白質と各ウイルス蛋白質との結合性を共免疫沈降法、プルダウンアッセイ法、FRET 法などにより解析し、標的 Ca チャンネル蛋白質に応答するウイルス蛋白質の同定とその作用機序を考察する。将来的に、TPC を制御する因子を標的とする抗ウイルス化合物をスクリーニングすることにより、FIP 感染猫の治療への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Yoshikazu, Tanabe Eri, Nonaka Yuki, Uemura Mitsuki, Tajima Tsuyoshi, Ochiai Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Ionophore Antibiotics Inhibit Type II Feline Coronavirus Proliferation In Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1734 ~ 1734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14081734	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 -

1. 著者名 Shimakawa Kei, Ochiai Kazuhiko, Hirose Sachi, Tanabe Eri, Michishita Masaki, Sakaue Motoharu, Yoshikawa Yasunaga, Morimatsu Masami, Tajima Tsuyoshi, Watanabe Masami, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Canine Mammary Tumor Cell Lines Derived from Metastatic Foci Show Increased RAD51 Expression but Diminished Radioresistance via p21 Inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 703 ~ 703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci9120703	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 -

1. 著者名 NISHIJIMA Rui, ENDO Takuro, GANKHUYAG Enkhjavkhan, KHIN Shwe Thiri Maung Maung, JAFAR Sheikhy Mohammad, SHINOHARA Yuta, TANAKA Yoshikazu, SAWAKAMI Kazumi, YOHDA Masafumi, FURUYA Tetsuya	4. 巻 85
2. 論文標題 Detection of anti-feline infectious peritonitis virus activity of a Chinese herb extract using geneLEAD VIII, a fully automated nucleic acid extraction/quantitative PCR testing system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 443 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0185	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 ドラッグリポジショニングを利用した猫伝染性腹膜炎の治療戦略
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 FIP（猫伝染性腹膜炎）の治療戦略
3. 学会等名 動物臨床医学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田辺愛理
2. 発表標題 イオノフォア抗生剤によるネココロナウイルス増殖阻害効果の検討
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究分担者	落合 和彦 (OCHIAI KAZUHIKO) (30550488)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	小熊 圭祐 (OGUMA KEISUKE) (50436804)	日本大学・生物資源科学部・准教授 (32665)	
研究分担者	佐々木 崇 (SASAKI TAKASHI) (50723897)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	古谷 哲也 (FURUYA TETSUYA) (60647676)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	手嶋 隆洋 (TESHIMA TAKAHIRO) (80610708)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関