

機関番号： 32620
研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2008～2010
課題番号： 20590467
研究課題名 (和文) サイクロフィリンによる SARS コロナウイルス複製制御メカニズムの解析
研究課題名 (英文) Regulation of SARS-CoV replication by cyclophilin
研究代表者
山本 典生 (YAMAMOTO NORIO)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号： 40323703

研究成果の概要 (和文)：

サイクロフィリンと SARS コロナウイルスの増殖メカニズムの関連について、shRNA ベクターを用いて検討したところ、サイクロフィリンは SARS コロナウイルスの増殖を正に制御する因子であることが明らかとなった。サイクロフィリンの中では、少なくともサイクロフィリン A とサイクロフィリン B にそのような活性が見られた。また、Time-of-addition assay と Entry assay を行ったところ、サイクロスポリン A の作用点がウイルスライフサイクルのエントリーではなく、エントリーより後であることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

To investigate the relationship between cyclophilin and SARS-CoV replication, we introduced shRNA expression vectors to cells and compare the virus titer produced from these cells. Efficiency of SARS-CoV replication was much lower in the cells expressing shRNA against cyclophilin A and B than in the cells expressing control shRNA. The results of time-of-addition assay and entry assay showed that cyclosporin A inhibited SARS-CoV replication at the post-entry step in viral life cycle. These results suggested that cyclophilins could play a role as positive regulators of SARS-CoV replication at the post-entry step.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：SARS コロナウイルス、サイクロスポリン A

1. 研究開始当初の背景

重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) は 2002 年から 2003 年にかけて世界各地で猛威を振るい、多くの死者を出した。SARS コロナウイルスは動物とヒトの両方に感染することができるため、SARS 患者がいない状況でも SARS コロナウイルスを保有する動物は依然として存在する。つまり、SARS ウイルスがヒトに感染し SARS が再流行する危険性があり、SARS の治療法を確立することが必要とされていた。こうした状況の中で、ウイルスの増殖阻害剤の同定とウイルス増殖メカニズムの解析を進めることは、非常に大きな意味を持つものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、サイクロフィリンによる SARS コロナウイルス複製制御機構を解明することである。

より具体的には、どのサイクロフィリンが SARS コロナウイルスの増殖に関与しているのか、サイクロフィリンがウイルスライフサイクルのどの点に関与しているのか、サイクロフィリンと相互作用するウイルス因子が何か、等を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) サイクロスポリン A と FK-506 の SARS コロナウイルス増殖に対する影響を明らかにするため、s93/ACE2 細胞・Huh7 細胞をこれらの薬剤で処理し、SARS コロナウイルスを感染させた。24 時間後に培養上清中のウイルス量を、プラーク法によって定量した。

2) どのサイクロフィリンが SARS コロナウイルスの増殖に関与しているのかを明らかにするため、293/ACE2 細胞にそれぞれのサイクロフィリンに特異的な shRNA 発現ベクターを導入し、その後 SARS コロナウイルスを感染させた。24 時間後に培養上清中のウイルス量を、定量 RT-PCR 法及びプラーク法によって定量した。

3) サイクロフィリンがウイルスライフサイクルのどの点に関与しているのかを明らか

にするため、サイクロスポリン A を用いて entry assay 及び time-of-addition assay を行った。

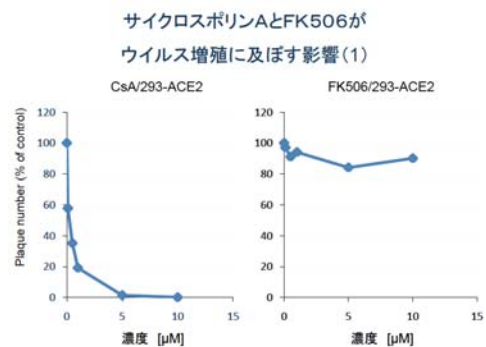
entry assay については、細胞を先にサイクロスポリン A で処理しておき、その後 SARS コロナウイルスに感染させた。感染 2 時間後に細胞から RNA を抽出しそこに存在するウイルス RNA 量を定量 RT-PCR 法により調べた。time-of-addition assay については、サイクロスポリン A が存在しない状態でウイルスを感染させ、3 時間後にサイクロスポリン A を加えた。その 21 時間後に培養上清を回収しウイルス量を定量 RT-PCR 法及びプラーク法によって定量した。

