

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02665

研究課題名(和文)呼吸器感染症ウイルス活性化酵素TMPRSS2の役割ならびに阻害化合物に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of respiratory virus activating protease TMPRSS2 and its inhibitor compounds

研究代表者

竹田 誠 (Takeda, Makoto)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長

研究者番号：40311401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまでに、宿主プロテアーゼTMPRSS2が、多種多様な呼吸器ウイルスを活性化することや、インフルエンザウイルスの生体内での活性化を担うことを明らかにしてきた。今回、TMPRSS2によるSARS-CoV-2の活性化、HAI-2によるTMPRSS2阻害とSARS-CoV-2感染阻害効果を解析した。SARS-CoV-2の感染は、TMPRSS2の発現で顕著に増強された。一方、HAI-2の添加量に比例してTMPRSS2を介したSARS-CoV-2感染が阻害された。HAI-2ノックダウン細胞では検出されるウイルスゲノムコピー数が数十倍に上昇することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SARS-CoV-2感染症(COVID-19)についてはいまだ有効な治療薬が存在しません。創薬のターゲットを考えるには、ウイルスの増殖機構を分子レベルで詳細に知る必要があります。SARS-CoV-2が効率良く感染するために必要なTMPRSS2という生体内タンパク質分解酵素と、その生理的阻害因子HAI-2の結合様式や作用機序を今後詳細に解析し、いまだ不明な点の多いCOVID-19の病態解明と創薬ターゲット候補の作出へと展開できると考えます。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that the host protease TMPRSS2 activates a wide variety of respiratory viruses and is responsible for the activation of influenza viruses in vivo. In the present study, we analyzed the activation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2 and the inhibition of TMPRSS2 and SARS-CoV-2 infection by HAI-2. SARS-CoV-2 infection was markedly enhanced by TMPRSS2 expression. On the other hand, TMPRSS2-mediated SARS-CoV-2 infection was inhibited by HAI-2 in a dose-dependent manner. Knockdown of HAI-2 from cells resulted in a 10-fold increase in the number of viral genome copies detected

研究分野：ウイルス学

キーワード：SARS-CoV-2 TMPRSS2 HAI-2

## 1. 研究開始当初の背景

呼吸器ウイルス感染症は、伝播を阻止することが非常に難しく、対策の実施に時間的な猶予はない。呼吸器ウイルス感染症の流行阻止は極めて難しく、対策は常に緊急性が求められる。本研究の開始時点では、新型インフルエンザの発生や、中東で流行が続いている中東呼吸器症候群(MERS)などが具体的な脅威と考えられていたが、将来出現が予想される、未知の新型呼吸器ウイルスに対しても、申請者らは危機感を抱いていた。そこで、呼吸器ウイルスに共通の感染メカニズムを解明し、宿主因子を標的として薬剤を開発することを計画した。肺炎を起こすウイルス種は様々であるが、多くの呼吸器ウイルスにおいて、膜融合蛋白の活性化に宿主のプロテアーゼを利用することで増殖するという共通性を有している。そこで、われわれは、呼吸器ウイルスを活性化する宿主プロテアーゼを同定すること、ならびに、多種の呼吸器ウイルスが共通の宿主プロテアーゼを用いて増殖する可能性について研究を続けてきた。その結果、呼吸器上皮細胞に発現している II 型膜タンパクセリンプロテアーゼ TMPRSS2 が、多種多様な呼吸器ウイルス（インフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、重症急性呼吸器症候群（SARS）コロナウイルス、MERS コロナウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス）を活性化することを明らかにした。さらには、TMPRSS2 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作出して、TMPRSS2 がインフルエンザウイルスの生体内での活性化を担う最も重要なプロテアーゼであることを証明した。これらの結果により、TMPRSS2 の活性を阻害することにより、インフルエンザウイルスや多くの他の呼吸器ウイルスの感染を制御できる可能性を提示できたと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究遂行中の 2019 年 12 月、SARS コロナウイルス 2 型 (SARS-CoV-2) による新しい感染症が発生した。本疾患による肺炎アウトブレイクは、2019 年 12 月中国湖北省武漢市ではじまり、短期間のうちに世界中へと拡大した。2020 年 3 月 11 日、世界保健機関は、パンデミック発生の声明を出した。渡航制限や都市閉鎖などの世界各国での厳しい対策にもかかわらず、感染の拡大は継続して続いている。本研究で当初挙げていた目的は、①TMPRSS2 が、MERS コロナウイルスの生体内活性化酵素であるか。②TMPRSS2 の生理学的意義について。③TMPRSS2 活性阻害化合物の同定・作出。④TMPRSS2 活性阻害化合物の呼吸器ウイルスの生体内増殖抑制効果についてであったが、SARS-CoV-2 の出現に対応して、目的を、TMPRSS2 による SARS-CoV-2 の活性化、ならびに TMPRSS2 阻害物質による SARS-CoV-2 の感染阻害効果に修正し、研究を実施した。

