

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08510

研究課題名(和文)新型コロナウイルス感染モデルの構築と病態解析

研究課題名(英文) The establishment of suitable model for SARS-CoV-2 infection and the analysis of their pathogenicity

研究代表者

大道寺 智(Daidoji, Tomo)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：80432433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではコロナウイルス(SARS-CoV-2、季節性コロナウイルス)について、細胞に対するウイルスレセプター遺伝子導入のための系を確立した。さらに感染細胞におけるウイルス増殖評価法を確立し、その後感染動態の解析を行った。ウイルス増殖の程度は用いた複数の細胞により異なっており、細胞ごとのウイルス感受性が異なっていた。またそれには細胞側の因子が深くかかわっていることが考えられた。また放出されるウイルス粒子について、ウイルスゲノムコピー数と感染性のウイルス粒子数との関係性を評価し、それぞれの細胞におけるウイルス粒子形成の効率の違いを現在解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染症は大きな社会問題を起こした。加えて以前よりヒトの間で流行を繰り返しているのにも関わらずこれまであまり着目されてこなかった季節性のコロナウイルス感染症も大きな着目を浴びることとなった。これらのコロナウイルス感染症について、その予防法や治療法については必ずしも十分とはいえ、そのためにはコロナウイルスの感染動態についてよく知る必要がある。本研究で得られた個々の細胞でのウイルス増殖の違いを示す結果は、ウイルス増殖が宿主との相互作用の結果として規定されることを示しており、本研究で得られた結果は新たな治療・予防法確立のための新たな知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a gene transfer system for viral receptors of coronavirus (SARS-CoV-2, seasonal coronavirus) into cells. In addition, we established a method to evaluate viral replication of the coronaviruses in an infectious assay and analyzed their viral growth over time. Their viral growth differed among cell lines used in the assay. These results suggest that the differences in viral growth in individual cells is associated with host factor (s) in each cell line. Now, we are assessing viral packaging efficiency within individual cells by examining the relationship between viral titers and viral genome copies.

研究分野：ウイルス学

キーワード：新型コロナウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コロナウイルスにはヒトに季節性の風邪を起こすもの(HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1)から SARS(重症急性呼吸器症候群)、MERS(中東呼吸器症候群)、COVID-19(新型コロナウイルス感染症)の原因となるもの(SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2)まで様々なウイルス種が存在する。風邪コロナウイルスについては、古くから存在していたと考えられているが、風邪の原因として認識されるようになったのはごく最近であり、SARS の発生は2003年、MERS は2012年とコロナウイルス研究の歴史は比較的浅い。そのため、病態解析に用いる適切な感染モデルが少ないのが実情である。コロナウイルスの病態解析のためには適切な細胞株を用いた試験が求められる。

2. 研究の目的

新型コロナウイルス感染症は新興感染症であるが故に有効な治療法に限られるのが現状である。敗血症、血栓症等が続発するその病態は特異的であり、詳細な病態解析は喫緊の課題である。本研究の目的は新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対する新たな感染モデルを作成し、同ウイルスの感染機構・動態を詳細に解析することである。

3. 研究の方法

(1) SARS-CoV-2 および季節性コロナウイルスのレセプター遺伝子、感染に必要な宿主因子の遺伝子クローニングを行いこれらのウイルスレセプター遺伝子を含むウイルスベクターの構築を行った。

(2) 感染実験に用いるウイルスを大量に準備するため、SARS-CoV-2、OC43、229E について高力価のウイルスを得る方法について検討を行った。

(3) SARS-CoV-2 および季節性コロナウイルス(OC43、229E)の検出系の確立を行った。感染細胞における特異抗体でのウイルス抗原の検出とウイルス感染細胞から放出されるウイルス粒子の検出について、各実験系での適切な条件を決定した。

(4) 複数の細胞株を用いて季節性コロナウイルス(OC43、229E)を中心として感染実験を行い、その感染性・増殖性について評価を行った。

4. 研究成果

(1) コロナウイルスのレセプター遺伝子、感染に必要な宿主因子の遺伝子クローニングを行った。特に SARS-CoV-2 のレセプターである ACE2、229E のレセプターのアミノペプチダーゼ N(APN)に加え、感染に必要な分子である TMPRSS2 について遺伝子クローニングを行った。またこれらのウイルスレセプター遺伝子を含むウイルスベクターの構築を行った。

