

平成16年度厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

課題番号 H16-新興-10

SARSウイルス感染阻止化合物の探索に関する研究

総括・分担研究報告書

平成17年3月

主任研究者 菅村 和夫

(東北大学大学院医学系研究科・研究科長)

目 次

I. 総括研究報告書

総括研究報告書	1
SARSウイルス感染阻止化合物の探索に関する研究	
主任研究者：菅村 和夫（東北大学大学院医学系研究科免疫学分野）	

II. 分担研究報告書

1. エンベロープウイルス感染系におけるSTAM1、STAM2、 Hrsの役割	5
主任研究者：菅村 和夫 （東北大学大学院医学系研究科免疫学分野）	
2. SARSウイルス吸着阻害薬開発に関する研究	11
分担研究者：石坂 幸夫 （国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部）	
3. SARSシュードウイルスの作成と漢方エキスの感染阻止効果 に関する研究	13
分担研究者：服部俊夫 （東北大学大学院医学系研究科感染症・呼吸器病態学分野）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

21

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
総括研究報告書

SARSウイルス感染阻止化合物の探索

主任研究者 菅村和夫 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨:(目的・意義) 先般アジアを中心に流行したSARS感染症は、当該国だけではなく我が国を始め世界中の人々を不安に陥れ、経済的にも大きな負担となった。ウイルス感染機序を明らかにし、ウイルス感染の予防・制御を可能にする薬剤の開発が急務である。本研究では、新型SARSコロナウイルスの細胞への吸着およびその後の細胞内でのウイルスの複製・成熟過程を明らかにし、ウイルスの感染・増殖の阻害薬を開発することによって、SARS感染症の治療・予防法の確立を目指す。

(方法)

1. 細胞内小胞輸送関連分子を標的としたSARSウイルス複製・成熟過程における阻害剤の開発。(菅村)
新規小胞輸送関連分子(Hrs, STAM1, STAM2, AMSH)によるマウスサイトメガロウイルスならびにポリオウイルス等の複製・ウイルス成熟過程の制御機構の解析
2. S蛋白とその受容体ACE2を同時に発現させ結合阻止能を持つ、海洋生物をスクリーニングする。(石坂)
3. S蛋白質を表面に有する偽ウイルスを用いた感染系の確立により漢方エキスをスクリーニングして活性物質を見いだす。

(服部)

(成果)

1. エンベロープウイルス(MCMV)およびノンエンベロープウイルス(PV)を対象にした予備的実験の結果、エンベロープウイルスMCMVがSTAMsおよびHRS依存性に増殖制御を強く受けることが判明した。従って、同様にエンベロープウイルスであるSARS-CoVの増殖制御にもこれら蛋白が密接に関与する可能性が高いと考えられた。
2. AS蛋白質とそのレセプターであるACE-2との結合を検出するシステムを立ち上げることができた。
3. S遺伝子をふくむ3個のプラスミッドを導入することにより、偽ウイルスを作成し、高感受性細胞株HepG2を見だし、漢方エキスのスクリーニングを開始した。

(課題) これらの成果を応用して真に抑制物質を見いだす。

■ 分担研究者

石坂 幸人 国立国際医療センター研究所 部長

服部 俊夫 東北大学大学院医学系研究科
教授

A. 研究目的

近代医学は病原体の発見によりもたらされたものであるといつて過言ではない、人類がいかに感染症により被害を受けてきたかは、黒死病、天

然痘、結核などの歴史をひもとけば枚挙に暇がない。20世紀に入りそのような感染症死者数は確かに減少傾向を示しているが、一方で先進国においても新たな病原体が次々と出現している。その多様な病原性・感染ルート等が明らかにされるにつれ、病原体が環境をまた宿主となる人間と動物を見事に、増殖の場として広がるのがよくわかり、生活様式の変化が感染症を誘導しているという点では、近代の効率を求める生活様式が感染症に乗り取られた時に未曾有の被害

が生ずる可能性が迫っているともいえる。そのような可能性を垣間みせてくれたのが Severe acute respiratory syndrome (SARS) であった。たった1人の感染者が宿泊することによりホテルでの感染が生じ、それがまた集合住宅で拡大し、飛行機を使用することにより、世界中に拡散した。発生したのは2002年11月の中国の広東省であり、その後の8ヶ月間に感染者は8000人、死者は800人を数えた。

