

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07516

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過程を要因とする病原性発現機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of CCHFV cell entry and the pathogenicity

研究代表者

櫻井 康晃 (Sakurai, Yasuteru)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：00818338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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、ヒトに重篤な病気を引き起こすダニ媒介性のウイルスである。その感染機構と病原性発現機序は未解明な部分が多く、ウイルス株間でのヒトに対する病原性の相違を裏付ける分子機序も分かっていない。本研究では、CCHFVの様々な株やハザラウイルスの表面糖タンパク質をそれぞれ持つシュードタイプウイルスや膜融合アッセイ系を開発した。それらを用いて、汎ナイロウイルス膜融合阻害剤の同定、及びウイルス間での中和抗体や酸性pH刺激への感受性の違いについて明らかにした。

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、限られた研究者が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タイプウイルスや膜融合アッセイを用いることで、BSL-2実験室において細胞侵入過程の多面的な解析や、ウイルス株間での相違についての詳細な解析が可能となる。更に、本研究により中和抗体や外的刺激に対する特徴的な感受性が明らかになったことで、表面糖タンパク質を標的とした治療法やウイルス不活化方法の開発がより一層進むことも期待される。

研究成果の概要(英文)：Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) is a tick-borne virus, which causes a severe infectious disease in human. The detailed molecular mechanisms of viral replication and pathogenicity as well as the difference between virus strains are still largely unknown. In this study, we successfully produced pseudotyped virus bearing glycoproteins of multiple CCHFV strains and developed a quantitative assay for membrane fusion. These experimental tools can be useful for detailed and comparative analyses of CCHFV cell entry steps. Moreover, using the newly-developed assays, pan-nairovirus fusion inhibitors were identified among FDA-approved drugs. Different sensitivities to neutralizing antibodies and external stimulus between viruses were also demonstrated. We expect that these results will contribute to development of antiviral therapy and disinfection method for 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 病原性発現機序 膜融合 侵入阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

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、Hyalomma 属のマダニによって媒介され、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。CCHFはアフリカから東欧、中近東、中央アジア諸国、中国西部にかけて患者が発生しており、ダニ媒介性ウイルス感染症としては最も広範囲で流行している。CCHFは病気の進行が早く、致死率が10-40%に達する。しかし、その感染機構と病原性発現機序は未解明な部分が多く、有効なワクチンや治療法も未だ存在しない。

CCHFVは、その分布域が広範囲であることもあり、ダニ媒介性ウイルスの中でも取り分け多様性が高い。ゲノム配列での分離株間の相違は20-30%に上る。その中にはHoti株やTurkey株のようにヒトに高い病原性を示すウイルス株もあれば、AP92株のように大半のケースが不顕性感染で病原性を示さないウイルス株も存在する。しかしながら、その株間での病原性の違いを決定する分子メカニズムは分かっていない。一方、最近の報告から、高病原性株由来の表面糖タンパク質(GPC)を持つウイルス粒子は、そうでないウイルス粒子よりもヒト細胞への感染効率が低い傾向を示すことが認められた。このことは、GPC依存的な細胞侵入過程が、CCHFVの病原性を規定する一因子である可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、GPC依存的な細胞侵入過程に着目し、治療標的となり得るCCHFVの病原性発現機序を解明することである。

ウイルスの細胞侵入過程を解析するために広く使用されている実験手法が、水泡口炎ウイルス(VSV)由来のシュードタイプウイルスである。我々の先行研究により、効率的かつ安定的にCCHFV由来のGPCを持つシュードタイプウイルスを産生する独自の手法を開発した。その作製手法を用いて、種々のCCHFVの株由来のGPCを作製し、それらの細胞侵入過程の比較検討もすることで、本過程を要因とする病原性発現機序の解明を目指す。