## 3. 研究の方法

通常の VeroE6 細胞、TMPRSS2 を発現した VeroE6 細胞 (VeroE6/TMPRSS2 細胞) を用いて、SARS-CoV-2 の分離効率や増殖効率を比較解析した。さらに TMPRSS2 と類似の生体内タンパク質分解酵素であるマトリプターゼの生理的阻害活性因子 hepatocyte growth factor activator inhibitor 2 (HAI-2) に着目した。HAI-2 はがん細胞の造腫瘍性や組織浸潤に重要な宿主プロテアーゼ HGFA の機能制御に重要な因子であり、HAI-2 が TMPRSS2 の生理的阻害活性因子でもある可能性が示唆されていた。しかし、SARS-CoV-2 感染に与える影響については、全くわかっていなかった。ヒト細胞を用いて HAI-2 タンパク質を大量に発現精製する系を構築した。次に、発現・精製した HAI-2 を培養液へ入れた状態で、SARS-CoV-2 を細胞に感染させ、感染の阻害が起

こるかを解析した。さらに、HAI-2 の発現を一時的に低下させた上で、SARS-CoV-2 を感染させたときのウイルス増殖を解析した。ヒト気管支上皮由来の Calu-3 細胞を用いて siRNA 法により HAI-2 の発現を一時的に低下させ、SARS-CoV-2 を感染させ、培養上清に放出されるウイルスゲノムコピー数を調べた。

#### 4. 研究成果

VeroE6 細胞、VeroE6/TMPRSS2 細胞ともに、SARS-CoV-2 に感受性を示したが、ウイルスの感染効率、増殖効率共に、VeroE6/TMPRSS2 細胞の方が顕著に高かった。すなわち、TMPRSS2 は、他の呼吸器ウイルスに対するのと同様に、SARS-CoV-2 も活性化することが示された。一方、阻害物質の解析においては、添加した HAI-2 の量に比例して TMPRSS2 を介した感染が阻害されることが明らかになった。HAI-2 ノックダウン細胞では検出されるウイルスゲノムコピー数が数十倍に上昇することが分かった。以上の結果は HAI-2 が TMPRSS2 の機能制御を介して SARS-CoV-2 の感染を制御する生理的活性物質である可能性を示すものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 1件）

1. 著者名 Tomita Yuriko, Matsuyama Shutoku, Fukuhara Hideo, Maenaka Katsumi, Kataoka Hiroaki, Hashiguchi Takao, Takeda Makoto	4. 巻 95
2. 論文標題 The Physiological TMPRSS2 Inhibitor HAI-2 Alleviates SARS-CoV-2 Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00434-21	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 Yamamoto Mizuki, Kiso Maki, Sakai-Tagawa Yuko, Iwatsuki-Horimoto Kiyoko, Imai Masaki, Takeda Makoto, Kinoshita Noriko, Ohmagari Norio, Gohda Jin, Semba Kentaro, Matsuda Zene, Kawaguchi Yasushi, Kawaoka Yoshihiro, Inoue Jun-ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 The Anticoagulant Nafamostat Potently Inhibits SARS-CoV-2 S Protein-Mediated Fusion in a Cell Fusion Assay System and Viral Infection In Vitro in a Cell-Type-Dependent Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 629 ~ 629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v12060629	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 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 Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N	4. 巻 93
2. 論文標題 TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e01815-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01815-18	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Takeda M, Hasegawa H
2. 発表標題 TMPRSS2 plays a role in replication and pathogenesis of SARS-CoV and MERS-CoV in mice.
3. 学会等名 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (国際学会)
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
研究分担者	永田 典代  (Nagata Noriyo)  (30270648)	国立感染症研究所・感染病理部・室長   (82603)	
研究分担者	福原 秀雄  (Fukuhara Hideo)  (80707191)	北海道大学・薬学研究院・特任助教   (10101)	

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