

200400596A

厚生労働科学研究費補助金

平成16年度

新興・再興感染症研究事業

SARS コロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究
(H16-新興-9)

研究報告書

平成17年3月

主任研究者 田口文広
(国立感染症研究所)

目 次

SARS コロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究	1
主任研究者：田口 文広 (国立感染症研究所ウイルス第3部)	
SARS の重症化機構に関する研究	13
分担研究者：田口 文広 (国立感染症研究所ウイルス第3部)	
ワクチンの免疫効果の解析	17
分担研究者：横田 恭子 (国立感染症研究所免疫部)	
SARS コロナウイルスに対する DNA ワクチンの開発に関する研究	21
分担研究者：岡田 全司 (国立病院機構近畿中央胸部疾患センター)	
高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の SARS 生ワクチンとしての応用	27
分担研究者：石井 孝司 (国立感染症研究所ウイルス第2部)	
中和エピトープの解析	31
分担研究者：黒澤 良和 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所)	
抗 SARS-CoV 剤の開発に関する研究	35
分担研究者：山本 典生 (東京医科歯科大学)	
フェレットおよびネコ ACE2 の同定と SARS-CoV レセプター としての機能	37
分担研究者：山田 靖子 (国立感染症研究所動物管理室)	
猫コロナウイルス感染症に関する研究	43
分担研究者：宝達 勉 (北里大学獣医畜産学部)	
動物コロナウイルスとそのウイルス受容体との相互作用の解析 に関する研究	53
分担研究者：池田 秀利 (動物衛生研究所感染症研究部)	

総括研究報告書

SARS コロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究

主任研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第三部）

研究要旨：重症急性呼吸器症候群（SARS）は新型コロナウイルス（SARS-CoV）によって引き起こされる新興感染症である。本研究は、SARS ワクチン、抗ウイルス剤開発のための包括的研究を行うものである。本年度の研究では以下の成果が得られた。

（１）重症化機構に関する研究：SARS の重症肺炎の発生機構について、プロテアーゼ存在下では SARS-CoV 増殖は非存在下と比べると 10–100 倍高いことを明らかにし、プロテアーゼが重症肺炎の重要な一因子であることを示唆した。（２）ワクチン開発に関する研究：UV 照射 SARS-CoV 粒子はマウスで中和抗体や T 細胞応答を長期に誘導することが可能であった。また、SARS-CoV に対する種々の単クローン抗体及び SARS-CoV 抗原を発現するマウス B 細胞株を得た。SARS-CoV 遺伝子 cDNA を持つ発現ベクターを用いて、マウス及び SCID-PBL/hu でキラー T 細胞を介してワクチン効果を発揮する DNA ワクチンを開発した。SCID-PBL/hu を用い、SARS-CoV 増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導するワクチンを作製した。SARS-CoV 遺伝子を持つ組換えワクシニアウイルス DIs は、マウスで液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導し、マウスは SARS-CoV 感染に抵抗性を示した。SARS-CoV S 蛋白を宿主細胞に強制発現させて、発現された分子に対する抗体をヒト抗体ライブラリーを利用して、効率的に単離するシステム開発を実施した。

（３）抗ウイルス剤開発に関する研究：ヒトで用いられている抗ウイルス薬約 30 種類に関して抗 SARS-CoV 活性を調べ、HIV プロテアーゼインヒビターのひとつであるネルフィナビルが抗 SARS-CoV 活性を持つことを見出した。また、in silico screening によって高い抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤の同定に成功した（４）SARS 動物モデル及び動物コロナウイルスを用いた研究：SARS-CoV に対して高い感受性を持つフェレットのアンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）が SARS 受容体として活性があることが明らかになった。猫伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）の抗体介在性感染増強（ADE）発現にはウイルスレセプターは必要なく、Fc レセプターを介したエンドサイトーシスが考えられた。また、同じ血清型のウイルスの再感染で ADE が発現することが示唆された。豚伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）とその宿主受容体、プタアミノペプチダーゼ N（pAPN）の相互作用を解析することにより、pAPN-FLAG の一過性発現系が確立した。

分担研究者

横田恭子（国立感染症研究所免疫部）岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター）

石井孝司（国立感染症研究所ウイルス第二部）

黒澤和良（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）

山本典生（東京医科歯科大学医学部）

山田靖子（国立感染症研究所動物管理室）

宝達勉（北里大学獣医畜産学部）

池田秀利（動物衛生研究所感染症研究部）

A. 研究目的

本研究班の主要な目的は、致死率の極めて高い新興感染症である SARS に対する有

効で安全性の高いワクチン及び抗ウイルス剤を開発することである。この目的を達成するために、SARS-CoV に関する包括的な研究を以下の4点に焦点を当てて行う。

1) SARS の重症化機構の解明、2) 不活化 SARS-CoV、SARS-CoV 遺伝子を持つ組み換え DNA や組み換えワクシニアウイルスによる有効なワクチンの開発及びその基礎的な研究、3) 抗ウイルス剤の開発、及び4) ワクチンの有効性を評価する動物モデルの作成及び SARS-CoV のワクチン開発モデルとしての他の動物コロナウイルス研究である。1) 重症化機構解明のために、各種プロテアーゼのウイルス活性化について検討する。2) SARS-CoV に対する不活化ワクチンに関する研究では、UV 不活化 SARS-CoV をマウスに免疫し、液性及び細胞性免疫の誘導について検討すると共に、免疫マウスを用いて抗 SARS 単クローン抗体 (Mab) の作成を行う。DNA ワクチン研究では、SARS ウイルスの spike (S), envelope (E), membrane (M), nucleocapsid (N) 遺伝子を持つ組み換えベクターを作成し、その DNA ワクチンによる抗体産生、細胞性免疫の誘導について、検討する。更に、ヒトの生体内免疫解析モデルとして SCID-PBL/hu を用いる。同様に SARS-CoV 遺伝子を持つ組み換えワクシニアウイルスを用いた抗 SARS-CoV 液性、細胞性免疫能の誘導について検討する。また、抗体ライブラリーを用いて、SARS-CoV に対して中和活性の高い抗体を得る条件検討を行う。3) SARS-CoV に対する抗ウイルス剤開発では、既に人に使用が認められている他のウイルスに有効な抗ウイルス剤や *in silico* スクリーニングにより有効な薬剤を見い出すことが目的である。4) SARS-CoV に極めて感受性が高く、重篤な症状を示すことが報告されているフェレット ACE2 の SARS-CoV 受容体活性を検討するために、フェレット ACE2 遺伝子分離を行う。また、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) の抗体による感染増強機構 (ADE) が SARS でも危惧

されている背景から、FIPV の ADE 機構の解明、特にウイルスレセプター (VR) や Fc レセプター (FcR) の関与に関する研究をおこなう。プタ伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) では、コロナウイルスの一般的な受容体との結合に関する基礎的な研究を行うため、受容体発現ベクターや発現細胞の樹立が研究目的である。

B. 研究方法

本研究班では香港で分離された SARS-CoV 株 HKU39849 及びドイツ Ziebuhr 博士から分与された SARS-CoV Frankfurt-1 株とこれらから分離された S, M, E 及び N 遺伝子を用いた。

