

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 8 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640096

研究課題名(和文) マウスコロナウイルスによる腫瘍融解を目的とした細胞標識アダプターの開発

研究課題名(英文) Molecular adapter of the mouse hepatitis virus infection to utilize for oncolysis

研究代表者

松山 州徳 (Matsuyama, Shutoku)

国立感染症研究所・ウイルス第三部四室・室長

研究者番号：90373399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肝炎ウイルス(MHV)はマウスの細胞によく感染し、細胞傷害を引き起こす。このウイルスはマウスCEACAM1aをレセプターとして感染するが、蛋白分子の中でウイルスレセプターの機能をもつ部位は74アミノ酸と比較的小さい。本研究では、細胞とウイルスの間に入り、ヒト細胞へのMHV感染を可能にする「細胞標識アダプター」の作成を試みた。実際に作成したのは、IgGにCEACAM1aを固定したものである。このアダプターを培養細胞に添加し、もともとレセプターの無い細胞にMHVの感染を試み、MHVを腫瘍溶解性ウイルスとして利用するための可能性を探った。現在までに効率の良いアダプターの作成には至っていない。

研究成果の概要(英文)：A murine coronavirus, mouse hepatitis virus (MHV), infects mouse cells and induces cell death. Our purpose of this study is to develop a molecular adaptor of MHV infection to induce oncolysis in target cells. This virus infects cells using a cell surface protein CEACAM1a. MHV is able to infect human cells when the expression plasmid of CEACAM1a was transfected. The 74 amino acid sequence of N-terminal domain in CEACAM1a is known to have a receptor function for MHV infection, and the binding ability of CEACAM1a to MHV is stable after denaturation with boiling. First, we had studied to find a minimum domain of viral receptor function in CEACAM1a, then the minimum domain was connected to the IgG, which named "MHV-adaptor", to recognize the cell surface protein of human derived cell lines. In this moment, we unfortunately have not developed the functional MHV adaptor, yet.

研究分野：腫瘍学 ウイルス学

キーワード：MHV CEACAM1a

1. 研究開始当初の背景

マウスのコロナウイルス(マウス肝炎ウイルス、MHV)を腫瘍融解性ウイルスとして利用するための、基礎的研究をおこなった。これまで腫瘍溶解性ウイルスには、ワクシニアウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、単純ヘルペスウイルスが採用され研究されている。本研究はこれにMHVを加える試みである。腫瘍融解を目的とした新たなウイルス種を開発することは、用途に応じた使い分けの選択肢を増やすことにおいて、価値があると思われる。MHVは、動物実験施設のマウスに感染するウイルスとして知られている。1970年代からよく研究されており、症状の多様性とその感染メカニズムを説明する論文が多数報告されている。申請者はMHVのスパイク(S)蛋白の解析を基にした、ウイルスの細胞侵入機構の研究をおこなっている。

MHVのレセプターはマウスの免疫グロブリンスーパーファミリーに属するCEACAM1aという細胞表面の糖蛋白である。MHVは非常に高い種特異性を示すが、CEACAM1aが種特異性を決める生体側の因子である。CEACAM1aは細胞表面でMHVのS蛋白と結合し、S蛋白の構造変化を誘導し、ウイルス膜と細胞膜を引き寄せ融合させることによって、ウイルスを細胞侵入させる。通常、ヒトに由来する細胞にMHVは全く感染しないが、一旦CEACAM1aを発現させると、あらゆる細胞、特にHeLa細胞によく感染し、細胞を破壊するようになる。CEACAM1aは4つのドメインから構成されているが、N末端の74アミノ酸(Nドメイン)がS蛋白結合部位であり、NドメインだけでS蛋白を活性化できることが解っている。さらにレセプター結合の特異性を決める部分はNドメインの中の6つの連続したアミノ酸配列であると考えられており、この6アミノ酸を残して機能単位をどこまで小さくできるのかを決めることはこの研究の一つの目標でもある。またCEACAM1aは界面活性剤中で煮沸変性させてもS蛋白への結合能を維持できることから、様々な化学修飾に耐えてレセプター機能が維持されると予想できる。(図1)

またMHVには様々な特徴をもつ株が分離されており、腫瘍融解に利用する場合、細胞の性質に従ってウイルスを選択することができる。MHV-srr7株はレセプター結合のみで細胞侵入が成立し、MHV-2株はプロテアーゼを必要とし、MHV-A59は低いpHを必要とし、MHV-JHM株は細胞から細胞への拡散にレセプターを必要としない性質をもつ。一方、これらウイルスのシュードタイプや欠陥干涉粒子(DI)を用いれば、遺伝子導入ベクターとして利用することも可能となるはずである。本研究計画では、MHVを様々なヒトの細胞に特異的に感染させるために、

