

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06146・19K21260

研究課題名(和文)クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの細胞侵入機構の解明と治療標的の同定

研究課題名(英文) Analysis of host cell entry of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and identification of the therapeutic targets

研究代表者

櫻井 康晃 (SAKURAI, Yasuteru)

長崎大学・感染症共同研究拠点・助教

研究者番号：00818338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)は、ヒトに感染することで重篤な疾患を引き起こす。アフリカから中近東、東欧、中央アジアにかけて広範囲に流行しているが、現在有効性が証明されたワクチンも治療法も存在しない。本研究では、CCHFVや近縁のハザラウイルス由来の表面糖タンパク質を持つシュードウイルスの効率的な作製法を開発した。更に、それを用いたハイスループットスクリーニング系により1280種類の化合物の活性を評価した結果、CCHFVに対する侵入阻害剤の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野生型CCHFVはバイオセーフティーレベル4(BSL4)施設にて扱う必要があり、限られた研究者に限られた手法でしか研究出来ない。本研究で開発したシュードウイルスによる実験系を用いれば、細胞侵入過程に限定されるが、BSL2施設にて効率的にウイルス学的解析や治療法の探索が可能となる。更に、患者や回復者血清の中和抗体価の安全な評価にも活用出来る。従って本研究成果は、クリミア・コンゴ出血熱の病態解析、治療法開発、疫学調査など様々な研究に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) causes a severe infectious disease in human. Although it affects a wide geographic region including Africa, the Middle East, Eastern Europe and central Asia, currently there is no approved vaccine and therapeutics. Moreover, the replication competent virus needs to be used in the Biosafety Level 4 (BSL4) laboratory, making the research difficult to conduct.

In this study, we developed efficient methods to produce pseudotyped virus bearing glycoproteins of CCHFV and the closely-related Hazara virus. With a high-throughput assay using the pseudotyped viruses, which can be performed in the BSL2 laboratory, 1280 compounds were screened for the antiviral activities, resulting in identification of CCHFV entry inhibitors. This newly developed assay can be an effective tool for the therapeutic development as well as the basic virological research of CCHFV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：クリミア・コンゴ出血熱ウイルス 細胞侵入過程 シュードウイルス 侵入阻害剤 スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) は、ダニが媒介するブニヤウイルスの一種であり、ヒトに感染することで重篤な疾患であるクリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) を引き起こす。その流行地はアフリカから中近東、東欧、中央アジアと非常に広く、近年では渡り鳥等を介した流行地の拡大も危惧されている。しかしながら、現在ワクチンは存在せず、治療薬として投与歴のあるリバビリンはその有効性が証明されていない。そのため、CCHF に対する有効な治療法の開発が急務となっている。

一方、野生型 CCHFV はバイオセーフティーレベル 4 (BSL4) 施設で扱う必要があることから、そのウイルス学的研究や治療法の開発は十分なものではなかった。そこで、BSL4 施設に依存しない実験系を開発し、それを用いてウイルス感染メカニズムの解明と治療薬候補の同定を行うことが治療法開発の上で重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の主目的は、CCHFV の感染過程、特に細胞侵入過程を評価可能な実験系を確立し、CCHF に対する治療薬の標的候補因子を同定することである。

細胞侵入過程はウイルスの複製サイクルの中で最初の必須なステップであり、治療薬の標的として有望な候補である。実際、エボラ出血熱や後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対して侵入阻害剤の有効性が報告されている。CCHF については、これまで動物モデルにて一定の治療効果が報告されているファビピラビルやリバビリンはゲノム複製過程を標的としている。そのため、侵入阻害剤を同定することで、全く新規の作用機序を持つ治療薬が開発可能であり、前述の薬剤との併用による相乗効果も期待出来る。更に、細胞侵入過程を解析するために広く用いられているシュードウイルスは、BSL4 病原体の本過程を解析対象とした場合でも、BSL2 施設にて使用することが出来る。しかし CCHFV に対しては、効率的なシュードウイルスによる系が未だ確立されていなかった。そこで本研究では、このシュードウイルスを開発し、CCHFV の細胞侵入過程を阻害する化合物の同定とその標的因子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下のような手法により実験を進めた。

- (1) **シュードウイルスの作製と感染**: BSL4 病原体を含む種々のウイルスの細胞侵入過程を解析する手段として、水疱性口炎ウイルス (VSV) をベースとしたシュードウイルスが広く使われている。これは、レポーター遺伝子 (Luciferase 遺伝子) を発現するように組み換えた VSV 由来のゲノムと、VSV の粒子核、及び他のウイルス由来の表面糖タンパク質を持ったウイルスである。本研究では、CCHFV、及びその近縁ウイルスであるハザラウイルス (HAZV) 由来の表面糖タンパク質 (G) をそれぞれを持ったシュードウイルス (rVSV-CCHFV-G 及び rVSV-HAZV-G) の作製を行った。ウイルス作製には、ヒト肝臓由来細胞株である Huh7 細胞を用いた。CCHFV の表面糖タンパク質については、ヒト細胞で高発現するようにコドン最適化し、C 末端に存在する細胞質ドメインを欠損させた  $\Delta$ C10 変異体も作製した。また、VSV 由来の表面糖タンパク質を持つ rVSV-VSV-G も作製した。作製したシュードウイルスの感染価は、Huh7 細胞を含む種々のヒト由来細胞株を用いて Luciferase アッセイにより評価した。
- (2) **化合物ライブラリーのスクリーニング**: 先行して開発に成功した rVSV-HAZV-G を用いて、1280 種類の標的既知の化合物から成るライブラリー (LOPAC1280、Sigma 社) のスクリーニングを行った。96 ウェルプレートに Huh7 細胞を播種し、翌日に 10  $\mu$ M の各化合物にて 1 時間前処理した後、化合物存在下で rVSV-HAZV-G を感染させた。陽性コントロールとしては、Bafilomycin A1 を使用した。更にその翌日に Luciferase アッセイによりウイルスの感染価を測定した。感染価を有意に低下させた化合物については、rVSV-VSV-G に対する感染阻害効果も 10  $\mu$ M にて評価した。
- (3) **化合物の薬効評価**: スクリーニングにより同定した化合物や関連化合物の抗ウイルス活性評価試験では、96 ウェルプレートに Huh7 細胞を播種し、翌日に各化合物を複数濃度で 1 時間前処理した後、化合物存在下でシュードウイルスを感染させ、その翌日に感染価を測定した。
- (4) **化合物の毒性評価**: 化合物の細胞毒性を評価するために、Huh7 細胞を各化合物で一日処理し、その後 CellTiter-Glo Cell Viability Assay (Promega 社) を用いて細胞生存率を算出した。

## 4. 研究成果

(1) まず、CCHFV に近縁の HAZV 由来の表面糖タンパク質を持つシュードウイルス (rVSV-HAZV-G) の作製に成功した。ヒト腎臓由来 293T 細胞を用いた通常の VSV シュードウイルスの作製方法では成功しなかったため、野生型 CCHFV が効率的に増殖可能なヒト肝臓由来 Huh7 細胞を用い、種々の実験スケジュールを検討した結果、ノイズに比べて 100 倍程度のレポーター活性が感染細胞で認められた (図 1)。更に、このシュードウイルスの感染は、CCHFV の細胞侵入過程を阻害することが報告されている bafilomycin A1 や chloroquine によって阻害されることが確認された。ハザラウイルスの表面糖タンパク質を持つシュードウイルスは未だ報告が無く、本研究により初めて作製に成功した。