1) 重症化機構解明のための実験では、SARS-CoV の VeroE6 細胞での増殖に各種プロテアーゼがどの様に影響を与えるかを、ウイルスの感染性、S 蛋白の開裂性、リアルタイム PCR を用いた SARS-CoV mRNA 合成量を調べた。

2) 不活化ウイルスの作成は VeroE6 細胞に SARS-CoV を感染させ、培養上清を PEG 沈殿後蔗糖密度勾配で超遠心により粒子を精製した。これを UV で照射したものを不活化 SARS-CoV として用いた。不活化ウイルスの免疫には、各群 5 匹のマウスに UV 照射不活化 SARS-CoV 粒子を皮下にアラムアジュバント有り無しで投与した。7 週後同じ免疫を繰り返した。その後 7 日目にマウスの脾臓および所属リンパ節を採取して T 細胞機能を解析した。また、これらのマウスの血清を経時的に採取して血中抗体価を測定した。単クローン抗体 (Mab) の作成は、不活化 SARS-CoV を完全フロイントアジュバントで過免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞を用いて行った。組換え N 蛋白の作成は、N 遺伝子全体 (N)、N 末から 120 アミノ酸 (N1)、N 末半分 (N2) 及び C 末半分 (N3) を大腸菌発現システムである pET-SUMO プラスミドを用い発現し、大腸菌の細胞溶解液より N 蛋白を His-Tag を介して精製した。S 発現 B 細胞株の確立は、S 発現ベク

ターをマウス A20.2J(H-2^d)に electro-poration で導入して S を発現するマウス抗原提示細胞クローンを確立した。SARS-CoV の S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA を持つ発現ベクターを構築した。発現蛋白を選別する目的で His tag 利用し、真核細胞と大腸菌に S、M、N、E の各 cDNA の導入して蛋白を発現させた。これらをヒト免疫グロブリン染色体導入マウス (KM マウス) に免疫した。BALB/c、C57BL/6 マウスに S、M、N、E DNA ワクチンを筋肉注射し、血清中の抗体価を SARS DNA を導入した Cos 細胞に対する抗体結合反応と Vero 細胞を用いた感染中和抗体活性で測定した。中和試験は 96 穴 plate に撒いた Vero-E6 細胞を用いて、常法に従い行った。細胞性免疫 (キラー T 細胞) 活性は以下の方法によった。マウス II 型肺上皮 cell line (T7) に S、M、N DNA を導入し、これを抗原として用い、IFN- γ 産生によるキラー T 活性を測定した。また、T 細胞の増殖反応を BrdU で測定した。ヒト免疫応答解析モデル (SCID-PBL/hu) は、IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウト NOD-SCID マウスに健康人 PBL を投与し、作製した。これに DNA ワクチンを注射しヒト中和抗体価を測定した。SCID-PBL/hu を用いた抗原に対するヒト・キラー T 細胞の誘導は SARS 蛋白-パルス自己 B プラスト cell を標的細胞として用いた。HKU39849 株由来の各構造蛋白遺伝子を、トランスファーベクターを用い、相同組換え法により組み換えワクシニアウイルス DIs を取得した。発現の確認は、感染サル血清等を用いた FA 及びウエスタンブロット (WB) で行った。組換え DIs をマウスに投与し、SARS-CoV 構造蛋白に対する免疫誘導能の検討と、血清の中和能を調べた。また、組換え DIs で免疫したマウスへの SARS-CoV 感染実験を行った。抗体ライブラリーを用いて、SARS-CoV に対して中和活性の高い抗体検索を以下の方法で行う。目的とする遺伝子を細胞膜上

に発現し、抗体ライブラリーより、細胞に結合する抗体を多数単離する。発現細胞の膜タンパクをビオチン標識した後、膜タンパク質を可溶化する。抗体を用いた IP により抗原を単離し、ストレプトアビジンをプローブとした WB で抗原を同定する。抗原に対する抗体の SARS-CoV 中和活性を測定する。抗体を IgG 型ヒト抗体に変換して大量調製する。

3) 抗ウイルス剤開発研究では、経験および理論に基づいて抗 SARS-CoV 剤の候補となる物質を集め、それらの抗ウイルス活性を *in vitro* の系を用いて評価した。SARS-CoV の株としては FFM-1 株を用い、評価方法としては MTT assay, リアルタイム RT-PCR 等を用いた。

4) フェレットおよびネコの ACE2 遺伝子の塩基配列は、各臓器より抽出した RNA から作成した cDNA を用いた。既に報告されているヒト等の ACE2 塩基配列を参考に ORF 内部および末端側に共通プライマーを設計し、PCR およびシーケンシングに用いた。フェレット ACE2 の ORF 全長(2415bp)を PCR で増幅し、これを pTarget に組み込み発現ベクターを作成した。発現ベクターを HeLa229 細胞に導入し、Geneticin にて恒常的発現細胞を選択培養した。得られた恒常的発現細胞に SARS-CoV を接種し、培養上清中のウイルス価を VeroE6 を用いたプラーク法にて測定した。

ADE 発現における VR の関与は以下の様に行なった。SPF 猫の肺胞マクロファージに VR に対するモノクローナル抗体 (Mab) を反応後、ADE 活性を持つ Mab (抗 S 抗体)を反応させた FIPV を接種し、VR に対する MAb の存在が、FIPV の ADE 発現にどのように影響するかを調べた。また、FcR 陽性で VR 陰性の U937 細胞における ADE 活性の有無を調べた。血清型の違いと ADE 発現の関係については、SPF 猫に、I 型あるいは II 型 FIPV 感染耐過ネコ血清を皮下に受身免疫し、その 3 日後に I 型 FIPV KU-2 株を接種することにより

ADE が誘導されるか否かを調べた。TGEV レセプター-pAPN の発現ベクターの構築は、豚小腸上皮より分離した mRNA を用いた。pAPN 遺伝子をプラスミドにクローニングし、3'末に FLAG 配列を付加した pAPN 配列 (pAPN-FLAG) を得た。更に、ほ乳類細胞発現ベクター-pCAGGS に pAPN-FLAG 導入した発現ベクター (pAPN-FLAG/pCAGGS) を得た。NIH3T3 細胞における pAPN-FLAG の一過性発現は、遺伝子導入試薬を用いて pAPN-FLAG/pCAGGS を TGEV 非感受性のマウス NIH3T3 細胞に導入した。pAPN-FLAG 発現は、抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法 (IFA)、WB 法、フローサイトメトリー法 (FACS) によった。遺伝子導入細胞の TGEV 感受性は、TGEV TO163 株を接種し、抗 TGEV ネコ血清を用いた IFA によって鏡検した。また接種培養細胞に含まれる感染性ウイルスの力価を TGEV 感受性 CPK 細胞で測定した。

C. 研究成果

1) SARS-CoV は受容体 ACE2 に結合し、その後細胞内の endosome に取り込まれ、trypsin 様のプロテアーゼにより S 蛋白が活性化され、細胞内侵入するという endosomal pathway の可能性が提唱されている。我々は endosomal pathway を阻止する bafilomycin 処理細胞に SARS-CoV を氷温で吸着させ、trypsin の処理により、細胞表面からの SARS-CoV の感染を可能にすることができた。更に trypsin 以外にも thermolysin 等が同様の効果を示すことを見だし、SARS-CoV は環境にプロテアーゼがあると、本来の感染経路ではなく直接細胞膜から細胞内侵入する潜在能力があることが明らかにされた。自然感染で起こり得る様な低 moi 条件、即ち moi=0.0001 で感染させ、プロテアーゼ存在下、非存在下でのウイルス増殖を比較すると、存在下ではウイルス増殖が 100-1000 倍高くなることが判明した。このウイルス増殖亢進効果は、肺炎時に産生され

