

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460563

研究課題名(和文) ウイルス分離、経代が本来のウイルスの細胞侵入方法に与える影響の解析

研究課題名(英文) Studies on the effect of the virus isolation and passage for the original viral entry route

研究代表者

白戸 憲也 (SHIRATO, Kazuya)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：40415477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くのエンベロープウイルスはエンドサイトシス経路で細胞侵入する。ヒトコロナウイルス(HCoV)229EもエンドソームのカテプシンLを利用すると考えられてきた。本研究では、我々はHCoV229Eの臨床分離株はATCC株のような細胞順化株とは異なり、エンドソームのカテプシンLよりも細胞表面のTMPRSS2の利用を好む事を発見した。エンドソームはTLR認識など、自然免疫応答の主要な場所であり、本来のHCoV229Eはおそらく細胞表面からの細胞侵入によってエンドソームを飛び越えるように進化したと考えられる。ATCC株におけるこれらの性質は、長い間の細胞継代によって失われたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Many enveloped viruses enter cells through endocytosis. Viral spike proteins drive the fusion of viral and endosomal membranes to facilitate insertion of the viral genome into the cytoplasm. Human coronavirus 229E (HCoV-229E) utilizes endosomal cathepsin L to activate the spike protein after receptor binding. Here, we found that clinical isolates of HCoV-229E preferentially utilize the cell surface protease TMPRSS2 rather than endosomal cathepsin L. The endosome is a main site of Toll-like receptor recognition, which then triggers an innate immune response; therefore, HCoV-229E presumably evolved to bypass the endosome by entering the cell via TMPRSS2. Thus, the virus uses a simple mechanism to evade the host innate immune system. Therefore, therapeutic agents for coronavirus-mediated diseases, such as severe acute respiratory syndrome (SARS) and Middle East respiratory syndrome (MERS), should target cell surface TMPRSS2 rather than endosomal cathepsin

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトコロナウイルス 継代 カテプシンL TMPRSS2

### 1. 研究開始当初の背景

コロナウイルス(CoV)はプラス鎖 1 本鎖 RNA をゲノムにもつエンベロープウイルスで、様々な動物に呼吸器疾患、消化器疾患、肝炎、脳炎など多様な疾患を引き起こすことが知られている。また CoV は比較的種特異性が高く、多くの動物がそれぞれに固有の CoV を持つことが知られている。ヒトに固有のヒトコロナウイルス(HCoV)はこれまでに 229E、OC43、NL63、HKU-1 の 4 株が分離されているほか、ヒトに高病原性の CoV として中東呼吸器症候群(MERS)-CoV、重症呼吸器症候群(SARS)-CoV の 2 株が知られている。HCoV はヒトに対して鼻風邪あるいは上気道炎を引き起こすが、まれに小児で重症化する。

一般に CoV の細胞侵入は、ウイルス粒子のスパイク(S)を構成する糖蛋白である S 蛋白質が、細胞のウイルス受容体を認識し、続いてプロテアーゼによって解裂を受け、構造変化を起こすことで膜融合を誘導する。従ってプロテアーゼが、膜融合誘導の最終的なトリガーとなっており、ウイルス受容体とともに、プロテアーゼ感受性が、そのウイルス感染の特異性を決めているとも言える。

これまでの研究により、HCoV は主に endosome 経路で細胞に感染し、カテプシン群の酵素(主にカテプシン L)を用いて S 蛋白質の解裂を行い、late endosome から細胞侵入していることがわかっている。一方、細胞表面に発現している膜型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を用いることも出来、この場合は early endosome あるいは細胞表面から細胞侵入していると考えられる。我々の研究により、MERS-CoV、SARS-CoV は呼吸器上皮細胞に近い性質を持つ Calu-3 細胞において、late endosome から細胞侵入せず、ほとんどが TMPRSS2 を利用して early endosome あるいは細胞表面から細胞侵入していることがわかっている(J Virol 2013 87:6150 等)。

一方で、2004 年に仙台市で、2008 年に新潟市で分離された HCoV-229E の臨床株と、培養細胞で長い間継代されてきた ATCC 株 (VR-740)とを比較すると、両者ともに HeLa 細胞ではカテプシン群の酵素を利用して late endosome から細胞侵入するが、TMPRSS2 存在下では、ATCC 株はあまり TMPRSS2 を利用しないが、臨床株の大半は TMPRSS2 を利用して細胞侵入している可能性が見られ、培養細胞順化株と臨床株で細胞侵入方法の違いが見られることがわかった。

### 2. 研究の目的

ATCC 株は実験室株として長い間培養細胞で継代され続けている株であるが、臨床株にはほとんど継代歴がない。前述のように臨床株はカテプシンよりも TMPRSS2 を利用して細胞侵入することを好んでいるが、TMPRSS2 は肺胞上皮細胞で多量に発現することがわかっており、実際の生体内ではウイルスは TMPRSS2 を使って感染しているこ

とが示唆されている。従って、実験室株は経代に用いた培養細胞に順化した性質に変化しており、実際の臨床株とは感染機構が異なる可能性が示唆される。そこで本研究では HCoV を用いて、実験室株と臨床株との間の細胞侵入機構の違い、特にプロテアーゼ感受性の違いに関して詳細を明らかにし、ウイルス分離、経代により臨床株本来の性質が変化するという事を証明する事を目的とした。

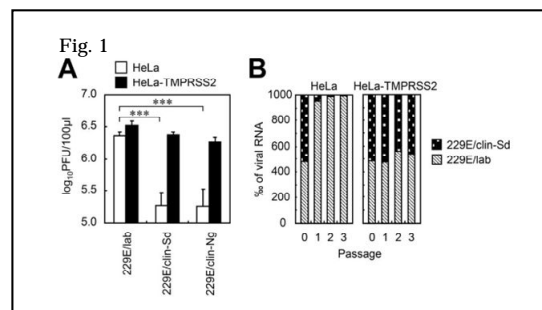
### 3. 研究の方法

HCoV229E を用い、ATCC 株と臨床分離株の S 蛋白質におけるプロテアーゼ認識の差に関する解析を行った。

ATCC 株として VR-740(lab)、臨床分離株として Sendai-H/1121/04(clin-Sd) および Niigata/01/08(clin-Ng)(J Gen Virol. 2012. 93:1908-17)を用いた。ウイルスの複製と力価測定は HeLa 細胞を用いた。TMPRSS2 を恒常的に発現する HeLa-TMPRSS2 を用いた。プロテアーゼインヒビターはシステインプロテアーゼインヒビターとして E64D、カテプシン L、B への特異的インヒビター、TMPRSS2 インヒビターとして Camostat を用いた。ウイルスの細胞侵入を比較するため、HCoV229E の S 蛋白質を被った VSV シュードタイプウイルスを作製して用いた。S 蛋白質への変異は site direct mutagenesis 技術を用いてプラスミドへ直接変異を導入した。対照として、ヒト呼吸器上皮(HBTE)細胞の Air-liquid-Interface(ALI)培養とこれでは複製できない HCoV-HKU1 の臨床分離株 (NIID/F15/14)を用いた。

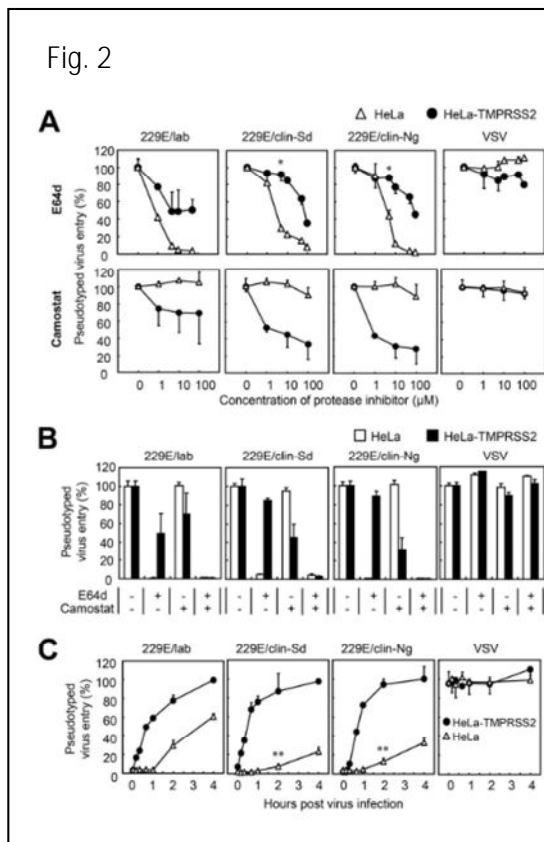
### 4. 研究成果

229E は HeLa 細胞で複製できるが、ATCC 株と比べて臨床株は 1log ほど複製効率が悪いことがわかっていた (Fig.1a)。一方で TMPRSS2 を恒常発現させた HeLa-TMPRSS2 細胞では ATCC と臨床株の複製効率は同程度であった (Fig.1a)。さらに ATCC 株と臨床株 (clin-Sd) を等量混ぜ、HeLa 細胞および HeLa-TMPRSS2 細胞それぞれで 3 代継代したところ、TMPRSS2 存在下では ATCC 株と臨床株は共存出来たが、HeLa 細胞では継代 2 代目には臨床株が消えていた。以上から臨床株は HeLa 細胞で効率よく複製するための機能を持っていないことを示唆した。



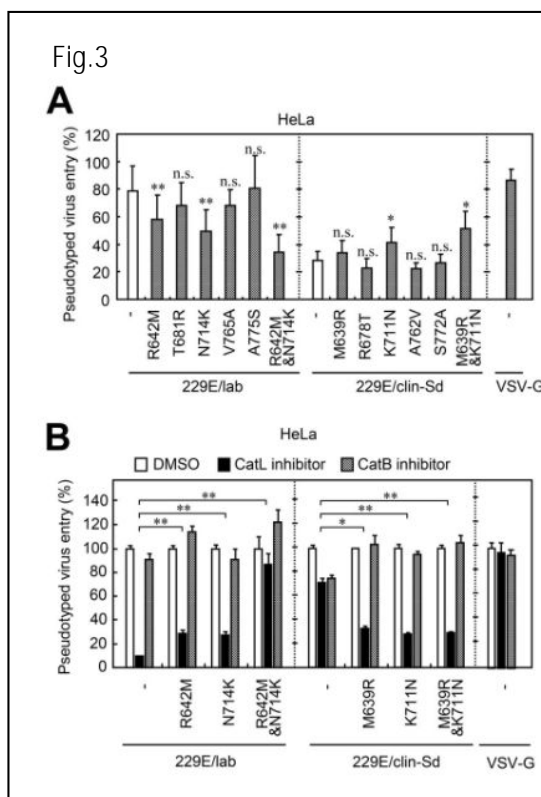
次に ATCC 株と臨床株との間のプロテアーゼ

感受性について検討した (Fig.2)

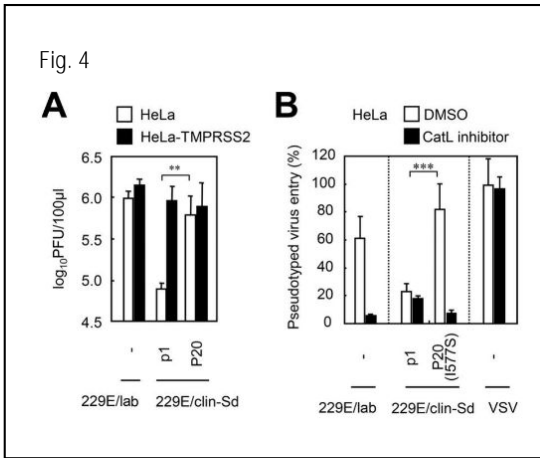


229E の S を被った VSV シュードタイプウイルスとプロテアーゼインヒビターを用いた。我々のこれまでの研究により ATCC 株はおもにカテプシン L を用いて細胞侵入することがわかっており、HeLa 細胞では濃度依存的に細胞侵入を阻止した。一方で、TMPRSS2 インヒビターである camostat により、HeLa-TMPRSS2 細胞での細胞侵入は阻止された。両者の違いはそれぞれの効き方であった。5  $\mu$ M の E64D を HeLa-TMPRSS2 細胞に作用させた時、ATCC 株は約 50% 感染阻止したが、臨床株には約 5% しか効果がなかった。同量の camostat を作用させた時、ATCC 株の感染阻止は 30% ほどであったが、臨床株は 50% 阻止できていた (Fig.2a)。これらより臨床株はカテプシン L よりも TMPRSS2 を好んでいることを示した。同様の傾向は 10  $\mu$ M のインヒビターを作用させた場合でも見られ、HeLa-TMPRSS2 では E64D と camostat をともに作用させることで、229E の細胞侵入を抑えることが出来た (Fig.2b)。以上より、ATCC 株、臨床株ともに細胞侵入にはカテプシン L と TMPRSS2 の 2 つのルートを使っており、ATCC 株はカテプシン L、臨床株は TMPRSS2 を好むことが明らかとなった。さらに 10  $\mu$ M の E64D と camostat をウイルス吸着後に時間を追って作用させ、ATCC 株の細胞侵入の速さを調べると、臨床株は TMPRSS2 を利用して ATCC 株よりも早く細胞侵入していた。一方で HeLa 細胞においては吸着 1 時間で臨床株は 7% しか細胞侵入できていないが、ATCC 株は 30% 侵入しており、TMPRSS2 非

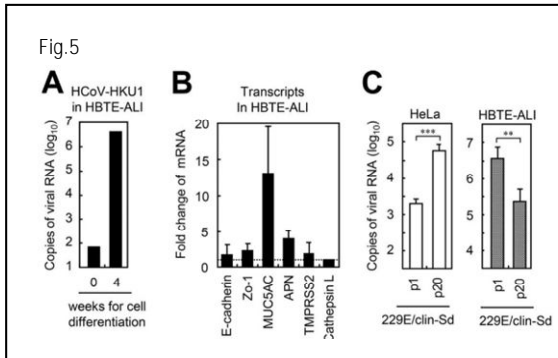
存在下である HeLa 細胞では ATCC 株のほうが臨床株より早く細胞侵入することが示された。



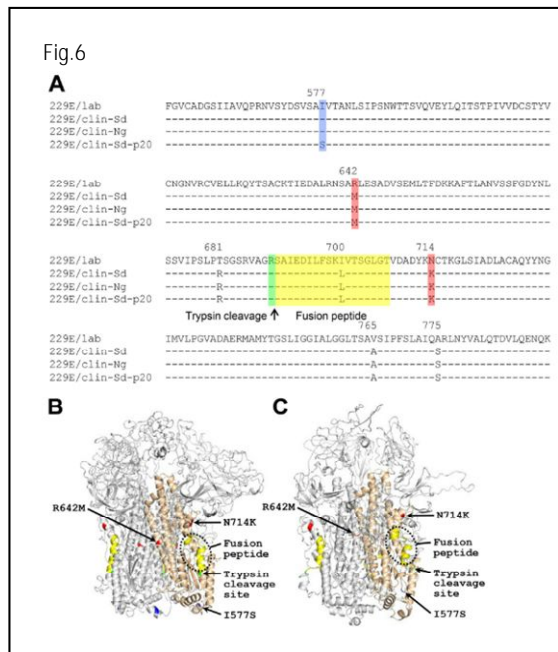
コロナウイルスの S 蛋白質は受容体の結合に係わる S1 と構造変化に係わる S2 に分けられる。S2 領域には多くのコロナウイルスで配列が保存されている領域 (VHCR) があり、これがウイルス膜と細胞膜の融合に関する fusion peptide 配列とも考えられている。ATCC 株と臨床株の間で、VHCR 領域の近辺に 5 つのアミノ酸違いが見られる。ATCC 株の S 蛋白質における R642M、T681R、N714K、V765A、A775S である。これら 5 つの変異に注目し、ATCC 株と臨床株 (clin-Sd) でそれぞれを入れ替え、VSV シュードタイプウイルスを用いて細胞侵入を調べた (Fig.3)。HeLa-TMPRSS2 細胞における細胞侵入を 100% とし、HeLa における細胞侵入を表すと、R642M、N714K の変異で ATCC 株の細胞侵入が減少し、臨床株でこれらの変異に相当する M639R、K711N の変異で臨床株の細胞侵入が増加する傾向が見られた。これら 2 つの変異をともに導入することで有意な差が見られた。これらの変異体で見られる細胞侵入の変化がカテプシン L への感受性の差によるか否かをカテプシン L インヒビターによって調べると、R642M、N714K の変異を導入すると ATCC 株の細胞侵入はカテプシン L インヒビターで抑制できなくなり、臨床株の細胞侵入が抑制できるようになる、という逆転現象が見られた。以上より、ATCC 株と臨床株では S 蛋白質のカテプシン感受性が異なり、ATCC では高感受性、臨床株は低感受性であるが、これらは VHCR 周辺の 2 点の変異で逆転することが示された。



ATCC 株は 1960 年代に分離されて以来、非常に長い継代歴を持つウイルスである。従って ATCC 株と臨床株とのカテプシン感受性の差が継代によって得られたものかどうかを調べるために、臨床株(clin-Sd)を HeLa 細胞において 20 代継代し、その性質を調べた(Fig.4)。20 代継代株では S 蛋白質に S574I の変異(ATCC 株における I577S)が見られた。先に示したように、臨床株は HeLa 細胞におけるウイルス複製は ATCC 株より 1log 低いが、20 代継代株(p20)ではその差は無くなり、ATCC 株と同等のウイルス複製を示すようになった。HeLa-TMPRSS2 細胞における細胞侵入量を 100%とし、HeLa 細胞におけるウイルス量を表すと、カテプシン L 感受性の差から ATCC 株では 60%、臨床株では 20%ほどとなる。しかし p20 株では 80%ほどを示し、ATCC 株と同等に HeLa 細胞へ細胞侵入できるようになっていた。



次にヒト呼吸器上皮(HBTE)細胞の Air-Liquid-Interface(ALI)培養を用い、*In vivo* における呼吸器上皮感染に似た環境下において、臨床株と p20 株の感染を比較した(Fig.5)。HCoV-HKU1 は HBTE 細胞の ALI 培養でのみ複製可能であり、今回実験で用いた ALI 培養でも複製した(Fig.5a)。さらにムチン遺伝子である MUC5AC の発現増加が ALI 培養の分化マーカーとなるが、発現確認が行えた(Fig.5b)。HeLa 細胞においては前述のように臨床株の複製は低く、HeLa に順化した p20 株のほうが複製は高い。しかし ALI 培養においては臨床株の方が複製は高く、HeLa 細胞への適応は ALI 培養における複製には不利となることが示された。



M642R、N714K および p20 における S574I 変異(ATCC 株における I577S)と VHCR 領域(黄色部分)の位置関係は Fig.6 のようになる。またこれまでに構造が報告されている MHV(Fig.6b)あるいは HKU1 (FIG.6c)の S 蛋白質の構造を基に、229E の S 蛋白質構造を解析すると上図のようになる。これらの変異の構造上の部位はバラバラで、これらの変異が直接的にプロテアーゼの認識部位となっているとは考えにくい。VHCR 領域直前の R が、プロテアーゼによる S 蛋白質の最終的な活性化に非常に重要であると考えられている。M642R、N714K の変異、I577S の変異によって、プロテアーゼ認識部位が構造上の露出に影響を与え、カテプシン L の接近性(accessibility)に関係していると考えられる。

本研究により、HCoV229E は従来カテプシン L を利用してエンドソーム経路で感染していると考えられていたが、実際にフィールドで流行している臨床株は、TMPRSS2 を利用して感染し、カテプシン L 感受性は低い事が明らかとなった。また ATCC 株のカテプシン L 感受性は培養細胞における継代によって獲得されたことが示唆された。TMPRSS2 を利用した細胞表面あるいは early endosome からの感染はカテプシン L を利用した late endosome からの感染よりはるかに効率が良いこともわかった。Endosome は toll-like receptor による認識など、多くの免疫反応のトリガーとなる認識が行われ、ここに長らくとどまることはウイルスにとって不利益と考えられる。実際にヒトで流行しているウイルス株はこれらの認識を回避し、免疫応答を避けるために、TMPRSS2 を利用した感染に特化している可能性が示唆された。さらに ATCC 株のような順化株を用いた実験により、ウイルスの細胞侵入を阻止するためにカテプシン L インヒビターなどが治療薬の候補となると考えられてきたが、これらの知見は臨

床株には全く通用しないことも判明した。実際の治療の用いるための薬剤開発には臨床株本来の性質を維持した株を用いねばならない、という事も示唆した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shirato K, Kanou K, Kawase M, and Matsuyama S. Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. 2017. J Virol. 91(1):e01387-16.

〔学会発表〕(計 1 件)

〔図書〕(計 1 件)

白戸憲也 LABIO21 No.64 2016年4月号「ヒトコロナウイルス」 p17-20. 日本実験動物協会、東京、2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 白戸 憲也 (SHIRATO, Kazuya)

(国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官)

研究者番号：40415477

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者