

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08868

研究課題名(和文) コロナウイルスの細胞侵入経路の変化が自然免疫応答に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Innate immune responses induced by two coronavirus cell entry pathways

研究代表者

松山 州徳 (Matsuyama, Shutoku)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・室長

研究者番号：90373399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、コロナウイルスの細胞侵入がその後のウイルス増殖に及ぼす効果について検討した。ヒトコロナウイルスHCoV-229Eに加え、他のヒトコロナウイルス、HCoV-OC43、HCoV-HKU1も臨床分離ウイルスは細胞表面のTMPRSS2を利用して積極的に侵入することを報告した。これで我々の仮説「生体内ではヒトコロナウイルスはエンドソーム経路を避ける」ことが三種のウイルスで確認されたことになる。またエンドソーム経路を通らないウイルスを作るための、カテプシン解列部位変異ウイルスの作成について検討を行ってきたが、今のところカテプシン解列部位の特定に至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コロナウイルスの細胞侵入経路、細胞の抗ウイルス効果発現、ウイルスRNAの複製、及びそれらの阻害剤を研究することは、現在アウトブレイクを起こしている新型コロナウイルスを理解する上で、役立つところは大きい。本研究によって既に得られていた知見により、既存薬「シクレソニド」を抗コロナウイルス薬として利用できることが見いだされていた。現在、新型コロナウイルスの治療薬として臨床の場で用いられ、後ろ向きコホート研究が行われている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of coronavirus cell entry manner on subsequent virus growth. In addition to human coronavirus HCoV-229E, other human coronaviruses, HCoV-OC43 and HCoV-HKU1, were reported that their clinical isolates prefer the entry route using TMPRSS2 on the cell surface. This confirms our hypothesis that human coronaviruses evade the endosomal pathway in vivo. In addition, the identification of a cathepsin cleavage site in viral spike protein and generation of a mutant virus which only through endosomal pathway, to reveal the viral entry mechanism, were not yet successful.

研究分野：ウイルス学

キーワード：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

コロナウイルスはあらゆる哺乳類と鳥類に蔓延しており、それぞれの動物特有のウイルス種が存在する。50種以上のウイルスが報告されているが殆どの場合、宿主動物での病原性は低く、軽い風邪や下痢を引き起こす程度である。このような病原性の低いコロナウイルスが、稀に重症の急性疾患を引き起こすことがある。2002年に発生した重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)はコウモリからヒトへ、2012年に発見された中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)はラクダからヒトへ感染して重症化した。また1996年にはウシのコロナウイルスが小児に感染して重症の下痢を引き起こしており、Human Enteric Coronavirus (HECV-4408)と名付けられた。これらSARS-CoV、MERS-CoV、HECV-4408は他のコロナウイルスと同様、宿主動物では軽症である。しかし、ウイルス側あるいは宿主側の重症化のキッカケとなる因子を特定することは難しい。インフルエンザウイルスやHIVではウイルスの特定の蛋白の変異により病原性が変わることが報告されているが、コロナウイルスでは多くは解っていないのが現状である。どうやってコロナウイルスは宿主動物で低い病原性を維持しているのか、重症化に関わる宿主側の因子は何なのか、という疑問について、申請者は、「ウイルスの細胞侵入経路の違いが病原性に影響する」と仮定して研究をおこなう。細胞侵入経路が変わると、その後に起こる細胞の自然免疫応答やウイルス増殖に影響を及ぼす可能性が考えられるからである。

SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-229E、HCoV-NL63等のコロナウイルスは2通りの経路から細胞侵入することが報告されている。ウイルスはまず細胞表面のレセプター蛋白に結合し、続いて細胞のプロテアーゼに解裂を受けて活性化し、ウイルス膜と細胞膜を融合させ、感染が成立すると考えられている。利用するプロテアーゼの違いによってウイルスが通る侵入経路は異なる。細胞外のエラスターゼや細胞表面の膜貫通プロテアーゼTMPRSS2を利用する場合、細胞表面でウイルス膜と細胞膜が融合を開始し、細胞表面で侵入が成立する。一方、エンドソームのカテプシンを利用する場合、ウイルス膜はエンドソーム膜と融合し、後期エンドソームで侵入が成立する。どちらの経路を通るかは、細胞の種類やウイルスの変異によって異なる。プロテアーゼの阻害剤を用いることにより、それぞれの細胞侵入経路を抑えることができるので、ウイルスがどちらの経路を通して感染するのかを確認することができる。