る主要プロテアーゼ elastase についても認められた。これらのことから、SARS-CoV の重症化肺炎の原因と思われる肺での高いウイルス増殖には、肺で産生される炎症性プロテアーゼが大きく関与していることが示唆された。

2) マウスに UV 照射 SARS-CoV 粒子を免疫すると、特異的 IgG 抗体が産生され、アラムアジュバントの添加により抗体価は一桁高くなった。誘導された抗体は中和活性を有していた。アジュバントを用いたマウスの T 細胞をウイルスで刺激すると、より Th2 型に近いサイトカイン産生が誘導され、CD4 陽性 T 細胞が活性化されていると考えられた。マウスの血中抗体価は半年以上も維持されたが、この免疫方法では IgA 抗体は検出できなかった。ワクチン効果の詳細な解析のために 20 mer のペプチドプール作成と組換え N, N1, N2 及び N3 蛋白の精製を行った。上のマウスの抗血清中には N, N2 及び N3 抗原に反応する IgG が存在したが、N1 には反応しなかった。一方、T 細胞は N1 に相当する 20 mer ペプチドプールに最もよく反応し、T 細胞と B 細胞のエピトープは異なることが示された。SARS-CoV 受容体である ACE2 に結合する S 蛋白の 318-460AA の領域の H-2K^d 拘束性 CTL エピトープを予測し、20 mer ペプチドを用いて解析した結果、S 蛋白も N 同様、T 細胞と B 細胞のエピトープは異なることが示された。UV 照射 SARS-CoV を用いて、N 及び S に対する単クローン抗体を作成した、S に対する抗体は全て中和活性を有していたが、WB には使用できなかった。

SARS-CoV の S, M, E, N 蛋白を大腸菌及び培養細胞で発現するベクターを作成した。また、これらの蛋白に His-Tag を付加した蛋白の発現にも成功した。大腸菌で発現されたこれらの蛋白は His-Tag カラムを用いて高い純度で精製が可能となった。T7 細胞に S, M, N DNA を導入し、これを抗原として用い SARS(S) DNA キラー T 活性を測定した。その結果、SARS(N)及

び SARS(M) DNA ワクチンにウイルスに対する T 細胞免疫 (増殖反応と IFN- γ 産生) の増強効果が認められた。SCID-PBL/hu に DNA ワクチンを免疫し、血清中の SARS S、M、N、E に対するヒト中和抗体価を測定した。その結果、SARS(M) DNA ワクチンが中和活性を示すヒト抗体の産生を誘導した。この抗体はウイルス増殖阻止活性を示した。また、SCID-PBL/hu の系を用いてタンパク抗原に対するヒト・キラー T 細胞の誘導系を確立した。

組み換えワクシニアウイルスを用いた研究では、9 種の組換え DIs を作製し、哺乳類細胞に感染させると目的蛋白が効率よく発現されることを確認した。これらの組換え DIs をマウスに皮下投与したところ、目的の SARS-CoV 構造蛋白に対する液性、細胞性免疫が共に誘導されることを確認した。また、S 蛋白を発現する組換え DIs を投与されたマウスの血清中には、SARS-CoV の Vero E6 細胞への感染を阻害する活性が存在した。一方、組換え DIs を鼻腔から投与した場合、鼻腔洗浄液中に目的蛋白に対する IgA 抗体が誘導された。また、SARS-CoV 構造蛋白のうち、E/M/S または E/M/M/S を発現する DIs を接種されたマウスでは、SARS-CoV を経鼻感染させた 3 日後の肺洗浄液中から SARS-CoV は検出されず、組換え DIs の接種により強いワクチン効果があることが実証された。

抗体ライブラリーの研究では、膜蛋白発現用ベクター pDisplay と分泌蛋白発現用の pcDNA3.1/myc-His による蛋白発現系を検討した。両ベクターとも Large T 抗原を持つ 293T 細胞、CHO 細胞、COS 細胞を試し、一過性の発現ではあるが、70% 程度の形質導入効率がコンスタントに得られる条件設定に成功した。そこで試した数種類の抗原について全てヒト抗体が得られることが判明した。

3) ヒトで広く使われている HIV protease 阻害剤 nelfinavir が抗 SARS-CoV 活性を持つことが明らかとなった。リアルタイム

PCR により、nelfinavir 処理により Vero E6 cell での RNA 量がコントロールと比較して約 1% まで減少していた。IFA では、nelfinavir 処理をした Vero E6 cell では陽性シグナルがほとんど検出できなかった。また、in silico screening により約 100 万種類の化合物の中から SARS-CoV の 3CL プロテアーゼ阻害剤の候補物質の中から強い抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物の同定に成功した (RIKEN00046)。ウイルス RNA は、同定された化合物処理 Vero E6 cell ではコントロールと比較して 1% 未満まで減少した。

4) フェレットおよびネコの ACE2 塩基配列決定のために、ACE2 の共通配列部分に設計した内部プライマーを用いてダイレクトシーケンシングを行い、フェレット 2637bp、ネコ 2634bp の塩基配列を決定した。これらの配列から予想される、ACE2 のアミノ酸配列はいずれも 805 アミノ酸残基で、既に報告のあるヒトおよびマウスとの identity および similarity は 81.5% ~ 89.7% と 96.5% ~ 98.5% であった。予想される N 型糖鎖の結合部位はフェレットで 6 カ所、ネコで 8 カ所あり、ヒトで報告されている結合部位とは一部異なっていた。フェレット ACE2 を導入した HeLa 細胞に SARS-CoV を感染させた場合は 1 日目が 7.4×10^3 pfu、2 日目が $1.4 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ のウイルス価を示し、ACE2 を導入していない HeLa 細胞 ($< 10^2$ pfu) より明らかに高い値を示した。

猫マクロファージ (FcR 陽性、VR 陽性) では、ADE 活性を持つ Mab を反応後に FIPV を接種した場合、明らかな感染の増強が認められたが、VR に対する Mab を反応後に接種すると、その感染は完全に抑制された。VR に対する Mab を反応後、ADE を持つ Mab 処理 FIPV を接種したところ感染は増強され、ADE 発現に VR は必要ないという結果が得られた。さらに、U-937 細胞 (FcR 陽性、VR 陰性) では、FIPV 感染は認められなかったが、ADE 活性を持つ Mab と FIPV の反応液を接種した場