CDC, WHOは共同でコロナウイルスを分離した。香港の分離株は、広東のSARS患者と10時間接触したSARS患者の生検肺組織と広東地方の旅行から帰ってきた43歳の女性の鼻咽頭液を材料とした。コロナウイルスの語源は典型的な電顕像から由来する。もともとコロナウイルスはヒトや動物の感染細胞の細胞質で増殖する一本鎖RNAウイルスであり、そのうち229EとOC43はヒトの風邪ウイルスとして有名である。三種類の大きなグループが存在するがSARSウイルスはそのどのタイプにも属さず新種のウイルスであった。しかしながらコロナウイルスにはほぼ同時期にも別の新たなウイルスでグループIに属するNL63も発見されていて常に新たなウイルスが検出されている。現在SARSは自然な感染は幸いなことに一時的終止符を打ったが、再燃のおそれがあり、また様々な点が解明されていない。ここではウイルスの複製機構のいくつかを解明し、それを阻止する阻止剤を見いだし、SARSが再び興った時にそれを迅速に治療し、拡大を阻止することを可能にする。

B. 研究方法

細胞内輸送体に関する研究 (菅村)

STAM1およびSTAM2を欠損するマウスはE10. 5において胎生致死であることから、E9. 5のマウスEmbryoより初代培養繊維芽細胞(MEF)を調整した。このMEF細胞は長期間の培養が不可能であることが判明した。そこでSV40ウイルス由来のLargeT抗原を安定的に導入することにより、不死化細胞株(SSd)を樹立した。HRSを欠損するマウスはE10. 5において胎生致死であることから、E9. 5のマウスEmbryoより初代培養繊維芽細胞

株(MEF)を調整し上記と同様に不死化細胞株(HRSd)を樹立した。これらの細胞をサイトメガロウイルス、ポリオウイルスに感染させ、その影響を観察した。

S蛋白結合試験の開発による感染阻止物質の発見(石坂)

SARS-CoVのゲノム遺伝子配列(Accession AY278488. 2)からウイルス構成タンパク(spike (S), nucleocapsid (N), membrane (M), and envelop (E))由来の15merペプチドをそれぞれ125、43、22、7種類(合計197種類)、純度70%以上で合成した。スクリーニングの結果得られたペプチドに関しては、純度90%以上で再合成し、抗体の反応性、特異性などの確認を行った。

偽ウイルス作成による感染阻止物質の発見

(服部)

安定な感染を維持できる如く、S遺伝子とリポーター遺伝子を用いた偽ウイルス。を作成するために、2種のベクターを使用する方法と3種のプラスミドを使用する方法を比較する。また感受性が高いことが知られている細胞株への偽ウイルス感染を確認する。また北京の実験動物研究所 秦川教授と共同で漢方エキスにおける抗SARS活性を測定する。

C. 研究結果

1. STAM1/SATM2ダブルノックアウト細胞株SSdおよび同細胞株由来STAM1あるいはSTAM2戻し細胞株SSdS1, SSdS2に対しMOI=0. 2にてMCMVを感染させ24時間、48時間および72時間後に細胞培養液上清を回収した。その結果、いずれの時間においてもSSdS1およびSSdS2細胞の放出するウイルス量はSSd細胞の約20—30倍に達していた。次にMCMV感染においてSTAMsが細胞吸着からウイルス放出にいたるウイルスライフサイクルのどの段階に関与するか検討した。その結果より、STAMsはMCMVウイルス感染において吸着侵入から初期遺伝子発現に至る感染早期における

関与をすることが想定された。

2. S蛋白質をコートしたウエルへのACE-2結合性が認められ、GAPDHコート群との有意な差が検出された。しかし、その差は必ずしも大きくはなく、検出システムの安定化の必要性が残された。

3. 二つのプラスミッドを使用した偽ウイルスよりも、VRC 8304 CMV/R-SARS S, pHRCMV-Luc pCMV ΔR8.2などを293T細胞に導入して得て作成した偽ウイルスが最も安定性が高いことが明らかになった。これらの偽ウイルスを用いて、まず様々な細胞株への感染を観察した。これらより肝臓由来細胞株であるHuh7, HepG2への感染効率が低いことが明らかになった。

しかしながら肺由来細胞株には感染が認められなかった。北京の動物実験所の秦川教授との共同実験では様々な漢方薬エキスのSARSウイルス複製に及ぼす影響とCPEに及ぼす影響を観察した。黄耆と補中益気湯は20%以上の抑制効果をみたが、それ以上にいたらず、抑制効果なしと判定された。

D. 考察

SARSの潜伏期は10日前後であり、その後発熱、咳き、筋肉痛などの風邪症状が2-3日経過し、そして一部に下痢が生ずる。さらに経過すると感染が遷延し、血小板、リンパ球数が減少し、肝機能異常などが生じる。下気道症状が強いと、息切れ、空咳が生ずる。90%は自然治癒するが、10%が重篤なARDSを併発し、死亡する。SARS患者の20-30%がICUでの治療が必要となり、10%以上の死亡率となる。これらのことより強力なSARSウイルス増殖阻止剤の開発が必要となる。