CEACAM1aを遺伝子工学的に改変し、細胞とウイルスの間で働く「アダプター」の作製を試みる。Fcレセプター(FcR)やプロテインAのような抗体認識蛋白をCEACAM1aに結合したり、あるいは抗腫瘍マーカー抗体に直接結合し、これでヒト細胞を標識することにより、MHVの特異的な細胞侵入を可能にさせる。本研究期間内に、CEACAM1aアダプターを作成し、培養細胞を使って感染実験をおこない、利用可能性を見極める。ウイルスの改変や動物感染実験は本期間内には行わない。

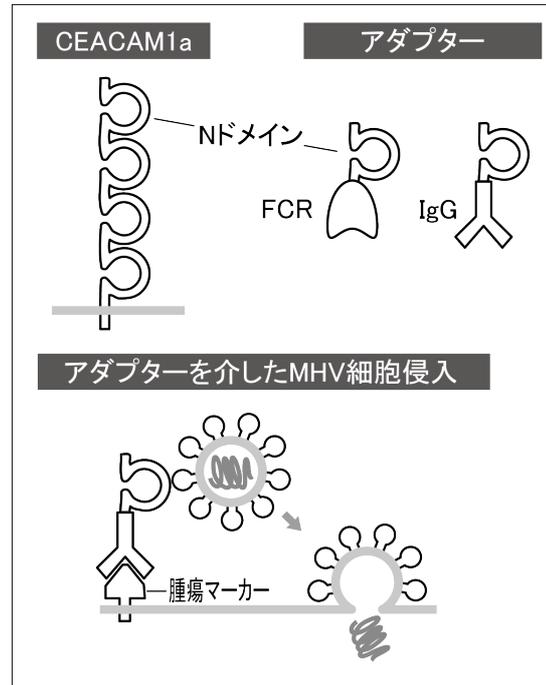


図1 ウイルスアダプターの作成モデル

2. 研究の目的

本研究計画では、MHVを様々なヒトの細胞に特異的に感染させるために、CEACAM1aを改変し、細胞とウイルスの間で働く「アダプター」の作製を試みる。まず、CEACAM1aのレセプター機能として、最小限のドメインを見つけ出し、続いてCEACAM1aをIgGに結合させ、ヒト細胞を標的とすることにより、MHVの特異的な細胞侵入を可能にさせる。

3. 研究の方法

3-1. MHVレセプターの機能の最小単位の解析

マウスCEACAM1aのMHVレセプター機能(MHVスパイクへの結合機能)の最小単位を決定するために、まず、立体構造モデルから構造が安定すると予想されるドメイン部位を予測し、下記 ~ のアミノ酸配列について、合成ペプチドを合成した。また下記についてはバキュロウイルスを用いた蛋白大量合成系で作成し、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿、Hisタグ精製を利用して精製し

た。

TTAIDK (6aa),
GNTTAIDKE (9aa),
YKGNTTAIDKEIARFVPNSN (20aa),
GAFAWYKGNTTAIDKEIARFVPNSNMNFTG
QAY (33aa),
GAFAWYKGNTTAIDKEIARFVPNSNMNFTG
QAYSGREIYSNGSLLF (47aa)
EVTIEAVPPQVAEDNNVLLL VHNLPALG
AFAWYKGNTTAIDKEIARFVNSNMNFTGQ
AYSGREIYSNGSLLF (Nドメイン 74aa)

3-2. 最小単位 MHV レセプターの機能解析
Viral overlay protein blot (VOPB) アッセイにより、上記ペプチドのウイルス結合活性を調べた。この方法は、PVDF 膜にドットプロット固定したペプチドにウイルスを吸着させ、抗ウイルス抗体 (anti-MHV spike #2,3,7mix) と抗マウス IgG-HRP0 にて検出するものである。

またウイルス中和によるペプチドの結合活性も調べた。MHV (10^2 pfu) に上記ペプチドを、1 nM ~ 10 μ M の濃度で混和し、37C で 60 分保温し、その後 MHV 感受性の DBT 細胞に感染させた。

3-3. MHV アダプターの作成

ヒト風邪コロナウイルス (NL63) と重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスのレセプターはヒト ACE2 (アンジオテンシン変換酵素 2) である。まず性質のよく解析されており、細胞での発現を SARS コロナウイルスを感染させることにより確認できる、上記のヒト ACE2、について、これらに対する抗体を購入し、クロスリンカー (BS3) を用いて、~ のペプチドと架橋させ、G50 セファロースカラムを用いて精製した。

