

令和 4 年 6 月 27 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：18H02352

研究課題名(和文)急性呼吸器ウイルス感染症の病原性発現機序の解明

研究課題名(英文)Analysis of the pathogenesis of acute respiratory viral infections.

研究代表者

酒井 宏治 (Sakai, Kouji)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：70515535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：TMPRSS2遺伝子欠損マウスを用いて、センダイウイルスの感染性獲得には、インフルエンザウイルス(IAV)と同様に、宿主プロテアーゼであるTMPRSS2が必須の宿主因子であることを明らかにした。IAVのTMPRSS2以外のプロテアーゼ利用能には、HAの2カ所のアミノ酸配列が関与していることを明らかにした。そのようなアミノ酸配列を持つ変異型H3N2は、TMPRSS2以外のプロテアーゼ利用能を有していることを明らかにした。ヒトiPS細胞から分化・誘導した気道上皮細胞や肺胞上皮細胞を用いて、急性呼吸器ウイルス感染症の感染モデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パラミクソウイルスについても、オルソミクソウイルスと同様に、生体内でのウイルス膜蛋白質開裂過程は、TMPRSS2が重要な宿主因子であり、共通の原理であると考えられた。一方、このプロテアーゼ利用能は、1アミノ酸変異で容易に変化した。また、これら変異を持つウイルス既に自然界にも存在し、ヒトに浸潤していた。本研究から、急性呼吸器ウイルスの広域スペクトルの新規治療薬として期待できるTMPRSS2を標的とする特異的阻害剤は、TMPRSS2特異的阻害剤耐性ウイルスを出現・選抜に寄与するリスクがあるとも考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using TMPRSS2 gene knockout mice, we showed that the host protease TMPRSS2 is an essential host factor for the acquisition of Sendai virus infectivity, as well as seasonal influenza A virus (IAV). We demonstrated that two amino acid sequences in HA of seasonal IAV H3N2 are involved in the protease availability other than TMPRSS2. H3N2 variant (H3N2v) viruses with such a mutation in HA sequences was found to have protease-availability other than TMPRSS2. Using airway epithelial cells and alveolar epithelial cells differentiated and induced from human iPS cells, we constructed an infection model of acute respiratory virus infection.

研究分野：獣医学

キーワード：急性呼吸器ウイルス ウイルス膜蛋白質 開裂 宿主プロテアーゼ 病原性 インフルエンザウイルス
パラミクソウイルス

1. 研究開始当初の背景

オソクミクソウイルスやパラミクソウイルスの呼吸器ウイルスの感染性獲得には、ウイルス膜蛋白質が宿主プロテアーゼにより蛋白質分解性の修飾(開裂)過程が必須である。季節性インフルエンザ A ウイルス(IAV)の HA 蛋白質の開裂には、宿主のセリンプロテアーゼ TMPRSS2 が必須の酵素であることを証明した(J Virol. 88:5608-16. 2014)。一方、近縁なパラミクソウイルスのパラインフルエンザウイルス(PIV)やセンダイウイルス(SeV)、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)について、ウイルス膜 TMPRSS2 が病原性発現に必須の宿主因子であるかどうか不明である。生体内での TMPRSS2 によるウイルス膜蛋白質開裂は、呼吸器感染症の共通原理が存在するのであれば、TMPRSS2 特異的阻害剤が、IAV だけでなく、パラミクソウイルスにも有効で、呼吸器ウイルスの広域スペクトルの新規治療薬となり得る。

2. 研究の目的

季節性インフルエンザ A ウイルス(IAV)の HA 蛋白質の開裂には、宿主のセリンプロテアーゼ TMPRSS2 が必須の酵素であったが、近縁なパラミクソウイルスのパラインフルエンザウイルス(PIV)やセンダイウイルス(SeV)、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)について、ウイルス膜 TMPRSS2 が病原性発現に必須の宿主因子であるかどうか不明であり、生体内での TMPRSS2 によるウイルス膜蛋白質開裂は、呼吸器感染症の共通原理が存在するのか、検証を試みる。また、呼吸器感染症の共通原理が存在するのであれば、TMPRSS2 特異的阻害剤が、IAV だけでなく、パラミクソウイルスにも有効で、呼吸器ウイルスの広域スペクトルの新規治療薬となり得るが、TMPRSS2 特異的阻害剤耐性ウイルスが出現しないのか、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスを用いて、検証を行う。

また、これまで遺伝子欠損マウスを用いて、宿主因子の同定を試みてきたが、マウスとヒトで動物種が異なるため、ヒトでも同様のことが適用されるのかについて、限界があった。そのため、ヒト iPS 細胞から分化・誘導した呼吸器上皮細胞を用いた、急性呼吸器ウイルス感染症の感染モデルを作成し、遺伝子改変ヒト iPS 細胞から分化・誘導した呼吸器上皮細胞を用いて、完全証明を試みるための研究基盤の構築を試みた。