胸部X線상では初期に肺炎像を呈するが、その後肺炎像は消退し、新たな間質性肺炎の所見が生じる。この時期の治療にはステロイドによるパルス療法が極めて有用である。また最近、強い下痢症状を呈した患者の剖検例においてウイルスの存在が消化管上

皮に観察された。消化管への直接的な感染により消化器症状が生ずることが疑われている。これらのことからSARSウイルスは肺以外にも感染が生ずる全身性の感染症であることが明らかになった。

一方で我々は限られた種類の細胞では高率に肝臓癌由来細胞に感染を認めた。またSARS患者においては肝機能障害が悪化のマーカーとなることが知られているので感染者個体内では肝臓へのウイルス感染による直接侵襲があることを示唆できた。

SARSの治療には様々なものが試みられた。プロテアーゼインヒビター、リバビリン、インターフェロンは一定の効果を現したが、特効薬となるものはなかった。ここでは新規小胞輸送関連分子(Hrs, STAM1, STAM2)に関与する感染阻止物質の重要性が示唆できたウイルス表面に存在するS蛋白と細胞側受容体であるACE2の両者を発現させて結合試験を構築する方法と偽ウイルスを使用する方法で感染を阻害する物質をスクリーニングする方法を確立できた。S蛋白とACE-2の結合性が確認された。しかし、その結合性は当初予想していたほどには強固ではなかった。S蛋白のレセプターとしてACE-2が同定された実験系では、リコンビナントSに結合する蛋白質をプルダウンした後、アミノ酸分析を行った。その際に使用したS蛋白はホ乳動物細胞を用いて調整したものであった。S蛋白のS1領域には多くのシステインが存在している。今回使用した280-540アミノ酸の部分には11個のシステインが認められる。バクテリアシステムで発現させた蛋白質の場合、S-S結合が不適当なため、ACE-2に対する結合性が弱い可能性が考えられる。

E. 結論

各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連など

を解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表（英文査読誌掲載論文）

1 Kobayashi H, Tanaka N, Asao H, Miura S, Kyuuma M, Semura K, Ishii N and Sugamura K. :Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein-sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins STAM1 and STAM2. J Biol Chem., 280:10468-77, 2005.

2. Taguchi T., Shimura M., Osawa Y., Suzuki Y., Mizoguchi I., Niino K., Takaku F., and Ishizaka Y. Nuclear trafficking of macromolecules by an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 18-26, 2004.

3. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. J. Cell Sci., 3011-3020, 2004.

4. Uchida S, Ohtsubo M, Shimura M, Hirata M, Nakagama H, Matsunaga T, Yoshida M, Ishizaka

Y, Yamashita K. Nuclear export signal in CDC25B. Biochem Biophys Res Commun. 316:226-32, 2004.

5. Shimura M. et al. Premature sister chromatid separation by Vpr-induced disruption of heterochromatin protein 1. Submitted.

6. Usami O, Xiao P, Ling H, Lui I, Nakson T, and Hattori T Properties of anti- gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients Microbes and Infection in press

7. Low antibody response against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomized tuberculosis patients J. Ashino, Y. Ashino, H. Guio, H. Saitoh, M. Mizusawa and T. Hattori. The Int J Tb Lung Dis in press

1-3. 論文発表（総説・プロシーディング・その他）

1. 服部俊夫 SARSを含む新興感染症 日本内科学会雑誌 印刷中

2. 学会発表

2-1. 国内学会発表（口頭・ポスター発表）

服部俊夫 SARSを含む新興感染症 第102回 日本内科学会 教育講演 平成17年4月7-9日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

Protein AMSh and cDNA thereof
米国特許 (United States Patent)
Kazuo Sugamura and Nobuyuki Tanaka
US6,838,551 B2
Date of Patent; Jan. 4, 2005.