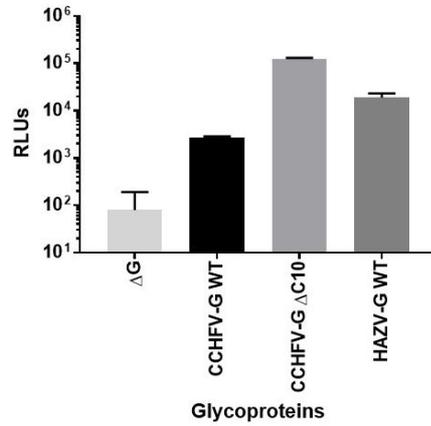


図 1 CCHFV と HAZV の表面糖タンパク質を持つシュードウイルスの感染効率

(2) CCHFV については、野生型ウイルスと同じ塩基配列を持った G 遺伝子を用いた場合、(1) で開発した方法ではシュードウイルスは作製出来なかった。そこで、ヒト細胞で高発現するようにコドン最適化された CCHFV の G 遺伝子を作製し、それを用いたところ、バックグラウンドに比較して数 10 倍の感染シグナルが認められた。更に、ウイルス粒子への取込み効率を上げるために C 末端の細胞質ドメインを欠損させた ΔC10 変異体も作製した。それを用いてシュードウイルス (rVSV-CCHFV-G) を作製したところ、バックグラウンドに比較して 1000 倍程度の感染シグナルが認められた (図 1)。更に、このシュードウイルスの感染は、既知の侵入阻害剤である bafilomycin A1 や chloroquine によって阻害されることが確認された。以後の実験では、この ΔC10 変異体を持つシュードウイルスを rVSV-CCHFV-G として使用している。これまで報告されている CCHFV の表面糖タンパク質を持つシュードウイルスでは、数 10 倍の感染シグナルしか認められておらず、本研究で開発に成功したシュードウイルスの作製方法は最も効率の良いものである。更に、このシュードウイルスを用いた実験系は、大規模スクリーニングにも十分使用可能であり、今後様々な研究に応用可能な系であると考えられる。

(3) 種々のヒト組織由来細胞株における CCHFV の細胞侵入効率を解析するために、それら細胞株における rVSV-CCHFV-G 及び rVSV-VSV-G の感染効率を検討した。その結果、ヒトの肝臓、腎臓、副腎、肺、子宮、血管内皮由来の細胞株では両方のシュードウイルスの効率的な感染が認められた。一方、T 細胞株と B 細胞株 (3 種類) では、rVSV-VSV-G は他の細胞株と同程度以上に感染が認められたのに対し、rVSV-CCHFV-G の感染は全く認められなかった。これら細胞種は、野生型 CCHFV の感染への抵抗性も過去に報告されている。従って、T 細胞や B 細胞では CCHFV への細胞侵入過程が阻害されることで感染が起きないことが分かり、今後の感染メカニズムの解析にとって重要な知見が得られた。

(4) 先行して開発に成功した rVSV-HAZV-G を用いて、1280 種類の化合物から成るライブラリーのスクリーニングを行ったところ、多数の化合物が感染を阻害した。その中で claramine

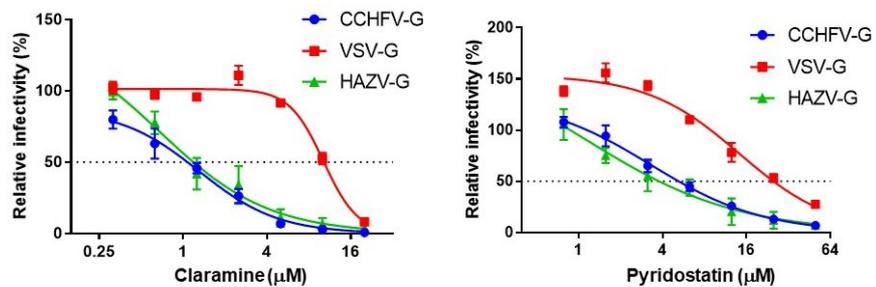


図 2 Claramine と pyridostatin によるシュードウイルス感染阻害

と pyridostatin については、rVSV-VSV-G よりも rVSV-HAZV-G の感染をより効率的に阻害した。更に、これら化合物は rVSV-CCHFV-G 感染も rVSV-HAZV-G 感染と同程度に阻害した (図 2)。このことから、claramine と pyridostatin は CCHFV や HAZV の細胞侵入過程を阻害する薬剤であると考えられる。以上の結果から、本研究で開発した実験系は大規模スクリーニングに適用出来ることが実証された。