3. 研究の方法

(1)『IAV 同様、TMPRSS2 が、マウス生体内でパラミクソウイルス(PIV や SeV、hMPV)の F 蛋白質を開裂している唯一の宿主因子であるか?』の検証

IAV の解析と同様に、野生型マウスと TMPRSS2 遺伝子欠損マウスを用いて、病原性(体重減少、致死性)、肺でのウイルス増殖、ウイルス膜蛋白質の開裂の有無について、詳細に解析を行う。パラミクソウイルスでの解析結果が IAV と同様であれば、生体内での TMPRSS2 によるウイルス膜蛋白質開裂は、呼吸器感染症の共通原理であることが明らかとなる。

(2)TMPRSS2 非依存的インフルエンザウイルスの変異解析及び変異型 H3N2 ウイルスの TMPRSS2 遺伝子欠損マウスでの病原性解析

TMPRSS2 遺伝子欠損マウスで H3N2 ウイルスを連続 20 回の継代を行った。得られた TMPRSS2 遺伝子欠損マウス馴化ウイルスの病原性解析、得られたウイルスの変異の導入時期、変異箇所の解析、また、そのようなウイルス変異を有するウイルスが自然界に存在するか、存在する場合、そのウイルスを用いた TMPRSS2 依存性の検証を行った。

(3)ヒト iPS 細胞から分化・誘導した呼吸器上皮細胞を用いた、急性呼吸器ウイルス感染症の感染モデルを構築

正常健康人の iPS 細胞から分化・誘導した気道上皮細胞(ALI 培養)、肺胞上皮細胞(ALI 培養)、肺胞上皮細胞(3Dオルガノイド)を用いた解析を実施した。これら細胞を用いて、季節性 IAV(H1N1、H3N2)、変異型 H3N2 インフルエンザウイルス、パラミクソウイルス(おたふくウイルス)、レオウイルス等の急性呼吸器病を引き起こす複数のウイルスの感染モデルの作製した。

4. 研究成果

(1)パラインフルエンザウイルスのマウス生体内でのウイルス増殖に関わる TMPRSS2 の関与について

病原性の異なる 4 株のマウスパラインフルエンザウイルス(センダイウイルス)を用いて、マウス感染実験を実施した。野生型マウスでは致死的な攻撃量において、4 株とも、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスでは致死性は認められず、TMPRSS2 が病原性を決定する宿主因子と考えられた。季節性インフルエンザ A ウイルスと異なり、病原性の強いウイルス株では、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスでも子孫ウイルスの増殖は認められた。ヒトパラインフルエンザウイルスやメタニューモウイルスでは、C57BL マウスへのウイルス感染効率が非常に低かったため、詳細な解析を実施することができなかった。そこで、感受性が高いと報告されている ICR マウスを用いて解析するため、ICR マウスバックグラウンドの TMPRSS2 遺伝子欠損マウスを作成した。

本研究から、急性呼吸器ウイルスの生体内でのウイルス膜蛋白質開裂過程において、TMPRSS2

が重要な宿主因子であるということが、オルソミクソウイルスの季節性 IAV に続き、パラミクソウイルスのセンダイウイルスでも示されたため、広域スペクトルの新規治療薬として、TMPRSS2 を標的とする特異的阻害剤が有効であることが示唆された。

(2) TMPRSS2 非依存的インフルエンザウイルスの変異解析及び変異型 H3N2 ウイルスの TMPRSS2 遺伝子欠損マウスでの病原性解析について

季節性 H3N2 IAV は、野生型マウスで致死性であるが、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスで非致死性であった。低効率ながら、TMPRSS2 遺伝子欠損マウス感染肺において、ウイルス増殖が認められたため、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスで連続継代を行った。H3N2 ウイルスを TMPRSS2 遺伝子欠損マウスで連続継代すると、HA stalk 領域で糖鎖欠失を持つ第 1 の変異ウイルス (HA_N24K) が出現した。その変異ウイルスは、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスで HA 開裂が起こり、致死性な病原性を示した。さらに TMPRSS2 遺伝子欠損マウスで連続継代を行うと、HA 開裂部位が KKTR G 配列となる第 2 の変異ウイルス (HA_Q343K) が出現した。この 2 つの変異 (HA_N24K と HA_Q343K) を持つ TMPRSS2 遺伝子欠損マウス馴化ウイルスは、MDCK 細胞では、トリプシン非存在下で明瞭なブラックを形成した。季節性 H3N2 において、HA_N24K のような、糖鎖欠損を持つウイルスはほとんど報告されていない。一方、北米豚系統を由来とし、季節性 H3N2 とは異なる抗原性の変異型 H3N2 では、その糖鎖欠損が高度に保存されていた。変異型 H3N2 を用いた TMPRSS2 依存性のマウス生体内での解析では、低効率ながら TMPRSS2 遺伝子欠損マウスで HA 開裂が認められたが、致死性な病原性は全く示さなかった。したがって、糖鎖欠損による TMPRSS2 依存性は H3N2 の共通原理ではなく、TMPRSS2 は、季節性 H3N2 と同様に、変異型 H3N2 IAV の病原性発現因子であると考えられた。季節性 H3N2 において、HA_Q343K のような HA 開裂部位配列への変異は報告されていないが、実験室株では存在し、同様に MDCK 細胞でのブラック形成能も報告されている。

