

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08945

研究課題名(和文) 感染動物モデルを用いたMERS-CoVが引き起こす重症肺炎の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of Pathogenesis and Development of Therapeutic Strategies for Severe Pneumonia Caused by MERS-CoV Using an Infected Animal Model

研究代表者

岩田 奈織子 (Naoko, Iwata)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：10360695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：MERS-CoVは重症肺炎を引き起こし、基礎疾患を持つ人ほど重症化リスクが高い。その重症化メカニズムは未解明で、治療薬やワクチンの開発も進んでいない。私たちはMERS-CoV受容体を発現するトランスジェニック(Tg)マウスで重症肺炎モデルを作製し、重症化と回復の違いから、その機序を解明することとした。報告から、type 1およびtype 2 IFNの低下が重症化の一因と示唆されていたため、Tgマウスに抗IFNAR1抗体と抗IFN抗体を投与し炎症を抑制後、MERS-CoVの感染を試みた。マウスの体重変化に影響はあったが重症化せず、重症化には炎症要因に加えて他の要素も必要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、MERS-CoVの重症化メカニズムを解明し、感染制御や治療法の開発に貢献する学術的な意義がある。また、type 1およびtype 2 IFNの低下が重症化の要因と示唆され、炎症以外の要素も関与していることが明らかとなった。MERS-CoV感染症への理解が深まり、将来的な予防策や治療法の開発につながる可能性がある。これにより、感染症対策や公衆衛生政策の向上に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：MERS-CoV, a respiratory infection, causes pneumonia that is more likely to be severe in people with underlying medical conditions. The mechanism underlying its severe progression remains unknown, and the development of treatments and vaccines is still in progress. In this study, we established a severe pneumonia model using transgenic (Tg) mice expressing MERS-CoV receptors to investigate the differences between severe progression and recovery, aiming to elucidate the underlying mechanisms. Since reports suggested that reduced type 1 and type 2 IFNs contributed to the severe disease, we administered anti-IFNAR1 and anti-IFN antibodies to Tg mice to reduce inflammation, and then attempted to infect them with MERS-CoV. The mice showed an effect on body weight change, but did not become severely ill. It was clear that other factors in addition to inflammation were necessary for severe disease.

研究分野：感染症の病理

キーワード：動物モデル コロナウイルス 治療法

## 1. 研究開始当初の背景

2012年に発見された中東呼吸器症候群(MERS)はMERSコロナウイルス(MERS-CoV)によって重症肺炎を引き起こす新興感染症である。糖尿病、腎不全、慢性肺疾患や免疫不全などの基礎疾患を持つ人は、MERS-CoV感染後の重症化リスクが非常に高く死に至る可能性がある。MERS-CoVの発見以降、ウイルスの受容体同定、動物モデルの開発は進んでいるが、まだ重症化(重症肺炎)のメカニズムは明らかにされておらず、治療薬やワクチンの開発も進んでいない。この重症化の要因を解明するため、私たちはMERS-CoVの受容体を発現しているトランスジェニック(Tg)マウスを開発した。このTgマウスはMERS-CoVに感染後、一過性の体重減少と中程度の肺炎を示すのみで重症化せずに回復する。そこで、このTgマウスを用いて重症肺炎モデルを開発し、重症肺炎時と回復時の相違点を見出し、MERS-CoVの重症化メカニズムを解明することを目指す。

## 2. 研究の目的

開発したTgマウスを用いて重症肺炎モデルを作成し、重症肺炎に陥った時と回復した時の相違点を見出し、MERS-CoVの重症化メカニズムを解明する。また、候補治療薬の効果についても、開発したTgマウスを用いて評価を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 炎症性サイトカイン産生低下による肺炎重症化への影響

MERS-CoV感染患者の中には肺炎が重症化する人が多く、それらの人は免疫不全の基礎疾患を持っていることが報告されている。さらに、重症化した患者の血清から得られた結果によると、type 1およびtype 2インターフェロン(IFN)の値が低いことが報告されている。そこで、type 1あるいはtype 2 IFNを抑制した後にMERS-CoVを感染させ、Tgマウスが重症化するかどうかを確認した。MERS-CoV感染の1日前、感染2、5、8日目に、hDPP4 Tgマウスに対して抗IFNAR1抗体(各2、0.2、0.2 0.2 mg/マウス)、抗IFN gamma (IFN )抗体(各0.2 mg/マウス)、抗IFNAR1抗体と抗IFN 抗体の併用およびVehicle(PBS)を腹腔内投与した。MERS-CoVは $10^6$  TCID<sub>50</sub>/30  $\mu$ Lの量でマウスに経鼻感染させ、体重の変化や臨床症状の観察を10日間行った。また、感染後3日に肺を採取し(各群でn=4)、ウイルス力価を測定した。