(5) rVSV-CCHFV-G に対する IC<sub>50</sub> 値は、claramine と pyridostatin はそれぞれ 1 μM 程度と 3 μM 程度であり、細胞毒性の指標となる CC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 20 μM 程度と 200 μM 以上であった。従って、いずれの薬剤もその抗ウイルス活性は細胞毒性による非特異的なものではないことが分かった。CCHFV や HAZV に対する特異的な侵入阻害剤の報告は未だほとんど無く、同定した化合物は今後新規の治療薬候補を開発する上で重要なリード化

物になり得る。

- ( 6 ) Claramine は宿主のフォスファターゼ PTP1B の阻害剤であることから、他の PTP1B 阻害剤の抗ウイルス活性を検討したが、rVSV-CCHFV-G に対する阻害活性は認められなかった。また、細胞に感染させる前に、rVSV-CCHFV-G を claramine により 1 時間前処理したが、阻害効果の増強は認められなかった。従って、CCHFV の細胞侵入過程においては、claramine の分子標的は PTP1B でもウイルス粒子自体でも無いことが示唆された。その作用機序解析は引き続き行っている。
- ( 7 ) Pyridostatin は DNA や RNA の三次構造であるグアニン 4 重鎖の安定剤であることから、他のグアニン 4 重鎖安定剤の抗ウイルス活性を検討したが、rVSV-CCHFV-G に対する阻害活性は認められなかった。また、細胞に感染させる前に、rVSV-CCHFV-G を pyridostatin により 1 時間前処理したが、阻害効果の増強は認められなかった。従って、CCHFV の細胞侵入過程においては、pyridostatin の分子標的はグアニン 4 重鎖でもウイルス粒子自体でも無いことが示唆された。その作用機序解析は引き続き行っている。
- ( 8 ) 本研究により、CCHFV や HAZV の表面糖タンパク質を持つシュードウイルスの効率的な作製方法を開発し、それを用いて化合物スクリーニングが可能となったことが明らかとなった。これまで CCHFV や HAZV に対する薬剤スクリーニングは国内外であまり報告が無く、特にシュードウイルスを用いたスクリーニングについては全くない。そのため、新しく開発したシュードウイルスを用いたアッセイ系を用いれば、BSL2 施設にて安全に、かつ様々な研究者が薬剤スクリーニング等を行うことが可能となり、国内外の CCHFV 研究に新しい形で貢献が出来る。更に、今回同定した薬剤やその周辺物質を作用機序も含めて解析していくことにより、CCHF に対する治療薬の開発に繋がる可能性があることに加えて、ウイルスの細胞侵入過程の解明にも寄与出来ると考えられる。
- ( 9 ) 今後は、本研究におけるスクリーニングで同定した claramine や pyridostatin の作用機序等の解析を行うと共に、開発した実験系を用いて種々の化合物ライブラリー等のスクリーニングも展開していく。本実験系は血清中の中和抗体価の測定にも応用出来ると考えられるため、CCHF 患者や回復者、野生動物から採取した血清の解析も行っていく。また、CCHFV は遺伝的多様性に富むウイルスであり、今回シュードウイルスの作製に用いたのは Hoti 株というそのうちの 1 つだけである。そのため、今後は種々のウイルス株由来の表面糖タンパク質を持つシュードウイルスも同様の手法で作製し、それらの細胞侵入過程や薬剤感受性等を比較検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻井康晃
2. 発表標題 クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの細胞侵入過程評価系の開発と侵入阻害剤の同定
3. 学会等名 9th Negative Strand Virus-Japan symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井康晃
2. 発表標題 米国Texas Biomedにおけるエボラウイルス研究と長崎大学BSL4施設の設置準備状況
3. 学会等名 第19回日本バイオセーフティー学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井康晃
2. 発表標題 エボラウイルス研究とBSL4施設
3. 学会等名 東北大学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井康晃
2. 発表標題 カルシウム活性化塩素チャネルTMEM16Aはエボラウイルス感染を制御する
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
研究協力者	安田 二郎  (YASUDA Jiro)		
研究協力者	黒崎 陽平  (KUROSAKI Yohei)		