

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：82610
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：平成22年～平成24年
 課題番号：22390094
 研究課題名（和文）SARS-CoVによる呼吸器系重症化機構の解明

研究課題名（英文）Mode of severe respiratory failure by SARS-CoV

研究代表者

石坂幸人（ISHIZAKA YUKIHITO）

国立国際医療研究センター・難治性疾患研究部・部長

研究者番号：90184514

研究成果の概要（和文）：

重症急性呼吸器症候群-コロナウイルス(SARS-CoV)の呼吸器系重症化機序を解明するため、同ウイルスによって惹起される細胞内シグナルを解析した。SARS-CoV スパイク(S)蛋白質を発現するシュードタイプウイルスをSARS-CoVの受容体である2型アンギオテンシン変換酵素(ACE2)発現細胞に感染させると、ムチン5AC遺伝子やTGF-β、plasminogen activator inhibitor-1等の発現が誘導される傾向を認めた。一方、ACE2を受容体として感染性を示すが、弱毒ウイルスであるNL63-CoVのS蛋白質では、この様な現象は認められなかった。この現象を誘導するACE2細胞内ドメインの責任部位と関与する宿主側因子を同定することで呼吸系重症化機序の理解が深まるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：

Mode of severe respiratory symptoms induced by severe acute respiratory syndrome-corona virus (SARS-CoV) was investigated. When a psuedotype virus that expressed spike protein of SARS-CoV was infected to cells with angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), a receptor of the virus, cellular signals involving *MUC5AC*, *TGF-β* and *plasminogen activator inhibitor-1* were evoked. In contrast, a psuedotype virus that expressed spike protein of NL63-CoV, which was identified as a less-virulent CoV and was proved to infect cells via ACE2, did not. Next issue is to identify the intracellular domain of ACE2 and cellular proteins, which are responsible for the SARS-CoV induced gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
23年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
24年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：SARS-CoV、細胞内シグナル、炎症、PAI-1

1. 研究開始当初の背景

2003年にアウトブレイクを認めたSARS-CoV感染症は患者の約10%が死の転機を取る重篤

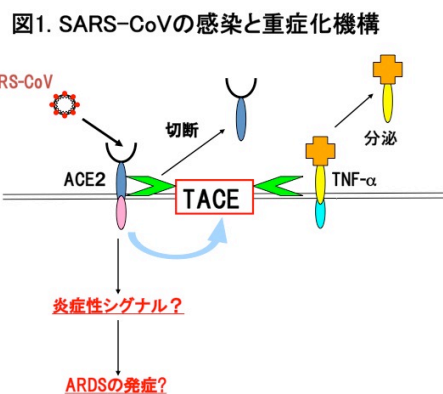
な呼吸器系症状を誘発した。その機序としてKubaらは感染に伴ってSARS-CoVの受容体である2型アンギオテンシン変換酵素(ACE2)

の発現が低下することを報告した(Nat. Med. 11: 875, 2005)。ACE2 はアンギオテンシン II(Ang II)の C 末アミノ酸を切断し、その結果生成される Ang (1-7)が Ang II 作用に拮抗することで、組織炎症状態の均衡が保たれる。即ち、SARS-CoV による ACE2 の発現低下が、Ang II 依存的な炎症状態を増強させ、この不均衡が呼吸窮迫症状の誘発原因となっていることが提唱された。

申請者は SARS-CoV による ACE2 発現低下に ACE2 の細胞内ドメインから惹起される細胞内シグナルが必要である事を明らかにし(PNAS 105:7809, 2008)、同時にこの現象が感染機序や重症化にも関与する可能性を見出した。そこで本課題では ACE2 細胞内ドメインによるシグナル伝達の役割を明らかにし、SARS-CoV の病態を理解することを目的として開始した。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの解析で、SARS-CoV のリガンドであるスパイク蛋白質(以下 SARS-S 蛋白質)が SARS-CoV の受容体である 2 型アンギオテンシン転換酵素(以下 ACE2)を介して細胞内シグナルを惹起することを見出した(Haga *et al.* PNAS 105:7809, 2008)。即ち、SARS-S が ACE2 に作用すると、宿主側因子である TNF- α 変換酵素(TACE:TNF- α converting enzyme)が活性化され、活性型 TACE によって ACE2 の細胞外ドメインは切断され、細胞外に放出される(シェディング)(図 1)。