3-4. MHV アダプターの機能解析

MHV アダプター# (50nM 相当) を、マウス CEACAM1a 無発現細胞 (HeLa 細胞及び BHK21 細胞 / 96 ウェルプレート) に添加し、氷上に 60 分静置した後、PBS にて 2 回洗浄し、その後 MHV (10^2 pfu) を感染させた。感染の陽性コントロールとしてペプチド# (50nM 相当) を上記細胞に混和し、その後 MHV (10^4 pfu) を添加して spinoculation (3000rpm, 30 分遠心) をおこなった。18 時間後に感染の有無を、プラークを数えることにより定量した。

4. 研究成果

4-1. 最小単位 MHV レセプターの機能解析
作成したペプチドは、VOPB アッセイとウイルス中和アッセイにおいて、ペプチド# のみに強い MHV 結合活性 (図 2) とウイルス中和活性 (図 3) が認められた。当初はもっと小さい分子に活性が見られることを期待したが、実際に MHV レセプターの最小単位は 74 アミノ酸部位であった。

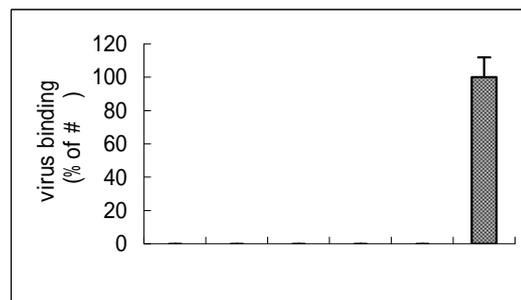


図2 ペプチド ~ の MHV 結合活性(VOPB Assay)

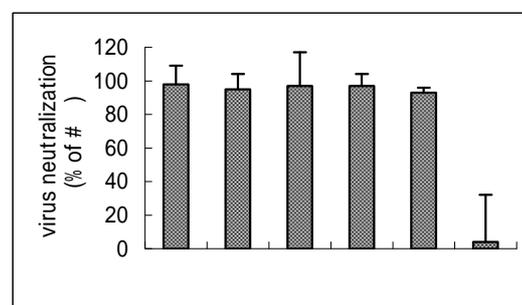


図3 ペプチド ~ の MHV 中和活性(DBT 細胞を使ったウイルス感染値の測定)

またペプチド# について spinoculation をおこなうことにより、細胞表面で MHV を活性化する性質が有ることを確認した (図 3 右)。続いて、クロスリンカーを用いて抗 ACE2 抗体にペプチド# を架橋したものを、約 25nM を 400 μ L 回収することができた。

これを上記方法のように培養細胞 (HeLa229, BHK21) に吸着させ、MHV (10^4 pfu) の感染誘導を試みたが、今のところ感染を確認できていない。ペプチド# においてのみ、わずかな感染促進がみられたが、これは細胞表面に吸着した MHV をレセプター分子が活性化することによって感染したと考えられ、この現象を我々は既に報告している (レセプター非依存的感染)。この感染の成立を spinoculation により、さらにウイルスの吸着を高めることにより、図 4 の右側に見られるような感染の増幅が見られる。

上記の結果より、ペプチドによって MHV の感染を成立させることは十分可能であるが、今のところ効率の良い MHV アダプターの開発に

は至っていない。問題点としては、クロスリンカー架橋によりレセプターの機能が失活したことが考えられ、架橋法を検討する必要がある。

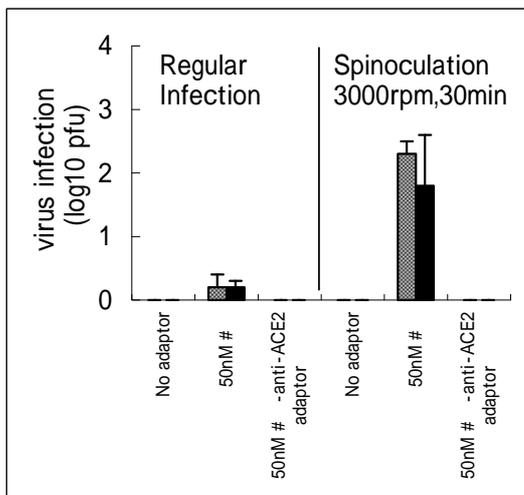


図4 ペプチドによるウイルス感染価の促進

5. 主な発表論文等
無し

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

松山州徳 (MATSUYAMA, Shutoku)
国立感染症研究所
ウイルス第三部第四室 室長
研究者番号: 90373399

(2)研究分担者

無()

研究者番号:

(3)連携研究者

無()