(2) 感染実験に用いるウイルスを準備するために同一ロットのウイルスを大量に準備する必要があり、各ウイルス株で高濃度のウイルス液を得る方法について検討を行った。SARS-CoV-2 の増殖に用いる細胞について、武漢株のみならず変異株(アルファ株・デルタ株)においてもプロテアーゼを発現した VeroE6(VeroE6/TMPRSS2)を用いることで高濃度のウイルス液を回収することができた。OC43 については HCT-8 細胞で力価の高いウイルスを得ることができたが、VeroE6/TMPRSS2 もウイルス増殖細胞として用いることができることがわかった。229E では MRC-5 細胞が有用であった。

(3) ウシコロナウイルスをウサギに免疫して作成したポリクローナル抗体を用いて感染細胞におけるコロナウイルスの抗原検出を行ったところ、季節性コロナウイルスのうち OC43 は検出可能であったが、229E については上記ポリクローナル抗体では検出できなかった。また SARS-CoV-2 についても同様に検出できず、これらについては市販の抗体を使用せざるを得なかった。また感染後の培養上清中のウイルス粒子の測定について、SARS-CoV-2、季節性コロナウイルス(OC43、229E)のそれぞれで特異的プライマーを作成し、プローブ法によるリアルタイム PCR にて検出する条件の確立を行った。

(4) 複数の細胞株を用いて季節性コロナウイルス(OC43、229E)を中心として感染実験を行った。用いた複数の細胞株に対し、ウイルス接種を行い接種後の培養上清中に放出されるウイルス粒子について経時的に評価を行った。リアルタイム PCR 法による実験系にて定量を行ったところ、用いた細胞によって培養上清中に放出されるウイルス粒子数が異なっていた。特に感染中期・後期においては、放出量の差が顕著であった。また上記同様に、ウイルス接種後の培養上清について経時的にウイルス感染価を定量しており、リアルタイム PCR 法で定量したウイルスゲノムコ

ピー数との相関性を評価することでウイルス粒子形成効率の細胞ごとの違いを評価している。一方で細胞側にも着目し、細胞によってウイルス増殖量が異なる理由について、それらに關与する宿主因子について現在調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tanino Yoko, Nishioka Keisuke, Yamamoto Chie, Watanabe Yohei, Daidoji Tomo, Kawamoto Masataka, Uda Sayaka, Kirito Shoko, Nakagawa Yuta, Kasamatsu Yu, Kawahara Yoshiyuki, Sakai Yuri, Nobori Shuji, Inaba Tohru, Ota Bon, Fujita Naohisa, Hoshino Atsushi, Nukui Yoko, Nakaya Takaaki	4. 巻 Volume 17
2. 論文標題 Emergence of SARS-CoV-2 with Dual-Drug Resistant Mutations During a Long-Term Infection in a Kidney Transplant Recipient	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 531 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S438915	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 Soliman Rofaida Mostafa, Nishioka Keisuke, Daidoji Tomo, Noyori Osamu, Nakaya Takaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Chimeric Newcastle Disease Virus Vectors Expressing Human IFN- Mediate Target Immune Responses and Enable Multifaceted Treatments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 455 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11020455	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 該当する

1. 著者名 Arai Yasuha, Yamanaka Itaru, Okamoto Toru, Isobe Ayana, Nakai Naomi, Kamimura Naoko, Suzuki Tatsuya, Daidoji Tomo, Ono Takao, Nakaya Takaaki, Matsumoto Kazuhiko, Okuzaki Daisuke, Watanabe Yohei	4. 巻 26
2. 論文標題 Stimulation of interferon- responses by aberrant SARS-CoV-2 small viral RNAs acting as retinoic acid-inducible gene-1 agonists	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105742 ~ 105742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105742	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 Isobe Ayana, Arai Yasuha, Kuroda Daisuke, Okumura Nobuaki, Ono Takao, Ushiba Shota, Nakakita Shin-ichi, Daidoji Tomo, Suzuki Yasuo, Nakaya Takaaki, Matsumoto Kazuhiko, Watanabe Yohei	4. 巻 5
2. 論文標題 ACE2 N-glycosylation modulates interactions with SARS-CoV-2 spike protein in a site-specific manner	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1188-1188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04170-6	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 Hirose Ryohei, Itoh Yoshito, Ikegaya Hiroshi, Miyazaki Hajime, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Bandou Risa, Daidoji Tomo, Nakaya Takaaki	4. 巻 28
2. 論文標題 Differences in environmental stability among SARS-CoV-2 variants of concern: both omicron BA.1 and BA.2 have higher stability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Microbiology and Infection	6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmi.2022.05.020	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 Bandou Risa, Hirose Ryohei, Nakaya Takaaki, Miyazaki Hajime, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Daidoji Tomo, Itoh Yoshito, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Higher Viral Stability and Ethanol Resistance of Avian Influenza A(H5N1) Virus on Human Skin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 639 ~ 649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2803.211752	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 Nishioka Keisuke, Daidoji Tomo, Nakaya Takaaki	4. 巻 309
2. 論文標題 Downregulation of calcium-regulated heat stable protein 1 expression by low-temperature stimulation causes reduction of interferon- expression and sensitivity to influenza viral infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198659 ~ 198659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2021.198659	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 -