TACE の活性化は同時に、TNF- α を膜上から遊離させ、組織傷害を誘導する。一方、病原性の弱いコロナウイルスとして 2004 年に同定され、その後 ACE2 を受容体として感染することが報告された NL63-CoV 由来スパイク蛋白質は、このような現象を誘導しなかった。阻害剤を用いた解析から、TACE の活性化による ACE2 のシェディングにはある種の Protein kinase C が関与する可能性も示唆されており、ACE2 を介して誘導される細胞シグナルに関

する情報は、SARS-CoV による重症化機序を考える上での重要な手がかりになると考えられた。

以上を背景に本研究では、SARS-S と NL63-S で誘発される細胞内シグナルの違いを明らかにすることを目的とし、特に SARS-S による細胞内シグナルの誘発に関与する ACE2 の細胞内ドメインに着目して理解することを計画した。

3. 研究の方法

本研究助成の申請時点では以下に示す、3つの柱を設定した。即ち、

- SARS-S/ACE2 により誘導される遺伝子発現の理解
- SARS-S 作用時に ACE2 細胞内ドメインに結合する蛋白質群の同定
- ACE2 細胞内ドメインによる遺伝子発現誘導機序の解明である。

(1)細胞株

ACE2 を恒常的に発現する肺組織由来細胞株は少なく、強制的に発現させた細胞株を用いた解析を主体として行なった。細胞株として、腎臓組織由来 HEK293T 細胞、ヒト肺癌に由来シムチンを産生する NCI-H292 細胞また、A-549 細胞株の三種類を使用した。これらの細胞に ACE2 発現プラスミド DNA を導入し、薬剤選択後、まず、安定的に ACE2 を発現する細胞株の樹立を試みた。一方、実験の後半では ACE2 を一過的に発現させた細胞を用いて解析した。即ち、ACE2 発現プラスミド DNA を導入した翌日、トリプシンで剥離し、12 または 24 ウェルに蒔き直し、以下に示す方法で調整した SARS-S 蛋白質、または、ウイルスを作用させた。

(2)SARS-S の作用

SARS-S 蛋白質は、His タグ付き組み換え蛋白質として大腸菌で発現後、ニッケルビーズを用いて精製した。部分精製した蛋白質と標準 bovine serum albumin (BSA)を同時に SDS-PAGE で泳動し、ゲル染色後、BSA のシグナル強度と比較することで、精製蛋白質の濃度を把握した。

(3)レンチウイルスの作成

レンチウイルスは Invitrogen 社製、virapower システムで作成した(パイオセーフティレベル 2)。ウイルスを作成する際、SARS-S または、NL63-S 蛋白質を発現するプラスミド DNA を一緒に導入し、シェードタイプウイルスを作成した(以降、それぞれ、SARS-S ウイルスと NL63-S ウイルス)。ウイルス価は p24 を ELISA で測定することで把握し

た。

(4) MUC5AC 遺伝子プロモーター活性評価
ムチンは呼吸器系の重症化因子として位置づけられている。また、同遺伝子の発現が、細部内炎症シグナルとリンクして稼働することが報告されている。そこで、SARS-S による MUC5AC 遺伝子の発現誘導機序について解析した。同遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を挿入したプラスミド DNA を導入し、ウイルス感染数時間後に細胞を回収し、Luc アッセイを行なった。

(5) 定量的遺伝子発現の検出

ACE2 発現プラスミド DNA を導入した A-549 細胞に対して、SARS-S ウイルスまたは、蛋白質を作用させた後の *TGF-β*、*interleukin-8* (*IL-8*)、*MUC5AC*、及び、*plasminogen activator inhibitor-1* (*PAI-1*) 遺伝子の発現を解析した。

ウイルス感染実験： 20-100 ng/mL の p24 に相当するウイルスを培養液中に添加した。これらの濃度でウイルスを使用した場合の MOI (multiplicity of infection) は 1-5 であった。ウイルスを感染させ、2 または 4 時間後に細胞を回収した。