4) サイクロフィリンと相互作用するウイルス因子が何かを明らかにするため、サイクロフィリンに結合するウイルス因子を Mammalian Two Hybrid 法を用いて検討した。

5) マウス感染モデルを用いてサイクロスポリン A のウイルス増殖阻害活性の検討を行った

4. 研究成果

1) サイクロスポリン A と FK506 の SARS コロナウイルス増殖への影響を検討したところ、サイクロスポリン A はウイルス増殖を抑制するが FK-506 は抑制しないことが明らかとなった。



2) どのサイクロフィリンが SARS コロナウイルスの増殖に関与しているのか明らかにするために、293/ACE2 細胞および Huh7 細胞に各サイクロフィリンに特異的な shRNA 発現ベクターを導入し、その後 SARS コロナウイルスを感染させた。24 時間後に培養上清中のウイルス量を、定量 RT-PCR 法及びプラーク法によって定量したところ、少なくともサイクロフィリン A とサイクロフィリン B に対する

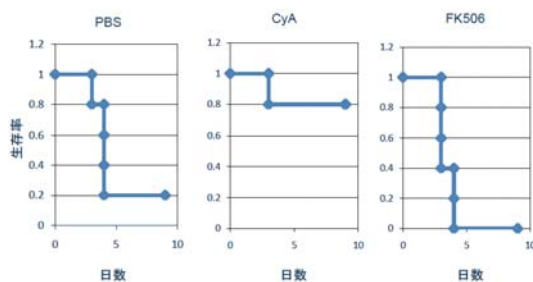
shRNA を導入した細胞では、SARS コロナウイルスの複製効率が低下していた。中でもサイクロフィリン B に対する shRNA 導入細胞では、低下の程度が最も大きかった。

3) Time-of-addition assay と Entry assay を行ったところ、サイクロスポリン A の作用点は感染後 1 時間までの中には含まれず、感染後 3 時間以降に含まれることが明らかとなった。この結果は、サイクロスポリン A の作用点がウイルスライフサイクルのエントリーではなく、エントリーより後であることを示していると考えられた。

4) Mammalian two hybrid system によってサイクロフィリンと SARS-CoV の遺伝子産物との結合について検討したところ、少なくともサイクロフィリン A と NC の結合が示唆された。ただし、サイクロフィリン A を入れた Mammalian two hybrid system 実験系ではバックグラウンドが高くなる傾向があり、この点については今後改善すべき余地があると思われた。

5) サイクロスポリン A の SARS コロナウイルスの増殖抑制効果について、マウス感染モデルを用いて検討を行った。免疫抑制効果がマウスのサバイバルに関与しているかを明らかにするために、FK-506 での検討も行った。SARS コロナウイルスを経鼻的に感染させ、その後薬剤を投与し、体重変動とサバイバルを観察したところ、サイクロスポリン投与群で体重減少率の低下と生存率の上昇が観察された。FK506 投与群ではそのような効果が見られなかった。このことから、サイクロスポリン A には病原性発現抑制効果があることが明らかとなり、そのメカニズムは免疫抑制効果によるものではなく、ウイルス増殖抑制活性によることが示唆された。

サイクロスポリンAとFK506の
SARS-CoV感染マウスへの影響



5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Haga S, Nagata N, Okamura T, Yamamoto N, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y.
TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds.
Antiviral Resarch. 85(3):551-5, 2010

Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry.
Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jun 3;105(22):7809-14.

[学会発表] (計 3 件)

原崎一浩、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎、山本直樹、高久 洋、佐藤人美、山本陽子、平松啓一、田代真人、山本典生
免疫抑制剤の SARS コロナウイルス増殖に与える影響についての解析
第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月 25 日 東京

山本典生、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎、松本武久、高久 洋、山本陽子、佐藤人美、平松啓一、田代真人、山本直樹
Structure-based drug design (SBDD) による SARS コロナウイルス増殖抑制薬剤の同定
第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月 25 日 東京

山本典生
ウイルス性呼吸器感染症に対する治療薬の開発を目指して
～インフルエンザと重症急性呼吸器症候群 (SARS)～
第 147 回 日本獣医学会学術集会 シンポジウム (シンポジスト)
2009 年 4 月 3 日 栃木

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 典生 (YAMAMOTO NORIO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40323703

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし