

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09934

研究課題名（和文）チクングニアウイルス感染関連細胞性因子の同定

研究課題名（英文）Determination of cellular factors involved in chikungunya virus infection

研究代表者

田中 淳（Tanaka, Atsushi）

大阪大学・微生物病研究所・特任講師（常勤）

研究者番号：20321953

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）：チクングニアウイルス（CHIKV）シュードタイプを接種した遺伝子ノックアウト一倍体細胞ライブラリーからのウイルス耐性生存細胞のゲノムワイド分析により、CHIKV感染に関連する膜蛋白質候補が示唆された。我々はこの新しい膜蛋白質がCHIKV Thai # 16856臨床分離株の感染に大きく関与していることを明らかにすることができた。CHIKV感染時におけるこの新しい膜蛋白質の作用機序の解明はCHIKV感染の予防治療薬の開発にとって重要な知見になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チクングニアウイルスのヒト細胞への結合機構ならびに侵入機構といった一連の感染機構の詳細は明らかにされておらず、またチクングニアウイルスに対する予防薬や治療薬、ワクチンも開発されていないという状況である。本研究ではチクングニアウイルスのヒト細胞への感染増殖機構を明らかにするため、ヒト細胞におけるチクングニアウイルス感染関連細胞性因子の同定を試みた。今回得られたチクングニアウイルス感染関連細胞性因子は将来、チクングニアウイルス感染の予防薬や治療薬の標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide analysis of virus-resistant surviving cells from a gene knockout haploid cell library inoculated with the chikungunya virus (CHIKV) pseudotype suggested the one of membrane protein candidate which related to CHIKV infection. We could clarify that this novel membrane protein is significantly involved in the infection of CHIKV Thai # 16856 clinical isolates. Elucidation of the mechanism of action of this new membrane protein during CHIKV infection would be an important finding for the development of a preventive/therapeutic medicine for CHIKV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：チクングニアウイルス ゲノムワイド分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

チクングニア熱はトガウイルス科アルファウイルス属に属するチクングニアウイルス(CHIKV)による感染症で、アフリカ、インド洋島嶼国、インド、東南アジアの熱帯・亜熱帯地域を中心として流行がみられている。ヒトからヒトへの CHIKV の直接的な感染はないが、CHIKV を保有するヤブカ属のネッタイシマカ、ヒトスジシマカなどにヒトが刺されることで感染する。2005 年には、ヒトスジシマカを媒介蚊として、コモロ諸島で流行がおり、コモロ諸島に近いレユニオン島では、2005 年の 3 月から 2006 年の 2 月までの期間に、15 万人以上の患者が発生し、死者 237 人が報告されている。ヒトスジシマカは日本では沖縄地方から東北地方まで広く生息が確認されており、また急性期の患者の血液には CHIKV が多く含まれることから、媒介蚊の活動が活発な夏期に、流行地からの保菌者の日本への渡航や、蚊の伝搬を契機とした国内感染の発生に注意が必要である。CHIKV の潜伏期間は 3 ~ 12 日(通常 3 ~ 7 日)で、患者の大多数は急性熱性疾患の症状を呈し、発熱と関節痛が頻発する。また重症例では神経症状(脳症)や劇症肝炎が報告されている。関節痛は四肢(遠位)に強く対称性で、その頻度は手首、足首、指趾、膝、肘、肩の順であり、関節の炎症や腫脹を伴う場合もある。関節痛は急性症状が軽快した後も、数週間から数ヶ月にわたって続く場合がある。CHIKV のヒト細胞への感染機構、細胞内での複製メカニズムについての詳細は明らかでなく、CHIKV に対する予防薬や、ワクチンも開発されていない。

我々はこれまでノックアウト細胞ライブラリーと細胞死誘導型 CHIKV シュードタイプベクターを用いたゲノムワイドスクリーニングで CHIKV 感染に関連する遺伝子の同定を試み、CHIKV 感染に関与する細胞表面ヘパラン硫酸(HS)関連遺伝子を同定し感染に関与する HS 鎖の構造単位を同定できた(Tanaka et al., 2017, Genome-Wide Screening Uncovers the Significance of N-sulfation of Heparan Sulfate as a Host Cell Factor for Chikungunya Virus Infection. *Journal of Virology*, 9;91)。細胞表面 HS は、多くのウイルス種が感染時の標的細胞への結合分子としてこれを利用しているが、様々な細胞増殖因子や細胞外マトリックス成分と相互作用し様々な生理機能に関与しているため、CHIKV 特異的感染阻害薬等の標的分子とするには好ましくないと考えられた。

## 2. 研究の目的

CHIKV のヒト細胞への侵入機構、細胞内での増殖機構を明らかにすることを目的とし、HS 鎖以外のヒト細胞における CHIKV 感染受容体及び感染関連細胞性因子を同定し、将来の抗 CHIKV 薬開発につながる知見を得ることを目的とする。