蛋白質添加実験： SARS-S または NL63-S 蛋白質を添加後、2 または 4 時間目に細胞を回収し、RNeasy (Inviteogen 社) を用いて、RNA を抽出した。DNase 処理後、Omniscript で cDNA を合成し、SYBR Premix EX Taq (TAKARA 社) を用いて cDNA を増幅した。各遺伝子について合成した qRT-PCR 用プライマーを用いて PCR 増幅した。検出方法としては、アガロース電気泳動後、増幅バンドを染色にて検出する一方、Bio-Rad 社製リアルタイム PCR を用いて増幅バンドのシグナル強度を測定した。内部対照としては β -actin の発現量を同様の方法で測定した。

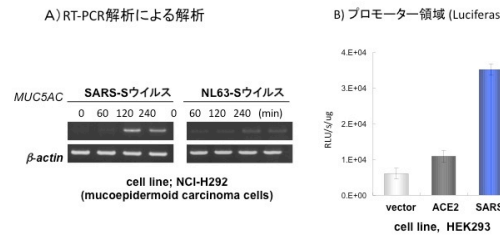
4. 研究成果

(1) ACE2 発現細胞の樹立と SARS-S 作用

サル腎臓組織由来 Vero 細胞は ACE2 を発現し、ウイルスを同定する上でも重要な細胞株として機能した。しかし、SARS-CoV 感染による病態を考える上では、ヒト肺組織に由来する細胞を使用することが要件であると考えられる。そのため、まず、肺癌由来 NCI-H292 細胞及び HEK293T 細胞を用いて、恒常的に ACE2 を発現する細胞株を樹立した。この細胞に p24 として 100 ng/mL の濃度で SARS-S ウイルス、または、NL63-S ウイルスを感染させた後、*MUC5AC* mRNA の発現を解析した。その結果、SARS-S ウイルスを感染させた後、2 時間から同遺伝子の発現が誘導された。一方、

NL63-S ウイルスでは、遺伝子発現誘導は検出されなかった (図 2、左図)。

図2. SARS-Sウイルス感染により MUC5AC mRNAの発現も誘導される

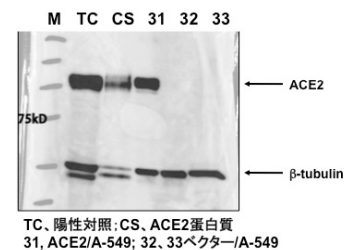


次に、HEK293T 細胞を用いて *MUC5AC* 遺伝子プロモーター活性を評価した。その結果、SARS-S ウイルスを作用させた群では、NL63-S ウイルスを作用させた群よりも強く Luc 活性の上昇を認めた。

以上の結果は、SARS-S は NL63-S と比較して、呼吸器系組織での炎症性反応をより強く、誘発する可能性を示唆するとともに、ACE2 の細胞ドメインが細胞側反応を惹起する可能性を考えさせた。また、*MUC5AC* 遺伝子プロモーターには、*TGF-β* によるシグナル伝達に関する Smad 結合部位が存在することも報告されている (Biochemical J. 377: 797, 2004)。即ち、ACE2 の細胞内ドメインと Smad 系転写因子がクロストークする可能性が強く考えられる。実際、SARS-CoV ヌクレオカプシド蛋白質によって、Smad3 機能変化や *TGF-β* シグナルが変化することが報告されている (J. Biol. Chem. 283:3272, 2008)。

以上の結果を背景に、細胞内蛋白質に関する詳細な解析を開始することにした。しかしこの時点から、ACE2 発現細胞株が安定的に維持できないことが明らかとなってきた。複数の実験者が独立して、ACE2 発現細胞の樹立を試みたが、いずれも細胞株を得ることはできなかった。そこで、導入効率の良い肺癌細胞株である A-549 細胞に、ACE2 を一過的に発現させ、以後の解析を行なうこととした。この細胞は、肺癌由来細胞株の中でも比較的効率良く、外来遺伝子を導入できる (図 3)。

図3. A-549細胞はACE2を一過的に発現できる

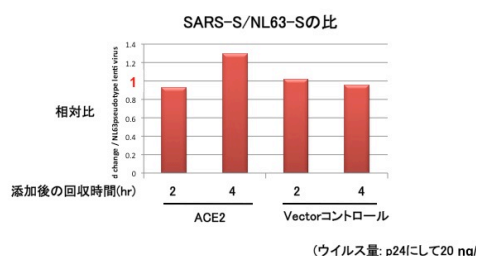


TC、陽性対照; CS、ACE2蛋白質
31、ACE2/A-549; 32、33ベクター/A-549

A-549/ACE2 細胞の培養液中に SARS-S ウイ

ルスと NL63-S ウイルスをそれぞれ添加し、MUC5AC、TGF- β 、PAI-1、IL-8 の発現を解析し、各遺伝子の発現から SARS-S/NL63-S の比を算出した。そして、2 者による細胞内シグナル誘導の程度を比較した。その結果、SARS-S ウイルスは、特に添加 4 時間後で、TGF- β 遺伝子の発現を誘導する傾向を認めた(図 4)。

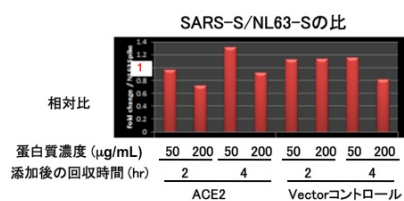
図4. SARS-SウイルスはTGF- β 遺伝子の発現をより強く発現誘導する



上述したヌクレオカプシド蛋白質による細胞内シグナル攪乱においても PAI-1 の発現が報告されている。PAI-1 遺伝子プロモーターにも Smad 系転写因子結合部位が報告されていることから TGF- β 関連転写因子の活性化が、複数の SARS-CoV タンパク質によって誘導される可能性が示唆される。

次に、同様の実験を SARS-S 及び NL63-S 蛋白質を用いて行なった(図 5)。

図5. SARS-S蛋白質はTGF- β 遺伝子の発現をより強く発現誘導する



ウイルス感染実験結果と同様に、50 $\mu\text{g/mL}$ で SARS-S 蛋白質を作用させた 4 時間後の A-549/ACE2 発現細胞で、TGF- β 発現が NL63-S 作用群よりも強く誘導される傾向を認めた。

今後の解析について: SARS-CoV 感染の標的臓器は肺組織であり、実験に使用する細胞株は肺癌由来細胞株であることが要件となる。しかし、安定的に ACE2 を発現する細胞株の準備できず、初期に設定した 3 つの柱を達成することはできなかった。特に、ACE2 発現細胞として一旦樹立できたと思われた NCI-H292 細胞において、実験の過程で ACE2 の発現が消失した事は予想外であり、その対応に多くの時間を費やすことになった。ACE2 発現細胞株を安定的に維持できなかった背景には、本研究の主題である ACE2 による細胞内炎症シグナルが関与している可能性も考えている。

今回の解析を通して、断片的ではあるが、SARS-S によって TGF- β の発現が誘導される可

能性が示唆された。微弱ながら MUC5AC や PAI-1 等の炎症性シグナルの誘導も観察されている。A-549 細胞株は外来性遺伝子を導入しやすい細胞株であるが、ACE2 発現プラスミド DNA 導入後の ACE2 発現陽性細胞を ACE2 抗体で作用させ、蛍光標識された抗体を反応させた後にセルソーターで解析すると、ACE2 陽性細胞は全体の約 1%に過ぎなかった。即ち、内在的に ACE2 を発現する細胞株を用いることができれば、SARS-S で惹起される細胞内変化をより明確に捉えることが可能になるものと思われる。

本実験の過程で、肺癌由来細胞株である Calu-3 が内在性 ACE2 を安定的に発現していることが報告された (PLoS ONE 5: e8729, 2010)。特に、Calu-3 細胞の親株から、限界希釈法でクローニングして樹立された 2B4 においても、ACE2 発現が認められ、この細胞株に SARS-CoV を感染させると NF- κB 、AP-1 及び、IRF3/7 遺伝子の発現が誘導されることが報告されている。現在、Calu-3 を用いた SARS-S ウイルス感染実験を準備中であり、これまでに得られた実験データの再現性の有無、及び、当初設定した 3 つの柱について、検証する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Fukushi M, Yoshinaka Y, Matsuoka Y, Hatakeyama S, Ishizaka Y, Kirikae T, Sasazuki S, Miyoshi-Akiyama T. Monitoring S protein maturation in the endoplasmic reticulum by calnexin is important for the infectivity of severe acute respiratory syndrome-coronavirus. *J. Virol.* 86(21): 11745-53, 2012.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等特記すべき事項無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石坂幸人 (国立国際医療研究センター)

研究者番号: 90184514

(2) 研究分担者: 該当無し。

(3) 連携研究者

嶋田耕育 (国立国際医療研究センター)

研究者番号: 50634185