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) **シュードタイプ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、水泡性口炎ウイルス(VSV)をベースとしたシュードタイプ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のHoti株、IbAr10200株、Malko Tarnovo-BG2012-T1303株(ダニ由来)をそれぞれ持ったシュードタイプウイルス(VSV- Δ G-CCHFV-G)の作製を行った。CCHFV-G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 Δ C10変異体を用いた。また、CCHFVに近縁なハザラウイルス(HAZV)由来の表面糖タンパク質(G)もコドン最適化し、それを持ったシュードタイプウイルス(VSV- Δ G-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。また、VSV由来の表面糖タンパク質を持つVSV- Δ G-VSV-Gも作製した。作製したシュードタイプ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**: CCHFVのHoti株のGを持つVSV- Δ G-CCHFV-Gを用いて、2655種類のFDA承認薬から成るライブラリー(Selleck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5uMの各化合物にて1時間前処理した後、化合物存在下でVSV- Δ G-CCHFV-Gを感染させた。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、VSV- Δ G-CCHFV-Gに対する感染阻害効果も5uMにて評価した。
- (3) **シュードタイプウイルスを用いた化合物及び中和抗体の抗ウイルス活性評価**: 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、化合物存在下で各シュードタイプウイルスを感染させ、その翌日にLuciferaseアッセイにより感染価を測定した。中和抗体の活性評価試験では、各シュードタイプウイルスと中和抗体を複数濃度で混合し、37℃で1時間静置した後、その混合物をHuh7細胞の培養液に添加し、翌日にLuciferaseアッセイにより感染価を測定した。
- (4) **膜融合アッセイ**: CCHFV-Gを介した膜融合活性を定量するために、Huh7細胞を2グループに分け、一方にはCCHFV-G発現プラスミドとpT7EMCV-Lucプラスミドを、

他方には T7 ポリメラーゼ発現プラスミドと内在性コントロール用プラスミドをトランスフェクションし、翌日に両者を混ぜて再播種した。その翌日に様々な pH から成るクエン酸リン酸緩衝液で細胞を 2 分間処理した後、新たな培養液を加えて 1 日間培養した後、Luciferase アッセイにより膜融合活性を測定した。薬剤の膜融合活性への影響を評価する実験では、前述と同様にトランスフェクションした Huh7 細胞を混ぜて再播種して 1 日間培養した後、細胞を薬剤で 1 時間処理し、pH5.0 のクエン酸リン酸緩衝液で細胞を 2 分間処理した。その後、新たな培養液を加えて 1 日間培養した後、Luciferase アッセイにより膜融合活性を測定した。

- (5) 外的刺激の表面糖タンパク質への影響解析: 酸性 pH の CCHFV-G への影響を解析するために、CCHFV やその他のウイルス由来の表面糖タンパク質をそれぞれ持つシュードタイプウイルスを、様々な pH から成るクエン酸リン酸緩衝液で 2 分間処理した。その後、培養液で希釈したウイルス溶液を Huh7 細胞の培養液に添加して 1 日間培養した後、Luciferase アッセイにより感染価を測定した。

4. 研究成果

- (1) 先行研究で作製済みの CCHFV の Hoti 株に加えて、IbAr10200 株や Malko Tarnovo-BG2012-T1303 株 (ダニ由来) の表面糖タンパク質発現 (G) プラスミドを作製した。これらウイルス株の G についても Hoti 株の G と同様に、C 末端を欠損させた変異体 ($\Delta C10$) を作製した。そして、それら変異体を用いることで、各ウイルス株由来 VSV- ΔG -CCHFV-G の作製に成功した。ただし、これらは Hoti 株由来 VSV- ΔG -CCHFV-G に比べて力価が低い。今後作製効率を上げるための方法を検討する必要がある。また、CCHFV に近縁のハザウイルス (HAZV) の G を持つシュードタイプウイルス (VSV- ΔG -HAZV-G) の作製効率を上げるために、G のコドン最適化を行った。その結果、シュードタイプウイルスの産生効率が数 10 倍上昇した。

- (2) CCHFV IbAr10200 株の G 由来のペプチドで免疫したウサギ由来の抗血清を用いた結果、細胞内で発現させた CCHFV の Hoti 株、IbAr10200 株、及び Malko Tarnovo-BG2012-T1303 株由来の表面糖タンパク質 Gn の検出に成功した。Gn は、表面糖タンパク質前駆体 (GPC) が細胞内プロセッシングを受けることで生成される機能的タンパク質の 1 つで、Gc と共にウイルス粒子表面に発現している。また、各ウイルス株由来の VSV- ΔG -CCHFV-G 産生細胞の培養上清でも Gn が検出出来たことから、シュードタイプウイルスの産生が裏付けられた (図 1)。ただし、本血清については HAZV の Gn との交差反応は認められなかった。