1. 著者名 Hirose Ryohei, Itoh Yoshito, Ikegaya Hiroshi, Miyazaki Hajime, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Bandou Risa, Daidoji Tomo, Nakaya Takaaki	4. 巻 55
2. 論文標題 Evaluation of the Residual Disinfection Effects of Commonly Used Skin Disinfectants against Viruses: An Innovative Contact Transmission Control Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 16044 ~ 16055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.1c05296	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 -

1. 著者名 Hirose Ryohei, Miyazaki Hajime, Bandou Risa, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Daidoji Tomo, Itoh Yoshito, Nakaya Takaaki	4. 巻 28
2. 論文標題 Stability of SARS-CoV-2 and influenza virus varies across different paper types	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 252 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.11.006	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 -

1. 著者名 Daidoji Tomo, Morales Vargas Ronald Enrique, Hagiwara Katsuro, Arai Yasuha, Watanabe Yohei, Nishioka Keisuke, Murakoshi Fumi, Garan Kotaro, Sadakane Hiroki, Nakaya Takaaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Development of genus-specific universal primers for the detection of flaviviruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12985-021-01646-5	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 該当する

1. 著者名 Hirose Ryohei, Watanabe Naoto, Naito Yuji, Hashimoto Hikaru, Sugino Satoshi, Yoshida Takuma, Bandou Risa, Daidoji Tomo, Inoue Ken, Dohi Osamu, Yoshida Naohisa, Nakaya Takaaki, Itoh Yoshito	4. 巻 124
2. 論文標題 Comparison of sodium alginate-based and sodium hyaluronate-based submucosal injection materials based on rheological analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 104816 ~ 104816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2021.104816	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 -

1. 著者名 Elgendy Emad Mohamed, Arai Yasuha, Kawashita Norihito, Isobe Ayana, Daidoji Tomo, Ibrahim Madiha Salah, Ono Takao, Takagi Tatsuya, Nakaya Takaaki, Matsumoto Kazuhiko, Watanabe Yohei	4. 巻 102
2. 論文標題 Double mutations in the H9N2 avian influenza virus PB2 gene act cooperatively to increase viral host adaptation and replication for human infections	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001612	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 -

1. 著者名 Hirose Ryohei, Watanabe Naoto, Bandou Risa, Yoshida Takuma, Daidoji Tomo, Naito Yuji, Itoh Yoshito, Nakaya Takaaki	4. 巻 6
2. 論文標題 A Cytopathic Effect-Based Tissue Culture Method for HCoV-OC43 Titration Using TMPRSS2-Expressing VeroE6 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00159-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00159-21	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 Hirose Ryohei, Bandou Risa, Ikegaya Hiroshi, Watanabe Naoto, Yoshida Takuma, Daidoji Tomo, Naito Yuji, Itoh Yoshito, Nakaya Takaaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Disinfectant effectiveness against SARS-CoV-2 and influenza viruses present on human skin: model-based evaluation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Microbiology and Infection	6. 最初と最後の頁 1042.e1 ~ 1042.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmi.2021.04.009	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大田寺 智、定金 広樹、坂東 李紗、廣瀬 亮平、加 覧 浩太郎、荒井 泰葉、渡邊 洋平、中屋 隆明
2. 発表標題 鳥インフルエンザウイルスのエタノール存在下での感染性残存の評価
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomo Daidoji, Hiroki Sadakane, Kotaro Garan, Yasuha Arai, Yohei Watanabe, Tatsufumi Usui, and Takaaki Nakaya
2. 発表標題 Hemagglutinin acid stability and infectivity of H5N6/H5N8 avian influenza viruses
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒井 泰葉、Elgendy Emad、川下理日人、磯邊 綾菜、大道寺 智、中屋 隆明、渡邊 洋平
2. 発表標題 近年中国で優勢に流行するH9N2亜型鳥インフルエンザウイルスのPB2遺伝子に選択された同時変異群はヒト適応性を高く変化させている
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大道寺 智、定金 広樹、加覧 浩太郎、荒井 泰葉、渡邊 洋平、笛吹 達史、中屋 隆明
2. 発表標題 ヒト呼吸器上皮細胞を用いたH5N6/H5N8ウイルスの感染動態の解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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	西岡 敬介 (Nishioka Keisuke) (50790713)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

	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 協力者	廣瀬 亮平 (Ryohei Hirose)	京都府立医科大学 (24303)	

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
---------	---------