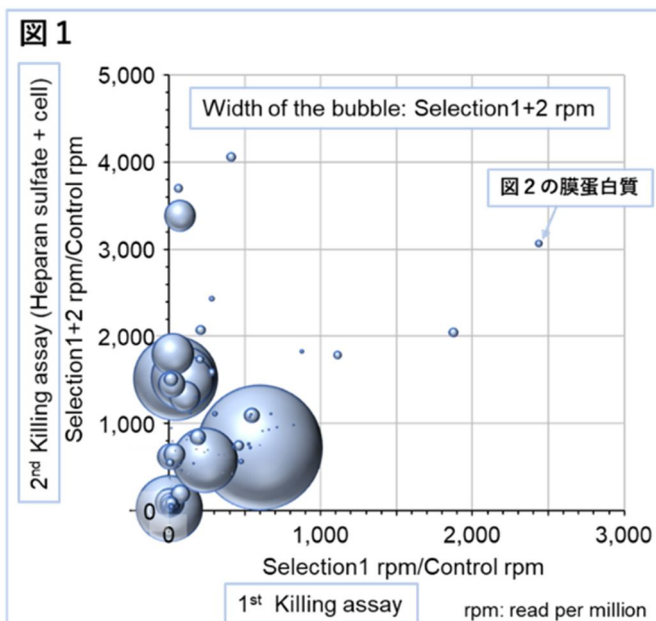
## 3. 研究の方法

これまで我々は CHIKV 感受性細胞株にエキソントラッピングベクターを導入することにより作出されたノックアウト細胞ライブラリーに細胞死誘導型 CHIKV シュードタイプベクターを接種し、ウイルス感染に抵抗性の細胞を選抜しこれらの抵抗性細胞でノックアウトされている遺伝子を、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドスクリーニングで検出及び同定を行ってきた(図 1 1<sup>st</sup> Killing assay)。これまでの研究で明らかとなった CHIKV 感染に影響している細胞表面グリコサミノグリカン以外の細胞性因子の同定を試みる本研究では、細胞表面に HS 鎖を保持しつつ CHIKV 感染に抵抗性である細胞群を得るため、これまでに選抜し細胞死誘導型 CHIKV シュードタイプベクター感染抵抗性細胞群より、細胞表面に HS 鎖を発現している細胞群を抗 HS 抗体を用いて選抜しこの細胞群に再度細胞死誘導型 CHIKV シュードタイプベクターを感染させることでウイルス感染に抵抗性の生存細胞の選抜を試みた。これらの細胞群は HS 関連遺伝子以外の CHIKV 感染関連細胞性因子を欠損している可能性が高いと考えられるため、この細胞群で有意に欠損していると考えられる遺伝子を次世代シーケンサーを用いて解析した(図 1 2<sup>nd</sup> Killing assay)。

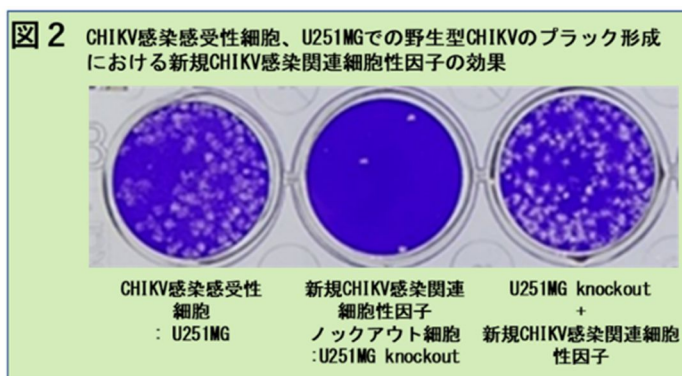
今回同定できた CHIKV 感染関連細胞性因子の責任遺伝子のノックアウト細胞と、それに責任遺伝子発現ベクターを導入したノックイン細胞とを作製し、これらの細胞の CHIKV 感染感受性について野生型 CHIKV、CHIKV シュードタイプウイルス、増殖欠損型 CHIKV ベクターそして緑色蛍光タンパク質標識ウイルス様粒子 (CHIK-VLP-EGFP) を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

CHIKV 感染関連細胞性因子として HS 関連遺伝子以外で膜蛋白分子の候補を検出できた(図 1)。CHIKV 高感受性細胞株であるアストロサイトーマ由来細胞株の U251MG 細胞を用いて樹立した新規 CHIKV 感染関連細胞性因子のノックアウト細胞での感染感受性を検討したところ、当該細胞性因子ノックアウト細胞では野生型 CHIKV 感染による CCID50 及びブラック形成等において有意な差が検出され(図 2)、当該細胞性因子がチクングニアウイルスの特異的レセプターとして働いているように見えたが、牛水疱性口内炎ウイルス



(VSV)やマウス白血病ウイルス (MuLV)といった別種のウイルスの外皮膜に CHIKV 膜タンパク質を持たせた、シュードタイプウイルスベクターを用いた感染性試験では、CHIKV 感受性細胞株と当該細胞性因子のノックアウト細胞との間でこれらシュードタイプウイルスの感染性に差がみられず、この細胞性因子がウイルスの細胞内増殖に関わる宿主因子である可能性も考えられた。

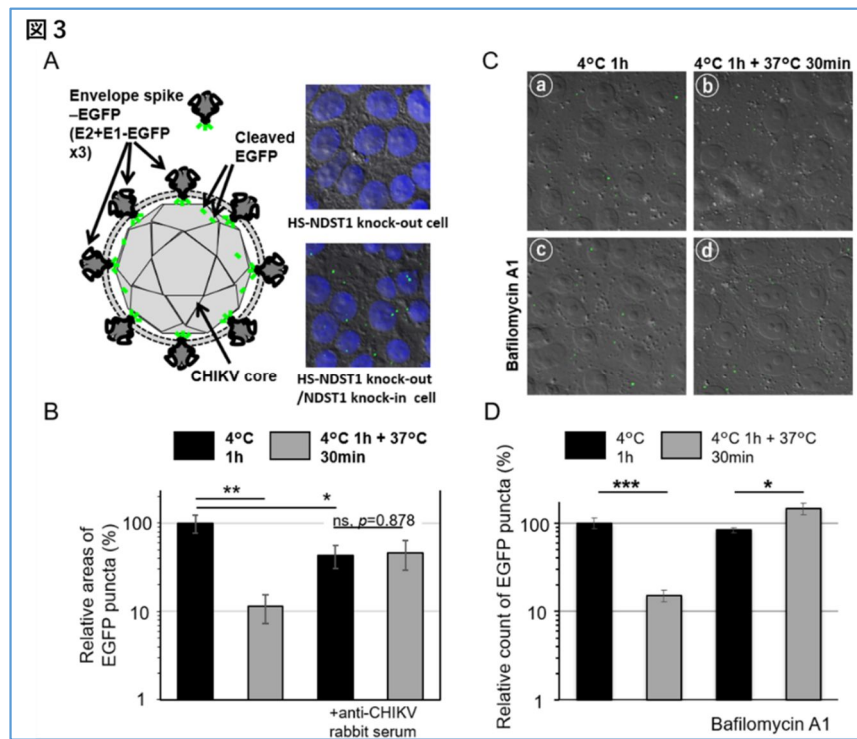


一方、本研究で標的細胞における CHIKV 感染の初期過程を視覚的に調べるために、緑色蛍光タンパク質(EGFP)をウイルスエンベロープ内側に保持するウイルス様粒子 (VLP) を構築し

た。密度勾配遠心により精製されたこの CHIK-VLP-EGFP のサイズは、本来のウイルス粒子と同じ直径 60 ~ 70 nm のサイズで観察された。この CHIK-VLP-EGFP を培養細胞へ接種したところ、細胞上の蛍光斑点として検出され、また野生型ウイルスと同様、細胞表面へパラン硫酸依存的な結合特性を示した。Vero 細胞に結合した CHIK-VLP-EGFP の蛍光シグナルは、37 °C、30 分のインキュベーションの間にその大部分が消失したが、抗 CHIKV 中和血清またはエンドソーム酸性化阻害剤 (パフィロマイシン A1) の存在下では消失しなかったため、CHIK-VLP-EGFP の細胞内への侵入に伴い、蛍光シグナルが消失していくことが示唆された(図 3)。標的細胞へ結合した CHIK-VLP-EGFP の蛍光シグナルは CHIKV 高感受性の Vero および U251MG 細胞では 37 °C、30 分で速やかに消失したが、CHIKV 低感受性細胞である A549 細胞での速やかな消失は認められず、標的細胞のウイルス感受性において、ウイルス結合だけでなく、細胞内へ侵入効率の違いが大きく影響する場合があることが示唆された。

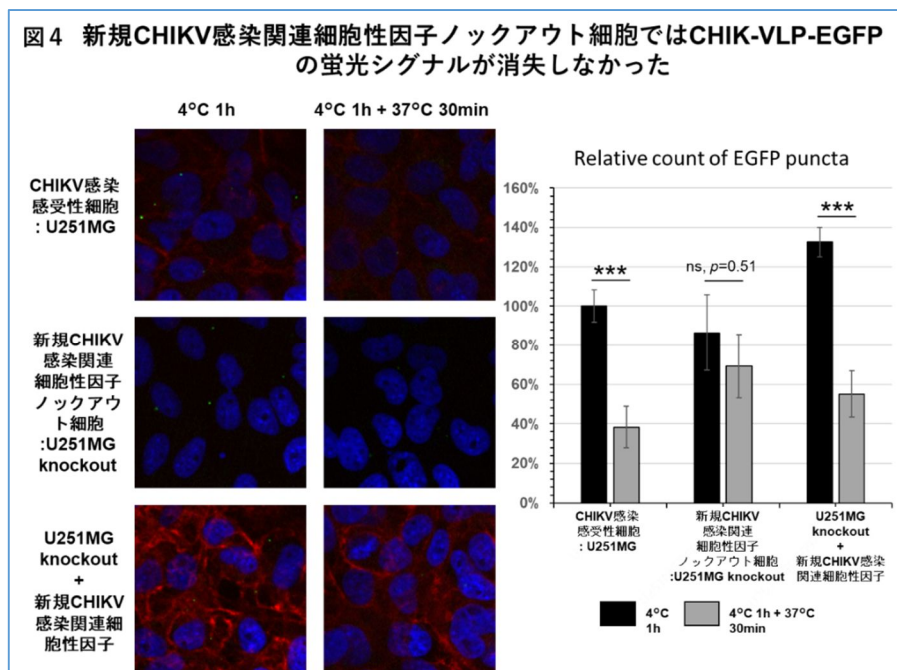
本研究で CHIK-VLP-EGFP が CHIKV 中和抗体や抗ウイルス化合物による CHIKV の標的細胞への侵入阻害効果を検討するための有用なツールになりうると示唆された(Tumkosit et al., 2019, The use of green fluorescent protein-tagged virus-like particles as a tracer in the early phase of chikungunya infection. *Virus Research* **272**: 197732.). そこでこの CHIK-VLP-EGFP を用い、図 2 の U251MG 細胞を用いて樹立した新規 CHIKV 感染関連細胞性因子

のノックアウト細胞、ノックイン細胞での CHIK-VLP-EGFP の動態について検討した。その結果、野生型 U251MG 細胞では EGFP の蛍光シグナルは 37、30 min で有意な消失がみられるが、当該細胞性因子ノックアウト U251MG 細胞では有意な消失が



認められなかった。また当該細胞性因子ノックアウト U251MG に今回の細胞性因子発現ベクターを導入したものでは EGFP の蛍光シグナルは 37、30 min で有意な消失が認められた(図 4)。これらの結果から今回得られた細胞性因子が、ウイルスの標的細胞へのインターナリゼーションに関与している可能性が考えられた。

今後、この新規細胞性因子が CHIKV 感染増殖にどのように関与しているのかを明らかにすると同時に、この新規分子を標的とした抗ウイルス低分子化合物等の開発の足掛かりを得ることを目的に研究を進める必要がある。



## 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 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka, A. Tumkosit, U. Nakamura, S. Motooka, D. Kishishita, N. Priengprom, T. Sa-NGasang, A. Kinoshita, T. Takeda, N. Maeda, Y.	4. 巻 Volume 91(13)
2. 論文標題 Genome-Wide Screening Uncovers the Significance of N-sulfation of Heparan Sulfate as a Host Cell Factor for Chikungunya Virus Infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of virology	6. 最初と最後の頁 e00432-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00432-17	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 Tumkosit, U., Y. Maeda, N. Kishishita, U. Siripanyaphinyo, H. Omori, P. Chetanachan, P. Sittisaman, C. Jityam, T. Priengprom, H. Mizushima, P. Wongjaroen, E. Mekada, M. Tatsumi, N. Takeda, A. Tanaka.	4. 巻 272
2. 論文標題 The use of green fluorescent protein-tagged virus-like particles as a tracer in the early phase of chikungunya infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus research	6. 最初と最後の頁 197732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2019.197732	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 該当する

1. 著者名 Uranan Tumkosit, Uamporn Siripanyaphinyo, Naokazu Takeda, Motonori Tsuji, Yusuke Maeda, Kriangsak Ruchusatsawat, Tatsuo Shioda, Hiroto Mizushima, Prukswan Chetanachan, Pattara Wongjaroen, Yoshiharu Matsuura, Masashi Tatsumi, Atsushi Tanaka	4. 巻 Volume 94
2. 論文標題 Anti-Chikungunya Virus Monoclonal Antibody That Inhibits Viral Fusion and Release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of virology	6. 最初と最後の頁 e00252-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00252-20	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Uranan Tumkosit, Yusuke Maeda, Natsuko Kishishita, Masashi Tatsumi, Naokazu Takeda, Atsushi Tanaka
2. 発表標題 The use of green fluorescent protein-tagged virus-like particles as a tracer in the early phase of chikungunya infection.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----