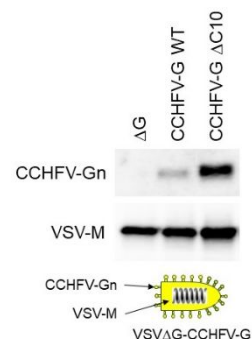


図 1: シュードタイプウイルス中の CCHFV-G の検出

- (3) 他のウイルスと同様に、CCHFV の細胞侵入過程は、受容体との結合や膜融合など複数の素過程から成り、それらを再現する系は細胞侵入過程を解析するために不可欠である。そこで、CCHFV の G を介した膜融合を定量可能なアッセイ系の開発を行い、成功した (図 2)。本アッセイの最適化を行う過程において、膜融合が酸性 pH の刺激により誘起されることが分かった。特に pH5.0 や pH4.0 での刺激が膜融合を強く誘起した。更に、シュードタイプウイルスの産生を飛躍的に促進した C 末端欠損型 ($\Delta C10$) の G を用いることで、本アッセイにおける膜融合の効率も飛躍的に向上することが認められた。

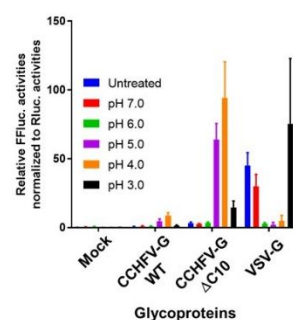


図 2: CCHFV-G を介した膜融合の定量

- (4) CCHFV Hoti 株由来 VSV- ΔG -CCHFV-G を用いて化合物スクリーニングを精度良く実施するために、感染実験系の最適化を行った。96 ウェルプレートと Huh7 細胞を用いたアッセイにおいて、感染細胞と非感染細胞との比較において Z factor が 0.71、既知の感染阻害剤である bafilomycin A1 で処理した感染細胞と非処理の感染細胞との比較において Z factor が 0.73 との結果となった。いずれの Z factor も 0.5 以上であることから、スクリーニングにも使用可能な系への最適化に成功した。そこで、その系を用いて

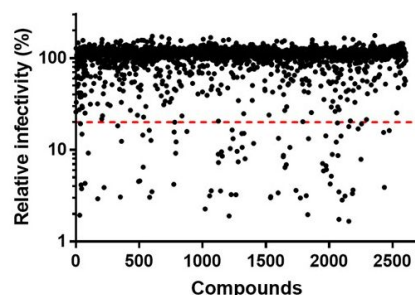


図 3: FDA承認薬2655化合物のスクリーニング結果

FDA 承認薬 2655 化合物のスクリーニングを行った結果、5 μ M にて 80%以上感染を抑制する化合物を 37 種類同定した(図 3)。更に、VSV- Δ G-VSV-G を用いた評価も行った結果、VSV- Δ G-CCHFV-G の感染を特異的に阻害する化合物を複数同定した。

(5) 上記で同定した化合物は、Hoti 株以外のウイルス株由来 VSV- Δ G-CCHFV-G や VSV- Δ G-HAZV-G の感染も阻害することが認められ、汎オルソナイロウイルス侵入阻害剤であることが示唆された。更に作用機序を解析するために、(3) で開発した膜融合アッセイを用いて評価した。その結果、それら化合物は濃度依存的に膜融合を阻害することが認められた(図 4)。従って、それら化合物は CCHFV-G 依存的な膜融合を標的とすることで、ウイルスの細胞侵入を阻害することが分かった。

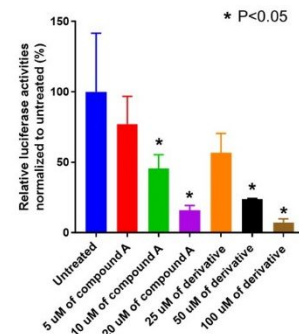


図 4 : 同定した化合物のCCHFV膜融合阻害効果

(6) 共同研究者より分与して頂いた CCHFV に対する中和抗体(モノクローナル抗体)の効果も、CCHFV Hoti 株由来 VSV- Δ G-CCHFV-G を用いて評価した結果、濃度依存的に感染を阻害することが認められた(図 5)。一方、VSV- Δ G-HAZV-G の感染は上記の中和抗体で阻害されなかった。この結果から、血清型が同じと考えられている CCHFV と HAZV は、中和抗体への反応性が異なることが分かった。