合には、増殖が観察された。また、ウイルスにあらかじめ protein A を処理した抗 S 抗体を反応させた場合にはウイルス増殖は認められなかった。血清型の違いと ADE 発現の関係を検討するため、I 型及び II 型 FIPV と各々の感染耐過猫血清を用いた ADE 発現を SPF 猫感染系で検討した結果、I 型ウイルスは抗 I 型 FIPV に対する抗体投与猫に ADE を示したが、抗 II 型 FIPV に対する抗体投与動物ではその効果は認められなかった。即ち、ADE 発現には I 型及び II 型での交差反応は認められなかった。

pAPN-FLAG の NIH3T3 細胞での発現は、遺伝子導入後、IF により 2 日目をピークとして検出され、発現部位は主に細胞質であった。また、FACS によって細胞膜での蛋白発現を確認されたが、発現率は 0.6-2% と低かった。WB では、pAPN 蛋白の予測された分子量に近い、約 150kDa、130kDa の 2 本のバンドが検出された。TGEV 感受性のブタ由来 CPK 細胞に TGEV を接種すると、1 日目に CPE が現れ、2 日目には細胞は完全に剥離した。一方 pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞では明瞭な CPE は認められなかった。IFA により TGEV 抗原陽性細胞数を経時的に調べたところ、接種後 1~3 日と TGEV 抗原陽性細胞数の増加が観察された。感染細胞ではウイルス力価は非常に低いか、検出できなかったが、pAPN 遺伝子に付加する Tag 抗原を違えた数種の発現ベクターで同じ実験を行った際には、感受性のブタ由来 CPK 細胞に比べると感染性ウイルス力価は低いものの、力価の上昇がみられるものもあった。

D. 考察

1) SARS-CoV の受容体 ACE2 は、体内の殆どの臓器で発現されているが、その主な標的組織は肺などの呼吸器系と腸管である。このことから、SARS-CoV 標的臓器を規定する因子として、受容体以外の関与が考えられる。本研究では protease 存在下で SARS-CoV 増殖が高くなることが示

され、炎症が誘発されている肺や腸管での各種の protease が SARS-CoV の増殖亢進を誘発する可能性がある。今回の成績で示した protease による SARS-CoV の増殖増強効果は、SARS の重症化機構を考える上で、極めて重要な発見であると判断される。

2) UV 照射不活化した SARS-CoV 粒子は 3 次元構造を維持していると推測され、中和抗体及び T 細胞応答も誘導可能であることから、ワクチン抗原としては有望である。ヒトへの応用では更にホルマリンによる不活化を加え、より安全性の高いワクチンを検討する必要がある。今後、この操作により免疫原性がどのように変化するか、アラム以外にどのようなアジュバントが粘膜 IgA の産生を高めることが可能なのか、検討しなくてはならない。今年度作成した組換え蛋白、ペプチド、SARS-CoV を発現する抗原提示細胞や種々の Mab は、ワクチン接種されたマウスにおける免疫応答の詳細な解析に有用である。

SARS(M) DNA ワクチンにより惹起される抗 M 抗体は SARS ウイルスの増殖を抑制する効果があり、ワクチンとして有望であると考えられる。SCID-PBL/hu の系を SARS DNA ワクチンの開発に応用し、キラー T 依存性及び抗体依存性 SARS ワクチンを作製した。この系は、SARS ワクチンにより活性化されるヒト免疫応答の解明に有益であることが示された。又、本研究で確立した II 型肺胞上皮細胞 cell line T7 は、SARS-CoV の target が肺胞 II 型上皮であることから、SARS ワクチン効果の詳細な解明に重要な役割を果たすことが考えられる。

DI は副作用のない種痘の候補としてヒトへの投与実験も行われており、安全性の高さはすでに確認されている。また我々は、HIV の蛋白を発現する組換え DI に HIV 感染防御効果があることを見出し、組換え DI の安全性の確認実験をすでに終了し、臨床実験の準備を進めている。これらの結果から、SARS-CoV の構造蛋白の全部ま

たは一部を発現する組換え DIIs は、SARS に対する安全な組換え生ワクチンとなり得ると考えられる。

本研究班では、特定のウイルスや毒素に対する中和抗体を有しているヒトからの成分採血（リンパ球）を用いて、巨大抗体ライブラリーを作製して、その抗体を確実に Mab として得る技術開発に成功している。この方法は、ハブ毒中和抗体単離に威力を発揮した。一方、様々なナイプ抗原に対しても強い結合力を示す抗体も得られている。SARS に関しては、感染経験者からの材料は望めないが、後者の方法により、ヒト型中和抗体の作成を目指す。

3) nelfinavir は感染後 3 時間で加えても抗ウイルス活性はほとんど変化しないこと、また、nelfinavir 処理により細胞内にエントリーが影響されないことから、nelfinavir のターゲットがウイルスライフサイクルのエントリー後のステップであることが示唆された。in silico screening から同定されたこの化合物は、recombinant SARS-CoV main proteinase による in vitro cleavage assay においても阻害活性を示した。この結果から少なくともこの化合物が SARS-CoV main proteinase の活性を直接抑制できることが示唆された。

4) フェレットとネコでは ACE2 発現臓器に違いがあり、特にフェレットでは肺からの増幅産物が認められなかった。SARS-CoV の標的臓器とされている肺での ACE2 発現に関してはさらなる解析が必要と思われる。ACE2 アミノ酸配列を比較した結果、identity および similarity のどちらもフェレットとネコの間が最も高い値を示した。未だ解明されていない ACE2 内の SARS-CoV Binding Site が決定されれば、アミノ酸配列から、動物種による SARS 感受性を予測することが可能になるかもしれない。

FIPV 感染での中和抗体はウイルス排除に効果がなく、むしろ FIP 発症を早める結果となる。この ADE に関するエピトープは主に S 蛋白上に存在し、FcR を持たな

い細胞で中和活性を持つ抗体が FcR 陽性のマクロファージで強い ADE 活性を示すことが明らかとなり、中和と感染増強のエピトープが密接に関連していることが示唆されている。今回の報告で、ADE 発現に VR は必要ないことが明らかとなった。すなわち、FIPV のマクロファージへの感染様式としては、VR を使用した感染と FcR 介在性のエンドサイトーシスの様式をとることが示唆された。ADE が認められる Dengue ウイルスは 4 種の血清型が存在し、異なる血清型の再感染時に ADE が発現することが知られている。FIPV 感染の場合、同じ血清型のウイルスの再感染で ADE が発現することが示唆された。最近、SARS-CoV の細胞への侵入が抗体によって増強されることが報告された (PNAS, 2005, 102:797-801)。FIPV 感染は、ADE 現象の動物モデルとして有用な研究課題と思われる。

pAPN-FLAG の一過性発現系が確立できたことから、今後は恒常的に pAPN-FLAG を発現する細胞株を樹立し、より詳細な pAPN-FLAG の発現状況、TGEV や他の CoV と pAPN-FLAG の相互作用について解析していきたい。

E. 結論

1) SARS 重症化機構に関する研究：

SARS-CoV 感染の増強因子として、トリプシンなどの protease の関与が示された。Protease 存在下での SARS-CoV 増殖亢進は、その標的臓器である肺や小腸での感染増強を示唆し、protease が SARS 重症化機構の重要な因子であることが示唆された。

2) SARS ワクチンに関する研究：

SARS-CoV の各構造タンパク cDNA を持つ発現ベクターに構築し、真核細胞及び大腸菌を用いて N と M のリコンビナント蛋白を作製した。これらの DNA ワクチンを SCID-PBL/hu に免疫し、細胞性免疫を介してワクチン効果を発揮する SARS(N) DNA 及び SARS(M) DNA ワク

チンを開発した。また、SCID-PBL/hu を用い、SARS ウイルス増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導する SARS(M)DNA ワクチンを作製した。

マウスモデルにおいて UV 照射 SARS-CoV 粒子は中和抗体や T 細胞応答を長期に誘導可能なワクチンとして有望であることが示された。この免疫原性を更に高めることが可能なアジュバントの選択が重要である。

SARS-CoV の構造蛋白を発現する組換え DIs は、マウスに投与した場合ターゲットとなるウイルス蛋白に対する液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導した。S 蛋白を発現する DIs を投与されたマウスの抗血清にはウイルス中和活性が存在した。組換え DIs を接種したマウスは、SARS-CoV 感染に抵抗性を示し、これらの組換え DIs に強いワクチン効果があることが示された。SARS-CoV に対する治療薬としてのヒト抗体単離に必要な技術上の問題点を解決し、更に共同研究体制の構築を終了した。

3) 抗ウイルス剤に関する研究：

本研究により抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物が同定された。nelfinavir および RIKEN00046 は新規抗 SARS-CoV 薬開発のリード化合物としても有望であると考えられる。

3) 動物モデル及び他のコロナウイルスに関する研究：

フェレットおよびネコの ACE2 はヒトのそれと高いホモロジーがあることが明らかとなった。また、フェレットについては SARS-CoV のレセプターとして機能することが強く示唆された。

II 型 FIPV (79-1146 株) の ADE 発現には VR は必要なく、そのメカニズムとしては FC R を介したエンドサイトーシスが考えられた。FIPV 感染の場合、同じ血清型のウイルスの再感染でのみ ADE が発現することが示唆された。

マウス由来 NIH3T3 細胞に FLAG 抗原を付加した pAPN (pAPN-FLAG) 遺伝子を導入、一過性発現させ TGEV への感受性

を調べた。pAPN-FLAG の細胞膜上への発現は少なかったものの、pAPN-FLAG 蛋白発現細胞が確認できた。感受性を調べるために TGEV を接種したところ、TGEV 抗原陽性細胞の増加が確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miura SH, Nakagaki K, and Taguchi E. N terminal domain of murine coronavirus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the spike protein. *J. Virol.* 78, 216-223 (2004)

Nakagaki K, Nakagaki K, and Taguchi E (2005) Receptor-independent spread of a highly neurotropic murine coronavirus JHMV from initially infected microglial cells in mixed neural culture. *J. Virol.* In press.

Saijo M, Fukushi S, Ogino T, Taguchi E, Notomi T, Mizutani T, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Med.* In press

水谷哲也、田口文広：SARS ウイルスのワクチンからだの科学、増刊 5月、21-27、2004

水谷哲也、田口文広：SARS ウイルス-ワクチン開発と現状総合臨床、第 53 号、6 月 1968-1975、2004

田口文広、田代真人：重症急性呼吸器症候群 (SARS) と SARS コロナウイルス 化学と生物、第 42 号、8 月 546-552、2004

水谷哲也, 田口文広: SARS コロナウイルスのワクチン開発細胞工学、23 7 月 759-800 2004

田口文広: SARS の迅速診断キットインフルエンザ 第 5 号、10 月 39-45、2004

田口文広: SARS コロナウイルスとワクチン臨床と研究 第 81 巻 12 月 69-74

田口文広: SARS コロナウイルスとワクチン開発、現代化学第 404 号、11 月 45-51、2004

田口文広: SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻、129-134、2005

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. Vaccine 2005 (in press).

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, deMello DE, Peiris JSM, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. Immunology 2004. MEDIMOND International Proceedings 449-452.

Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S-I., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H.,

Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. A Subcutaneously Injected UV-inactivated SARS Coronavirus Vaccine elicits Systemic Humoral Immunity in Mice. Int. Immunol. 16:1423-1430, 2004.

Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. JJID, in press.

K.Higo-Moriguchi, Y.Akahori, Y.Iba, Y.Kurosawa, & K.Taniguchi: Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing rotaviruses. J. Virol. 78, 3325-3332 (2004).

Ideno, M.Furutani, T.Iwabuchi, T.Iida, Y. Iba, Y. Kurosawa, H. Sakuraba, T. Ohshima, Y. Kawarabayashi, & T.Maruyama: Expression of foreign proteins in Escherichia coli by fusing with an archaeal F506 binding protein. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 99-105 (2004).

S.Hidaka, Y.Akahori, & Y. Kurosawa: Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. J. Neurosci. 17, 10553-10567 (2004).

2. 学会発表

Notomi T, Taguchi F, Kanda H, Minekawa H, Itamura S, Matsuyama S,

Odagiri T and Tashiro M. RT-LAMP method provides a simple, rapid and specific detection system for severe acute respiratory syndrome (SARS)-CoV RNA. International conference on SARS-one year after the (first) outbreak. 2004. 5. 8-11. Luebeck, Germany

Taguchi E, Matsuyama S and Nakagaki K. Receptor-independent infection of murine coronavirus: a unique mechanism of virus spread. Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2004. 9. 2. Awaji Island, Hyogo, Japan

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Daphne E. deMello, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: The Development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. 12th International Congress of Immunology, 2004.

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Daphne E. deMello, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu mice. 4th World Congress of vaccine and Immunisation. 2004.

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y,

Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M1), Yoshida S3), Matsumoto M4), Kase T, Peiris M, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: Development of vaccines against the severe acute respiratory syndrome(SARS) corona virus. GLOBAL VACCINOLOGY INTERNATIONAL FORUM (7th) Disease Immunisation and Immunotherapy, 5-7 March 2005 Dubai, Emirates.

中垣慶子、中垣和英、田口文広: マウス肝炎ウイルス (MHV-JHM) の大脳分離細胞を用いた受容体発現細胞および第一標的細胞の同定、第8回日本神経ウイルス研究会 6.11-6.12, 2004

松山州徳、石井孝司、森川茂、田代真人、田口文広: SARS-CoV S蛋白のプロテアーゼによる解裂と膜融合活性 第52回ウイルス学会総会、横浜、2004.11.21-11.23

前島雅美、福士秀悦、松山州徳、中垣慶子、森川茂、田代真人、田口文広: SARS-CoVスパイク (S) 蛋白の細胞融合活性に関する研究: 解裂 S 蛋白による解析 第52回ウイルス学会総会、横浜、2004.11.21-11.23

田口文広、松山州徳: マウス肝炎ウイルスの受容体非依存性感染に関する研究: spinoculation 法を用いた解析 第52回ウイルス学会総会、横浜、2004.11.21-11.23

中垣慶子、中垣和英、田口文広: マウス肝炎ウイルスの神経系細胞における第一標的細胞と感染様式 第52回ウイルス学会総会、横浜、2004.11.21-11.23

石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真

人吉崎佐矢香, 鈴木哲朗, 宮村達夫: 高度弱毒化ワクシニアウイルス株 Dis の SARS 生ワクチンとしての応用 第52回ウイルス学会総会, 横浜, 2004.11.21-11.23

西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂: SARS コロナウイルスの組み換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発と評価 第52回ウイルス学会総会, 横浜, 2004.11.21-11.23

横田(恒次) 恭子, 立川(川名) 愛, 山本拓也, 磯貝まや, 岩本愛吉, 森川裕子. 樹状細胞を介したウイルス抗原特異的T細胞の活性化に関する in vitro 評価解析. 第52回日本ウイルス学会, 横浜, 平成16年11月。

高須賀直美, 藤猪英樹, 高橋よし聖, 大島正道, 坂口雅弘, 大西和夫, 橋本修一, 竹森利忠, 横田(恒次) 恭子. UV 不活化 SARS ウイルス全粒子ワクチンの経皮免疫は、強く持続的な液性免疫を誘導する。第34回日本免疫学会, 札幌, 平成16年12月。

大西和夫, 坂口雅弘, 加地友弘, 横田恭子, 大島正道, 葛西正孝, 谷山忠義, 赤川清子, 高須賀直美, 橋本修一, 山本紀一, 阿戸学, 藤猪英樹, 高橋よし聖, 竹森利忠. SARS コロナウイルスに対するモノクローナル抗体の確立とウイルス抗原検出法への応用。第34回日本免疫学会, 札幌, 平成16年12月。

石井孝司, 町田早苗, 鈴木亮介, 吉崎佐矢香, 森川 茂, 水谷哲也, 田口文広, 田代真人, 横田恭子, 高須賀直美, 大西和夫, 鈴木哲朗, 宮村達夫: 高度弱毒化ワクシニアウイルス株 Dis の組換え生ワクチンとしての応用 第8回日本ワクチン学会, 平成16年10月, 札幌。

黒澤良和 「感染症および癌治療薬としてのヒト抗体」 人工血液を作る(5)、於: 慶応大学北里講堂、平成17年2月11日

座本綾, 田口文広, 福士秀悦, 森川茂, 杉山広, 田原口元子, 山田靖子: フェレット ACE2 の同定と SARS-CoV レセプターとしての機能. 第139回日本獣医学学会学術集会, 和光市, 平成17年3月。

E. 知的財産権の出願・登録状況
なし

SARS の重症化機構に関する研究

分担研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第3部）
協力研究者：松山州徳（国立感染症研究所ウイルス第3部）
協力研究者：中垣慶子（国立感染症研究所ウイルス第3部）

研究要旨

重症急性呼吸器症候群（SARS）は新型コロナウイルス（SARS-CoV）によって引き起こされる重症肺炎であり、その死亡率は約10%と極めて高い。SARS-CoVはangiotensin converting enzyme 2（ACE2）を受容体とし、ヒト体内のACE2を発現している多くの臓器でウイルス増殖が報告されているが、重症肺炎の病理発生機構についてはよく分かっていない。我々は、SARSの重症肺炎がSARS-CoVの肺組織内での高い増殖が原因ではないかと考え研究を進めてきた。本研究では、トリプシンなどのプロテアーゼがSARS-CoVの新たな細胞侵入経路を活性化することを突き止め、更にプロテアーゼ存在下でのSARS-CoV増殖は非存在下と比べると10-100倍高いことが明らかとなった。この様な活性を示すプロテアーゼとしては、トリプシン、サーモリジン、ディスパーゼと共に、炎症時に肺で産生分泌されるエラスターゼが証明された。このことは、肺での炎症時にSARS-CoVはその増殖が高くなり、更に重篤な肺炎を引き起こす可能性が示唆された。即ちプロテアーゼが重症肺炎の重要な一因子と考えられる。

A. 研究目的

SARSは2002年から2003年にかけて中国広東省から香港に飛び火し、その後東南アジアを中心とする全世界へ伝播した。SARSは死亡率が高い事から世界を震撼させた新興感染症である。世界各国の共同研究により、原因病原体はそれまで報告されたウイルスとは異なる新たなコロナウイルスSARS-CoVであることが明らかにされた。SARS-CoVに関する研究は驚くべき速さで進行中し、ワクチンや抗ウイルス剤の開発も進展している。しかしながら、なぜSARS-CoVが重症で致死率の高い呼吸器疾患を引き起こすのかについては不明である。我々は、SARS-CoVの感染増強因子を明らかにすることが極めて重要であると考え、培養細胞系でウイルス増殖亢進因子について解明することを目的とした。

B. 研究方法

SARS-CoVはドイツヴェルツブルグ大学Ziebuhr博士から分与されたFrankfurt-1株を用いた。分与されたSARS-CoVをVeroE6細胞で1回増殖させた 1×10^8 PFU/mlの力価の種ウイルスを使用した。ウイルス増殖及び定量にはVeroE6細胞を用い、細胞培養にはDMEM+5%牛胎児血清を用いた。ウイルスの定量は以下のようなplaque assayにより行った。VeroE6細胞を24 well plateに培養し、confluent細胞の培養液を除き、10倍階段希釈したウイルス液を50 μ l/wellで、それぞれを2wellに接種した。37°Cで1時間吸着後、1% FCS, 0.75% methyl celluloseを含むDMEM 0.5 mlを加え、37°Cで更に2日間培養した。更に、10%ホルマリンを各wellに0.5 ml加え、2時間固定した後、UVで照

胞を overnight 照射し、完全にウイルスを不活化させた。その後、細胞を crystal violet で染色し、SARS-CoV による plaque を光学顕微鏡で算定した。本実験では、trypsin, thermolysin, dispase, chymotrypsin, papain, collagenase, proteinase K, elastase 等のプロテアーゼを用いた。

C. 研究成果

これまで Bates 等によって以下の様な SARS-CoV の細胞侵入機構が考えられている。即ち、最初 SARS-CoV はその受容体である angiotensin converting enzyme2 (ACE2) に結合し、その後細胞内の endosome に取り込まれ、endosome 内のプロテアーゼにより SARS-CoV の S 蛋白が活性化され、ウイルスエンベロープが endosome 膜と融合し、細胞内侵入するという endosomal pathway を取る可能性が指摘された。この仮説の実験的証拠になるのは、1) SARS-CoV 感染が endosome 内の pH 低下を阻止する薬物 (bafilomycin 等) で阻害されること、2) SARS-CoV S 蛋白発現細胞が trypsin 処理により細胞融合を引き起こすことが挙げられる。我々は、もし Bates の仮説が正しいとすると、bafilomycin 処理 VeroE6 細胞に SARS-CoV を氷温で吸着させ、その後 trypsin 処理により、細胞表面からの SARS-CoV の細胞内侵入を可能にできると考えた。我々の行った実験から、上記の様な実験では、SARS-CoV は細胞膜から直接細胞内へ侵入する可能性が強く示され、Bates 等の仮説が正しいことを示唆した。更に我々は、trypsin 以外にも thermolysin, dispase, 等が同様の効果を示すことを見いだした。これらの実験が示すことは、SARS-CoV は環境にプロテアーゼがあると、本来の endosomal pathway ではなく直接細胞膜からの non-endosomal pathway で細胞内侵入する潜在能力があることが明らかにされた。更に、SARS-CoV の増殖をプロ

テアーゼ存在下と非存在下で比較すると、プロテアーゼが存在することにより、増殖効率が高くなることが明らかとなった。そこで、自然感染で起こり得る様な条件、即ち moi (multiplicity of infection) 0.0001 の低い条件で感染させ、プロテアーゼ存在下、非存在下でのウイルス増殖を比較すると、プロテアーゼ存在下ではウイルス増殖は 100-1000 倍高くなることが判明した。このウイルス増殖亢進効果は、上述した細胞融合を引き起こす様々なプロテアーゼの他に、肺炎時に産生される主要プロテアーゼ elastase についても認められた。これらのことから、本研究では SARS-CoV の肺炎重傷化には肺で産生される炎症性プロテアーゼが大きく関与していることが示唆された。

D. 考察

SARS-CoV のウイルスゲノムや抗原は呼吸器や腸管など激しい病原が認められる組織以外にも、肝臓、腎臓、小脳、膵臓など多くの組織で検出されている。しかしながら、これらの組織では SARS-CoV による顕著な病変は報告されていない。SARS-CoV の受容体 ACE2 は、体内の殆どの臓器で発現され、特に心臓、腎臓では高い発現が認められる。これらのことから、SARS-CoV の標的臓器を規定する因子として、受容体以外の関与が考えられてきた。今回我々が示した protease 存在下で SARS-CoV 増殖が高くなることは、肺、特に炎症が誘発されている肺では、elastase 等の protease が産生されることなどと考え合わせると、SARS-CoV の標的臓器決定に重要な役割を果たしているものと推測される。SARS-CoV 感染は重い呼吸器障害ばかりでなく、腸管上皮が侵され下痢が頻発することも報告されている。小腸では各種の protease が生理的な状態で分泌され、SARS-CoV 感染を増強することが考えられる。この様に、今回の成績で示した protease による SARS-CoV の増殖増強効果は、SARS の重

症化機構を考える上で、極めて重要な発見であると判断される。

E. 結論

培養細胞を用いた SARS-CoV 感染の増強因子として、トリプシン、サーモリジンなどの protease が関与していることが示された。その機構としては、SARS-CoV の新たな感染経路、即ち本来 SARS-CoV が利用する endosome 由来の感染ではなく、細胞膜から直接細胞侵入する感染経路を protease が可能にしたことに依るものと思われる。Protease 存在下での SARS-CoV 増殖亢進は、その標的臓器である肺や小腸での感染が亢進されることを示唆し、protease が SARS 重症化機構の一員を担うことが考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Nakagaki K, Nakagaki K, and Taguchi F (2005) Receptor-independent spread of a highly neurotropic murine coronavirus JHMV from initially infected microglial cells in mixed neural culture. *J. Virol.* In press.

Saijo M, Fukushi S, Ogino T, Taguchi E, Notomi T, Mizutani T, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Med.* In press

水谷哲也、田口文広 : SARS ウイルスのワクチンからだの科学、増刊 5月、21-27、2004

水谷哲也、田口文広 : SARS ウイルス-ワクチン開発と現状総合臨床、第 53 号、

6月 1968-1975、2004

田口文広、田代真人 : 重症急性呼吸器症候群 (SARS) と SARS コロナウイルス 化学と生物、第 42 号、8月 546-552、2004

水谷哲也、田口文広 : SARS コロナウイルスのワクチン開発細胞工学、23 7月 759-800 2004

田口文広 : SARS の迅速診断キットインフルエンザ 第 5 号、10月 39-45、2004

田口文広 : SARS コロナウイルスとワクチン臨床と研究 第 81 巻 12月 69-74

田口文広 : SARS コロナウイルスとワクチン開発、現代化学第 404 号、11月 45-51、2004

田口文広 : SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻、129-134、2005

2. 学会発表

Notomi T, Taguchi T, Kanda H, Minekawa H, Itamura S, Matsuyama S, Odagiri T and Tashiro M. RT-LAMP method provides a simple, rapid and specific detection system for severe acute respiratory syndrome (SARS)-CoV RNA.

International conference on SARS-one year after the (first) outbreak. 2004. 5. 8-11. Luebeck, Germany

Taguchi E, Matsuyama S and Nakagaki K. Receptor-independent infection of murine coronavirus: a unique mechanism of virus spread. Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2004. 9. 2. Awaji Island, Hyogo, Japan

中垣慶子、中垣和英、田口文広 : マウス

肝炎ウイルス (MHV-JHM) の大脳分離細胞を用いた受容体発現細胞および第一標的細胞の同定、第 8 回日本神経ウイルス研究会 6.11-6.12, 2004

松山州徳、石井孝司、森川茂、田代真人、田口文広：SARS-CoV S 蛋白のプロテアーゼによる解裂と膜融合活性 第 5 2 回ウイルス学会総会，横浜、2004.11.21-11.23

前島雅美、福士秀悦、松山州徳、中垣慶子、森川茂、田代真人、田口文広：SARS-CoV スパイク (S) 蛋白の細胞融合活性に関する研究：解裂 S 蛋白による解析第 5 2 回ウイルス学会総会，横浜、2004.11.21-11.23

田口文広、松山州徳：マウス肝炎ウイルスの受容体非依存性感染に関する研究：spinoculation 法を用いた解析 第 5 2 回ウイルス学会総会，横浜、2004.11.21-11.23

中垣慶子、中垣和英、田口文広：マウス肝炎ウイルスの神経系細胞ににおける第一標的細胞と感染様式 第 5 2 回ウイルス学会総会，横浜、2004.11.21-11.23

石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達夫：高度弱毒化ワクシニアウイルス株 Dis の SARS 生ワクチンとしての応用 第 5 2 回ウイルス学会総会，横浜、2004.11.21-11.23

西條政幸、福士秀悦、荻野利夫、田口文広、水谷哲也、松山州徳、倉根一郎、田代真人、森川茂：SARS コロナウイルスの組み換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発と評価 第 5 2 回ウイルス学会総会，横浜、2004.11.21-11.23

ワクチンの免疫効果の解析

分担研究者 横田恭子（国立感染症研究所）

研究要旨 マウスモデルにおいて、UV 照射 SARS-CoV 粒子は血中の中和抗体や脾臓や所属リンパ節の T 細胞応答を長期に誘導することが可能なワクチンとして有望であることが示された。また、ワクチンに対する抗体及び細胞性免疫応答解析のための準備として、20 mer ペプチド、組換え蛋白、SARS-CoV に対する種々の単クローン抗体及び SARS-CoV 抗原を発現するマウス B 細胞株を得た。今後、UV 照射 SARS-CoV の免疫原性と安全性をより高める手法について更に検討する必要がある。

A. 研究目的

マウス (BALB/c) をモデルとして UV 照射不活化 SARS-CoV ワクチンの免疫効果、安全性について検討し、ヒトへの迅速な応用を図る。

B. 材料と方法

1. 不活化ウイルスの作成

VeroE6 細胞に SARS-CoV を MOI=1 で感染させ、翌日培養上清を回収して PEG 沈殿後蔗糖密度勾配で超遠心してウイルス粒子を精製した。これを UV で 15 分照射 (4.75J/cm²) したものを不活化 SARS-CoV として用いた。(ウイルス 1 部・森川茂博士及びウイルス 3 部板村繁之博士作成)

2. 免疫

各群 5 匹のマウスに UV 照射不活化 SARS-CoV 粒子を 10 mg/head、皮下にアラムアジュバント有り無しで投与した。7 週後同じ免疫を繰り返した。その後 7 日目にマウスの脾臓および所属リンパ節を採取して T 細胞機能を解析した。また、これらのマウスの血清を経時的に採取して血中抗体価を測定した。

3. 単クローン抗体の作成

UV 照射不活化 SARS-CoV を完全フロイントアジュバントで過免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞を用いて単クローン抗体を作成した。

4. 組換え N 蛋白の作成

SARS-CoV の Nucleocapsid (N) 遺伝子全体 (N)、N 末から 120 アミノ酸 (N1)、N 末半分 (N2) 及び C 末半分 (N3) を大腸菌発現システムである pET-SUMO プラスミドに組み込み、IPTG で蛋白発現を誘導した大腸菌の細胞溶解液より N 蛋白を His-Tag を介して精製した。

5. S 発現 B 細胞株の確立

SARS-CoV の Spike (S) 発現ベクター (ウイルス 1 部・森川茂博士) をマウス A20.2J (H-2^d) に Electroporation で導入して S を発現するマウス抗原提示細胞クローンを確立した。

C. 研究結果

(1) マウスに UV 照射 SARS-CoV 粒子を免疫すると、SARS-CoV 特異的 IgG 抗体価が上昇し、アラムアジュバントの添加により抗体価は一桁高くなった。どちらの場合も誘導された抗体は中和活性を有していた。また、アラムをアジュバントとしたマウスの T 細胞を

ウイルス粒子で刺激すると、より Th2 型に近いサイトカイン産生が誘導され、弱いながらも CD4 陽性 T 細胞が活性化されていると考えられた。興味あることに、これらのマウスの血中抗体価は半年以上も維持されたが、この免疫方法では IgA 抗体は検出できなかった。そこで、より安全なワクチンとして UV 照射に加えてホルマリンを添加した SARS-CoV を調整し、その免疫効果を解析するとともに、粘膜 IgA 抗体を誘導するアジュバントの検討を行う準備を進めている。

(2) ワクチン効果の詳細な解析のために抗原として 20 mer のペプチドプール作成と組換え N, N1, N2 及び N3 蛋白の精製を行った。上述のマウスの抗血清中にはこれらの N, N2 及び N3 抗原に反応する IgG が存在していたが、N1 にはまったく反応しなかった。一方、免疫したマウスの T 細胞は N1 に相当する 20 mer ペプチドプールにもっともよく反応しており、T 細胞と B 細胞のエピトープは異なることが示された。同様に、SARS-CoV の細胞側の受容体である ACE2 に結合することが明らかにされている S 蛋白の 318-460AA の領域の H-2K^d 拘束性 CTL エピトープを予測し、4 個の 20 mer ペプチドを合成した。T 細胞応答を IFN- γ ELISPOT で解析すると、S46 に最も強く反応した。一方、マウスの抗血清は S44 に強く反応しており、N 同様、T 細胞と B 細胞のエピトープは異なることが示された。更に、抗原提示細胞として S 全体を発現する B 細胞クローンを確立した。この細胞を抗原提示細胞として SARS-CoV 特異的 T 細胞の解析が可能となった。

(3) UV 照射 SARS-CoV 粒子に対する単クローン抗体を作成した。表 1 に示すように、N に対する抗体 3 つと S に対する抗体 4 つが確立され、それぞれ Antigen-capture ELISA、組織染色、蛍光染色、FACS 解析等に有用であると考えられた。Spike に対する抗体は全

て中和活性を有していたが、ウェスタンブロットには使用できなかった。

D. 考察

UV 照射により不活化した SARS-CoV 粒子はウイルスの 3 次元構造を維持していると推測される。この様なウイルス粒子は中和抗体及び T 細胞応答も誘導可能であることから、ワクチン抗原としては有望である。ヒトへの応用を考慮にいれて UV 照射にホルマリンによる不活化を加え、より安全性の高いワクチンを検討する必要がある。今後、この操作により免疫原性がどのように変化するかを明らかにするとともに、アラム以外にどのようなアジュバントが粘膜 IgA の産生を高めることが可能なのか、検討しなくてはならない。今年度作成した組換え蛋白、ペプチド、SARS-CoV を発現する抗原提示細胞や種々の単クローン抗体は、ワクチン接種されたマウスにおける免疫応答の詳細な解析に有用である。

現状では、マウスにおける SARS-CoV は一過性の感染にとどまり、ヒトの病態モデルにならないことがワクチンを開発する上で大きな問題である。しかしながら、SARS-CoV に対しては受動免疫が有効であることも示されており、少なくとも中和活性の高い抗体が誘導されれば、ウイルス感染伝播はかなり抑制できるであろう。

E. 結論

マウスモデルにおいて UV 照射 SARS-CoV 粒子は中和抗体や T 細胞応答を長期に誘導可能なワクチンとして有望であることが示された。この免疫原性を更に高めることが可能なアジュバントの選択が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S-I., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. A Subcutaneously Injected UV-inactivated SARS Coronavirus Vaccine elicits Systemic Humoral Immunity in Mice. *Int. Immunol.* 16:1423-1430, 2004.
- 2) Iijima, S., Nitahara-Kasahara, Y., Kimata, K., Zhuang, W. Z., Kamata, M., Isogai, M., Miwa, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4⁺ T cells. *Virology*, 327:249-261, 2004.
- 3) Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *JJID*, in press.

2. 学会発表

- 1) 横田 (恒次) 恭子、立川 (川名) 愛、山本拓也、磯貝まや、岩本愛吉、森川裕子。樹状細胞を介したウイルス抗原特異的T細胞の活性化に関する in vitro 評価解析。第52回日本ウイルス学会、横浜、平成16年11月。
- 2) 磯貝まや、横田 (恒次) 恭子。HIV-1 Nef が樹状細胞の抗原提示機能に及ぼす影響について。第52回日本ウイルス学会、横浜、平成16年11月。
- 3) 石井幸司、横田恭子、長谷川秀樹、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男。高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の SARS 生ワクチンとしての応用。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年11月。
- 4) 笠原 (仁田原) 優子、飯島沙幸、横田恭子、間陽子。Importin α により促進される Vpr 核移行機序の HIV-1 標的細胞を用いた解析。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年1

1月。

- 5) 木全清典、倉光球、我妻昭彦、横田恭子、間陽子。vpr によって変化する HIV-1 mRNA 量比の定量解析。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年11月。
- 6) 高村史記、新倉昌浩、横田恭子、李天成、武田直和、宮村達男、保富康宏。DNA ワクチン封入キメラ VLP 経口投与による粘膜誘導ワクチンの試み。第52回ウイルス学会、横浜、平成16年11月。
- 7) 山本拓也、磯貝まや、横田 (恒次) 恭子。HIV-1 nef を標的として siRNA 発現システムによる HIV-1 複製抑制効果に関する解析。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月。
- 8) 横田 (恒次) 恭子、石毛真行、村上正裕、竹森利忠。弱毒サルモネラ菌ワクチンの経口投与による抗 HIV 粘膜免疫効果の解析。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月。
- 9) 高須賀直美、藤猪英樹、高橋よし聖、大島正道、坂口雅弘、大西和夫、橋本修一、竹森利忠、横田 (恒次) 恭子。UV 不活化 SARS ウイルス全粒子ワクチンの経皮免疫は、強く持続的な液性免疫を誘導する。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月。
- 10) 大西和夫、坂口雅弘、加地友弘、横田恭子、大島正道、葛西正孝、谷山忠義、赤川清子、高須賀直美、橋本修一、山本紀一、阿戸学、藤猪英樹、高橋よし聖、竹森利忠。SARS コロナウイルスに対するモノクローナル抗体の確立とウイルス抗原検出法への応用。第34回日本免疫学会、札幌、平成16年12月。
- 11) 笠原 (仁田原) 優子、飯島沙幸、横田恭子、間陽子。Importin α を介した Vpr 新規核移行機序の HIV-1 標的細胞を用いた解析。

H. 知的所有権の取得状況

なし