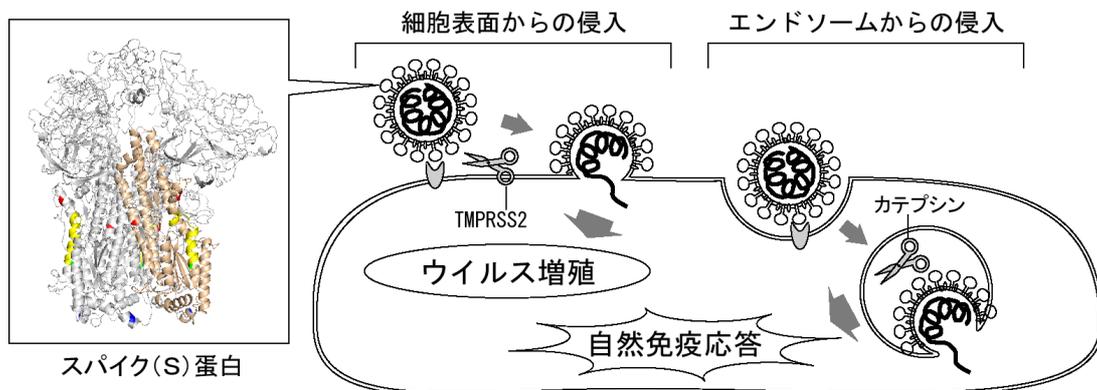


図 コロナウイルスのスパイク蛋白と細胞侵入経路

申請者の最近の研究では、ヒトのコロナウイルス HCoV-229E は、患者検体から分離された直後は、もっぱら TMPRSS2 を利用して細胞表面から侵入するが、培養細胞で継代することにより、エンドソーム経路を利用するように変異する。さらにこの変異ウイルスは、分化したヒト呼吸器上皮細胞(HBTE細胞)では感染力が著しく弱くなる。これらの結果は、生体内では HCoV-229E はエンドソーム経路を避けていることを示唆している。さらに侵入経路を決めるウイルスの変異はスパイク(S)蛋白全体に分散しており、特定の領域で決められているわけではなかった(文献1)。つまり、S蛋白上のどこかで変異が起これば、ウイルスは細胞侵入経路を変える可能性がある。また同様の結果は MERS-CoV や他のヒトコロナウイルスでも観察されている(未報告)。エンドソームは Toll like receptor (TLR) がウイルスを認識して自然免疫を誘導する主要器官なので、ウイルスが通過すると過剰な炎症反応を誘導するキッカケとなり、重症化に繋がる可能性がある。ウイルスが宿主に馴化するために、エンドソームを避けるように進化することは、理にかなっているといえる。

コロナウイルスに対する薬 一方、申請者はコロナウイルスの細胞侵入経路を解析する過程で、肺炎の既存薬であるプロテアーゼ阻害剤「カモスタット」が、SARS-CoV と MERS-CoV の感染を抑えることを発見した(文献9)。続いて米国の Zhou Y らは、マウスでの動物実験をおこない、カモスタットは SARS-CoV の感染を抑えるが、エンドソーム経路の阻害剤では感染を阻止できないことを示した(Antiviral Res. 2015)。さらに、東京大学(松田善衛教授)のグループは、

プロテアーゼ阻害剤「ナファモスタット」がカモスタットの1/10程度の濃度でMERS-CoVの感染を抑えることを発見した(文献2)。上記の論文はカモスタットやナファモスタットを、コロナウイルス感染症の治療薬として転用できる可能性を示している。本研究では、ウイルスの細胞侵入機構の解析と同時に、抗ウイルス薬の作用機序の解析も行う。MERS-CoVの感染を抑える薬は十数種類が報告されているが、多くは作用機序が不明である。候補の薬の中からウイルスの細胞侵入過程を阻害するものを選び出し、更に詳しく作用機序を解析したい。

2. 研究の目的

コロナウイルスはあらゆる動物に蔓延しており、多くの場合、病原性は低い。しかしSARSやMERS コロナウイルスのように、動物種を越えてヒトに感染した場合、稀に重症の急性疾患を引き起こすことがある。重症化のメカニズムは不明である。コロナウイルスは2通りの経路(細胞表面とエンドソーム)から細胞侵入するが、申請者は、「ウイルスの細胞侵入経路の違いが病原性に影響する」と仮定して研究をおこなう。侵入経路が変わると、細胞の自然免疫応答やウイルス増殖に影響する可能性が考えられるからである。プロテアーゼ阻害剤により、それぞれの経路を制限したり、リバーシジェネティクス技術により一方の経路のみを通るウイルスを作成することにより、ウイルスの細胞侵入経路の違いが自然免疫応答に及ぼす影響を解析する。

3. 研究の方法

4種類の鼻風邪コロナウイルス(229E, NL63, HKU1, OC43)と2種類の肺炎コロナウイルス(MERS, SARS)を感染実験に用いる。プロテアーゼ阻害剤により2通りの細胞侵入経路(細胞表面とエンドソーム)を一方に制限した場合に起こる、「ウイルス増殖の違い」や「自然免疫応答の違い」について解析をおこなう。またリバーシジェネティクス技術でスパイク(S)蛋白に変異を導入したウイルスを用い、自然免疫応答に影響するウイルス側の部位を特定し、S蛋白の構造と病原性との関係を考察する。同時に、既知の薬の中からコロナウイルスの細胞侵入を阻害するものを選び、作用機序を明らかにする

4. 研究成果

本研究においては、コロナウイルスの細胞侵入がその後のウイルス増殖に及ぼす効果について検討した。ヒトコロナウイルス HCoV-229E に加え、他のヒトコロナウイルス、HCoV-OC43、HCoV-HKU1 も臨床分離ウイルスは細胞表面の TMPRSS2 を利用して積極的に侵入することを報告した。これで我々の仮説「生体内ではヒトコロナウイルスはエンドソーム経路を避ける」ことが3種類のウイルスで確認されたことになる。またエンドソーム経路を通らないウイルスを作るための、カテプシン解列部位変異ウイルスの作成について検討を行ってきたが、今のところカテプシン解列部位の特定に至っていない。

コロナウイルスの細胞侵入経路、細胞の抗ウイルス効果発現、ウイルス RNA の複製、及びそれらの阻害剤を研究することは、現在アウトブレイクを起こしている新型コロナウイルスを理解する上で、役立つところは大きい。本研究によって既に得られていた知見により、既存薬「シクレソニド」を抗コロナウイルス薬として利用できることが見いだされていた。現在、新型コロナウイルスの治療薬として臨床の場で用いられ、後ろ向きコホート研究が行われている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuyama Shutoku, Shirato Kazuya, Kawase Miyuki, Terada Yutaka, Kawachi Kengo, Fukushi Shuetsu, Kamitani Wataru	4. 巻 92
2. 論文標題 Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Is Not Activated Directly by Cellular Furin during Viral Entry into Target Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00683-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00683-18	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 Shirato Kazuya, Kawase Miyuki, Matsuyama Shutoku	4. 巻 517
2. 論文標題 Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 9~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2017.11.012	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 Shutoku Matsuyama, Miyuki Kawase, Naganori Nao, Kazuya Shirato, Makoto Ujike, Wataru Kamitani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi	4. 巻 3.11
2. 論文標題 The inhaled corticosteroid ciclesonide blocks coronavirus RNA replication by targeting viral NSP15	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 987016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1101/2020.03	査読の有無 無
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 Matsuyama Shutoku, Nao Naganori, Shirato Kazuya, Kawase Miyuki, Saito Shinji, Takayama Ikuyo, Nagata Noriyo, Sekizuka Tsuyoshi, Katoh Hiroshi, Kato Fumihiro, Sakata Masafumi, Tahara Maino, Kutsuna Satoshi, Ohmagari Norio, Kuroda Makoto, Suzuki Tadaki, Kageyama Tsutomu, Takeda Makoto	4. 巻 117
2. 論文標題 Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7001~7003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2002589117	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 Kawase Miyuki、Kataoka Michiyo、Shirato Kazuya、Matsuyama Shutoku	4. 巻 93
2. 論文標題 Biochemical Analysis of Coronavirus Spike Glycoprotein Conformational Intermediates during Membrane Fusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 00785-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00785-19	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0件

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