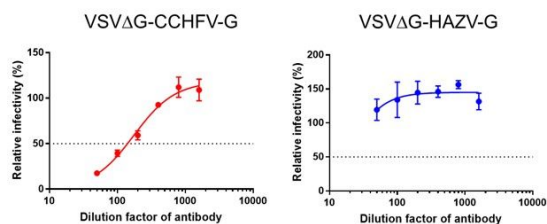


図 5 : CCHFV-G に対する抗体の中和活性

(7) CCHFV の表面糖タンパク質の性状解析を目的として、シュードタイプウイルスに様々な外的刺激を加え、その感染性を評価した。その結果、VSV- Δ G-CCHFV-G は、その他の出血熱ウイルスや VSV の表面糖タンパク質を持つシュードタイプウイルスに比べて、酸性 pH に対する耐性が極めて低いことが分かった(図 6)。一方、温度感受性や各種血清(ヒトやその他動物由来)への反応性については、VSV- Δ G-CCHFV-G と他のウイルスとの顕著な違いは認められなかった。

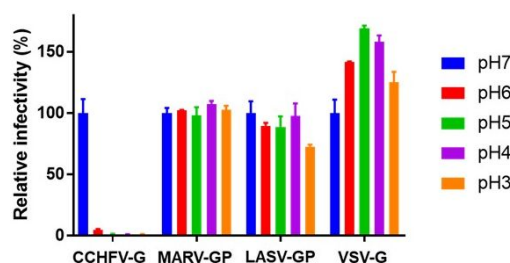


図 6 : 酸性 pH に対する CCHFV-G の高い感受性

(8) 本研究により、CCHFV の複数のウイルス株や HAZV の G をそれぞれ持つシュードタイプウイルスの開発、及び CCHFV-G を介した膜融合を定量可能なアッセイ系の開発に成功した。それらを用いて、膜融合を標的とする汎オルソナイロウイルス侵入阻害剤を同定し、CCHFV の膜融合が治療標的となる可能性を見出した。これらは今後、CCHFV の感染過程や病原性発現機序の解析にとって有効なツールとなることが期待される。更に、それらツールを用いることで、CCHFV に特異的な中和抗体への反応性や酸性 pH への感受性も発見した。このことは、CCHFV の病原性発現機序の解明や治療法開発への糸口となることが期待される。

(9) 今後は、本研究により開発したシュードタイプウイルスや膜融合アッセイ等を用いて、CCHFV-G の詳細な性状解析や、細胞侵入過程を制御する宿主因子の探索を行う予定である。また本研究では、CCHFV のウイルス株間での比較検討を十分に実施出来なかった。ヒトに対して病原性の低い AP92 株などを由来とするシュードタイプウイルスも作製することで、今後はウイルス株間での相違点をより明確にし、その分子機序を解析していく。更に、現在海外などでヒトや動物サンプルの収集を行っており、本研究で開発したシュードタイプウイルス等はそれらの血清学的調査にも役立つことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Hirano Minato, Sakurai Yasuteru, Urata Shuzo, Kurosaki Yohei, Yasuda Jiro, Yoshii Kentaro	4. 巻 200
2. 論文標題 A screen of FDA-approved drugs with minigenome identified tigecycline as an antiviral targeting nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105276 ~ 105276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2022.105276	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 Imamura Keiko, Sakurai Yasuteru, Enami Takako, Shibukawa Ran, Nishi Yohei, Ohta Akira, Shu Tsugumine, Kawaguchi Jitsutarō, Okada Sayaka, Hoenen Thomas, Yasuda Jiro, Inoue Haruhisa	4. 巻 11
2. 論文標題 iPSC screening for drug repurposing identifies anti RNA virus agents modulating host cell susceptibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13153	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0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新規侵入阻害剤の同定
3. 学会等名 第63回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuteru Sakurai
2. 発表標題 Development of an efficient entry assay for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus to identify novel entry inhibitors
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗ウイルス剤	発明者 阿部 高明、安田 二 朗、櫻井 康晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-094545	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を治療及び／又は予防する方法、医薬	発明者 北瀬、森田公一、安 田二郎、櫻井康晃、 他4名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、Z0001-5092	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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)	長崎大学・高度感染症研究センター・教授 (17301)	
研究協力者	好井 健太郎 (Yoshii Kentaro)	長崎大学・高度感染症研究センター・教授 (17301)	
研究協力者	黒崎 陽平 (Kurosaki Yohei)	長崎大学・高度感染症研究センター・准教授 (17301)	
研究協力者	吉川 禄助 (Yoshikawa Rokusuke)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	
研究協力者	平野 港 (Hirano Minato)	長崎大学・高度感染症研究センター・助教 (17301)	

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			
米国	ボストン大学			
英国	イギリス公衆衛生庁	ロンドン大学衛生熱帯医学大学院	リバプール大学	
ドイツ	Friedrich-Loeffler-Institut			