### (2) 候補治療薬の探索

候補治療薬の探索 治療薬の候補を探索した。候補となる薬剤およびモノクローナル抗体による抗体医薬の効果については、MERS-CoV感染マウスモデルを用いて検討した。

(2)-1 候補薬はカモスタットおよびナファモスタットの2つで、これらは人への使用が認可されている薬剤であり、培養細胞でのMERS-CoVの増殖抑制効果が確認されている。ウイルス感染後、3時間から3日までの間にカモスタットおよびナファモスタットを1日2回腹腔内投与し、マウスの体重変化および肺中のウイルス量を測定した。

(2)-2 MERS-CoVのスパイクタンパク質に対するマウスモノクローナル抗体およびニワトリで作製した抗スパイクタンパク質IgY抗体の効果について調べるため、hDPP4-Tgマウスに $10^6$  TCID<sub>50</sub>のMERS-CoVを経鼻接種後、6時間および1日にそれらの抗体をそれぞれ腹腔内投与した。そしてウイルス接種後のマウスの体重変化を10日間観察し、肺中のウイルス量の測定、肺の病理組織学的な変化を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 炎症性サイトカイン産生低下による肺炎重症化への影響

抗IFNAR1抗体および抗IFN 抗体を投与したマウスは、10日間の臨床症状観察の結果、感染6日目からVehicle群と抗IFNAR1および抗IFN 抗体併用群で体重の減少が見られた。一方、単独投与群では体重減少は緩徐だった。Vehicle群では感染8日目には体重が回復し始めたのに対して、抗体投与群は体重減少が続いた。しかし、感染9日目には抗IFNAR1および抗IFN 抗体併用群も体重が回復し始めた。肺の感染3日目のウイルス力価の測定では、Vehicle群と抗体投与群のマウスとの間にウイルス力価の違いは見られなかった。また、抗IFNAR1抗体と抗IFN

抗体の併用群に相加効果は見られず、抗体単独投与群と同様のウイルス力価だった。これらの結果から、炎症性サイトカインの産生が低下しても、感染3日目のウイルス力価に影響は与えなかった。しかし、体重減少には影響を及ぼし、Vehicle 群、抗 IFNAR1 および抗 IFN 抗体単体投与群では感染 10 日目には感染前の体重にほぼ回復していたが、抗 IFNAR1 および抗 IFN 抗体を投与した群では体重の回復が悪く、これらの抗体を投与したことにより、MERS-CoV の臨床症状が悪化することが示唆された。しかし type 1 および type 2 IFN の双方を抑制しても、重症肺炎の発症は引き起こせず、本マウスモデルでは感染 9 日目には回復傾向を示した。このことから、MERS-CoV 感染の重症化には炎症性サイトカインの低下が引き金となることは明らかになったが、さらに他の要因も必要とされることが確認された。

## (2) 候補治療薬の探索

### (2)-1 カモスタットおよびナファモスタットの治療効果について

薬剤投与群と非投与群で、これらの値に統計的に有意な差は見られなかったが、カモスタットおよびナファモスタット投与群では非投与群よりも体重減少が感染7日目まで軽度だった。さらに感染3日目の肺のウイルス力価を測定すると、カモスタット投与群では統計的に有意差は見られなかったが、ナファモスタットおよび非投与群と比較して低値だった。薬剤投与のウイルス減少に対する効果について、その傾向はあるものの、カモスタットおよびナファモスタットは薬剤の濃度が低かった可能性があることと薬剤に適した投与経路を踏まえ、さらに検討を行う必要がある。本マウスモデルに適した投与方法を実行すれば、薬剤の効果がより明らかになると考えられた。

### (2)-2 MERS-CoV スパイクタンパク質に対するモノクローナル抗体の治療効果について

マウスモノクローナル抗体の感染抑制効果を調べた結果、ウイルス感染後、6 時間、1 日目にモノクローナル抗体を腹腔内投与すると、ウイルス増殖が非投与群と比較して抑えられていることが明らかとなった。非投与群は感染後 7 日目で減少した体重も、抗体投与群では回復の兆しを示した。今回の実験系を用いて、モノクローナル抗体の高濃度投与を検討すること、候補となるモノクローナル抗体を複合的に組み合わせて使用する、またヒト化した場合のウイルス増殖抑制効果について検討を行う必要がある。