本研究の TMPRSS2 遺伝子欠損マウス連続継代は、生体内での TMPRSS2 特異的阻害剤存在下と同様の環境と考えられる。つまり、治療薬として、TMPRSS2 特異的阻害剤を用いたとき、H3N2 IAV に関しては、HA_N24K や HA_Q343K を有する変異ウイルスや北米豚系統由来の変異型 H3N2 ウイルスが、TMPRSS2 特異的阻害剤耐性ウイルスとして出現あるいは選抜されることが危惧された。上記変異ウイルスが、TMPRSS2 以外の何の生体内プロテアーゼ利用能を獲得したのか、同定するために、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスで十分に蛋白質発現し、HA 開裂能が報告されている ST14 に注目し、ST14 遺伝子欠損マウスを作出した。

(3) ヒト iPS 細胞から分化・誘導した呼吸器上皮細胞を用いた、急性呼吸器ウイルス感染症の感染モデルを構築

正常健康人の iPS 細胞から分化・誘導した気道上皮細胞 (ALI 培養)、肺胞上皮細胞 (ALI 培養)、肺胞上皮細胞 (3D オルガノイド) を用いた解析を実施した。これら細胞を用いて、季節性 IAV (H1N1、H3N2)、変異型 H3N2 インフルエンザウイルス、パラミクソウイルス (おたふくウイルス)、レオウイルス等の急性呼吸器病を引き起こす複数のウイルスで、トリプシンなどの外部プロテアーゼの添加なしに、効率的なウイルス増殖が認められた。また、これらのウイルス感染細胞、非感染細胞でのシングルセル解析を含めた遺伝子発現解析を実施した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yin X, Riva L, Pu Y, Martin-Sancho L, Kanamune J, Yamamoto Y, Sakai K, Gotoh S, Miorin L, De Jesus PD, Yang CC, Herbert KM, Yoh S, Hultquist JF, Garcia-Sastre A, Chanda SK.	4. 巻 34
2. 論文標題 MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 108628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108628.	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 Yoshida A, Kawabata R, Honda T, Sakai K, Ami Y, Sakaguchi T, Irie T.	4. 巻 92
2. 論文標題 A single amino acid substitution within the Paramyxovirus Sendai virus nucleoprotein is a critical determinant for production of IFN-beta-inducing copyback-type defective interfering genomes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 pii: e02094-17.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02094-17	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 酒井宏治	4. 巻 71
2. 論文標題 宿主プロテアーゼTMPRSS2とインフルエンザウイルス	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 獣医畜産新報	6. 最初と最後の頁 414-424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kouji Sakai, Takashi Irie, Naoya Nagata, Kazuaki Takehara, Yasushi Ami,
2. 発表標題 The serine protease TMPRSS2 plays a major role for in vivo replication of sendai virus in a natural host.
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Yoshida, Kouji Sakai, Ryoko Kawabata, Takemasa Sakaguchi, Takashi Irie
2. 発表標題 Characterization of a Sendai virus isolate producing copyback-type defective viral RNA and its potential as a vaccine adjuvant.
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kouji Sakai, Naoya Nagata, Kimie Nomura, Takashi Irie, Kazuaki Takehara, Hiroaki Kanda, Yasushi Ami
2. 発表標題 Role of an oligosaccharide in the hemagglutinin protein on the pathogenesis of H3N2 influenza A virus.
3. 学会等名 The 1st Influenza and other Infections (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井宏治、永田直也、須崎百合子、竹原一明、網康至
2. 発表標題 変異型インフルエンザウイルスH3N2のHA開裂におけるTMPRSS2利用能と病原性解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kouji Sakai, Takashi Irie, Naoya Nagata, Yuriko Suzaki, Kazuaki Takehara, Yasushi Ami
2. 発表標題 The serine protease TMPRSS2 plays a major role for in vivo replication of mouse parainfluenza viruses in a natural host.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井宏治
2. 発表標題 センダイウイルスの宿主マウスでの病原性発現機序と宿主免疫系への貢献
3. 学会等名 8th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立感染症研究所年報 https://www.niid.go.jp/niid/ja/anual.html ウイルス第三部 - 国立感染症研究所 https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html researchmap https://researchmap.jp/read0091853/
--

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	後藤 慎平 (Gotoh Shimpei) (50747219)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	
研究分担者	入江 崇 (Irie Takashi) (70419498)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	

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