そして抗 IgY 抗体は MERS-CoV の各構造タンパク質に対して作製されたが、スパイク(S)タンパク質全長および S タンパク質のサブユニットである S1 タンパク質のみが、MERS-CoV に対して中和効果を示した。そのため、中和効果のあった抗 S および抗 S1 抗体について、hDPP4-Tg マウスを用いて in vivo で効果を検討した。その結果、抗体投与群と陰性コントロール抗体投与群では、ウイルス接種後の体重変化に有意差は見られなかったが、抗体投与群で接種 3 から 6 日目までの体重減少が陰性コントロール抗体投与群と比較して軽度だった。抗体投与群の肺のウイルス価は陰性コントロールと比べて有意な差は見られなかったが、肺の病理組織を用いた免疫組織化学法で MERS-CoV N 抗原の陽性細胞数をカウントしたところ、抗 S1 抗体投与群では陽性細胞数が陰性コントロール投与群と比較して有意に少なかった。また抗 S 抗体投与群では統計学的に有意差は見られなかったが、陰性コントロール投与群と比べて陽性細胞数が少ない傾向だった。これらの事から作製した MERS-CoV 抗 S 及び S1 IgY 抗体は MERS-CoV の増殖抑制に部分的な効果があることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 El-Kafrawy Sherif A., Abbas Aymn T., Sohrab Sayed S., Tabll Ashraf A., Hassan Ahmed M., Iwata-Yoshikawa Naoko, Nagata Noriyo, Azhar Esam I.	4. 巻 14
2. 論文標題 Immunotherapeutic Efficacy of IgY Antibodies Targeting the Full-Length Spike Protein in an Animal Model of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 511～511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph14060511	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 Ueno M, Iwata-Yoshikawa N, Matsunaga A, Okamura T, Saito S, Ashida S, Yoshida I, Nagashima M, Asakura H, Yaoita Y, Suzuki J, Sadamasu K, Yoshimura K, Kutsuna S, Shiwa-Sudo N, Nagata N, Suzuki T, Suzuki A, Okamoto M, Kimura M, Ohmagari N, Miura R, Ishizaka Y	4. 巻 201
2. 論文標題 Isolation of human monoclonal antibodies with neutralizing activity to a broad spectrum of SARS-CoV-2 viruses including the Omicron variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105297～105297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2022.105297	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 Naoko Iwata-Yoshikawa, Noriyo Nagata, Hiromi Takaki, Misako Matsumoto, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa and Tsukasa Seya	4. 巻 6
2. 論文標題 Prophylactic Vaccine Targeting TLR3 on Dendritic Cells Ameliorates Eosinophilic Pneumonia in a Mouse SARS-CoV Infection Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 275-282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2200020	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 Naoko Iwata-Yoshikawa, Nozomi Shiwa, Tsuyoshi Sekizuka, Kaori Sano, Akira Ainai, Takuya Hemmi, Michiyo Kataoka, Makoto Kuroda, Hidek Hasegawa, Tadaki Suzuki, Noriyo Nagata	4. 巻 8
2. 論文標題 A lethal mouse model for evaluating vaccine-associated enhanced respiratory disease during SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabh3827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abh3827	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 Hanako Sekimukai, Naoko Iwata Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Michiyo Kataoka, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Kenichi Niikura, Katsuhiko Arai, Noriyo Nagata	4. 巻 64(1)
2. 論文標題 Gold nanoparticle adjuvanted S protein induces a strong antigen specific IgG response against severe acute respiratory syndrome related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 33-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12754.	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 Aymn T. Abbas, Sherif A. El-Kafrawy, Sayed Sartaj Sohrab, Ashraf A. Tabll, Ahmed M. Hassan, Naoko Iwata-Yoshikawa, Noriyo Nagata and Esam I. Azhar	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 Anti-S1 MERS-COV IgY Specific Antibodies Decreases Lung Inflammation and Viral Antigen Positive Cells in the Human Transgenic Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines8040634	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 Naoko Iwata-Yoshikawa, Tadashi Okamura, Yukiko Shimizu, Osamu Kotani, Hironori Sato, Hanako Sekimukai, Shuetsu Fukushi, Tadaki Suzuki, Yuko Sato, Makoto Takeda, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa, Noriyo Nagata.	4. 巻 93(6).
2. 論文標題 Acute respiratory infection in human dipeptidyl peptidase 4-transgenic mice infected with Middle East respiratory syndrome coronavirus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e01818-18.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01818-18.	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 Naoko Iwata-Yoshikawa, Tadashi Okamura, Yukiko Shimizu, Hideki Hasegawa, Makoto Takeda, Noriyo Nagata.	4. 巻 93(6).
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoko Iwata-Yoshikawa, Nozomi Shiwa, Tsuyoshi Sekizuka, Kaori Sano, Akira Ainai, Takuya Hemmi, Michiyo Kataoka, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Tadaki Suzuki, Noriyo Nagata.
2. 発表標題 Establishment of a SARS-CoV-2 BALB/c lethal mouse model using mouse passaged virus generated from a European lineage of SARS-CoV-2.
3. 学会等名 XVth INTERNATIONAL NIDO SYMPOSIUM. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩田 (吉河) 奈織子, 志和 希, 関塚 剛, 佐野 芳, 相内 章, 逸見拓矢, 片岡紀代, 黒田 誠, 長谷川秀樹, 鈴木忠樹, 永田典代
2. 発表標題 SARS-CoV-2マウス継代ウイルスによる致死モデルの確立
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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