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

I I. 分担研究報告書

エンベロープウイルス感染系におけるSTAM1、STAM2、Hrsの役割

主任研究者 菅村 和夫 東北大学大学院医学系研究科教授

研究要旨:(目的)Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」の原因ウイルスとしてコロナウイルス属に属するSARS-CoVが同定された。幸いにも日本では発生していないが、交通のスピードや交流範囲の拡大に伴い、将来の世界的な流行の可能性も否定できない。SARS-CoV感染の感染成立機構、病態の解明を行うことで、その分子基盤に立脚した治療法開発が可能になると考えられる。最近、レトロウイルスやパラインフルエンザウイルスを含む複数のウイルス感染増殖において「ウイルスの吸着、細胞内侵入、増殖および出芽」からなるウイルスライフサイクルの調節に、宿主小胞輸送関連蛋白群が密接に関与することが示された。そこで本研究では我々が同定した小胞輸送蛋白に焦点を当て、エンベロープウイルス、ノンエンベロープウイルスにおける感染、細胞内侵入および増殖制御への関与を検討した。(結果)エンベロープウイルス(MCMV)およびノンエンベロープウイルス(PV)を対象にした予備的実験の結果、エンベロープウイルスMCMVがSTAMsおよびHRS依存性に増殖制御を強く受けることが判明した。従って、同様にエンベロープウイルスであるSARS-CoVの増殖制御にもこれら蛋白が密接に関与する可能性が高いと考えられた。

■ 研究協力者

田中伸幸 東北大学大学院医学系研究科助教授

A. 研究目的

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」の原因ウイルスとしてコロナウイルス属に属するSARS-CoVが同定された。SARS-CoV感染症は、幸いにも日本では発生していないが、世界における人的交流のスピードと交流範囲の拡大を考えると、その感染成立機構、病態の解明を早期に行い、その分子基盤に立脚した感染増殖制御活性物質の探索に基づく治療薬開発が必須である。SARS-CoVはゲノムとしてマイナス鎖RNAウイルスを持つ。宿主細胞に対するウイルスの吸着にはACE2が少なくとも関与すると報告されているものの感染後の細胞内侵入、増殖、出芽のライフサイクルには未だ不明の点が少なくない。一方、レトロウイルス、パラインフルエンザウイルス等のエンベロープウイルスあるいはマイナス鎖RNAウイルスの中には宿主への感染成立と増殖、出芽のいずれかの段階において宿主の小胞輸送系を巧妙に利用している。

宿主細胞にはESCRT(Endosomal sorting complex required for transport)と呼称される一連の蛋白群からなる小胞輸送系蛋白、およびESCRT関連酵素分子等が存在する。最近になって、これらESCRT蛋白は宿主細胞蛋白の輸送のみならず、

ウイルス蛋白の輸送にも密接に関与することが明らかとなってきた。一方、我々は細胞内シグナル伝達分子としてSTAM1、STAM2(以下STAMsと総称)およびHrsを同定したが、これらの蛋白は複合体を形成しESCRT蛋白(ESCRT-0複合体)に分類され細胞表面の受容体をはじめとする種々の蛋白の輸送制御に関わる。そこで本研究においては我々の同定した小胞輸送蛋白に焦点をあてることにより、SARS-CoVの細胞内吸着から細胞内侵入に至る過程およびウイルス成熟と出芽の詳細を明らかにすることを目的とする。本研究では、まず予備的研究としてエンベロープウイルス(MCMV)およびノンエンベロープウイルス(PV)を用いウイルスの細胞内侵入からウイルス放出に至るステップにSTAMsおよびHrsがどのように関連しているかを検討した。本研究によりエンベロープウイルス感染症の分子生物学的基盤を明らかとするのみならず、SARS-CoV感染症の治療法の開発を視野に入れた新薬開発に向けた基礎的検討が可能になると期待できる。

B. 研究方法

STAM1/SATM2ダブルノックアウト細胞株(SSd); STAM1およびSTAM2を欠損するマウスはE10.5において胎生致死であることから、E9.5のマウスEmbryoよ

りより初代培養繊維芽細胞(MEF)を調整した。このMEF細胞は長期間の培養が不可能であることが判明した。そこでSV40ウイルス由来のLargeT抗原を安定的に導入することにより、不死化細胞株(SSd)を樹立した。この細胞株にレトロウイルスベクターを用いてSTAM1あるいはSTAM2をさらに戻した細胞株(SSdS1, SSdS2)を樹立した。これらの細胞株はPCR法およびウエスタンブロット法により、遺伝子および蛋白の発現の確認を行い実験に使用した。

Hrsノックアウト細胞株(HRSd); HRSを欠損するマウスはE10.5において胎生致死であることから、E9.5のマウスEmbryoより初代培養繊維芽細胞(MEF)を調整し上記と同様に不死化細胞株(HRSd)を樹立した。この細胞株にレトロウイルスベクターを用いてHRSを戻した細胞株(HRSdRe)を樹立し、遺伝子および蛋白の発現の確認を行った。

ポリオウイルス(Poliovirus)受容体発現STAM1/SATM2ダブルノックアウト細胞株(SSdP); ノンエンベロープウイルスであるポリオウイルスの感染にはポリオウイルス受容体(PVR)が必須である。そこでSSd細胞にヒトPVRをレトロウイルスベクターにより安定導入した細胞株SSdPを樹立し、さらにSTAM1あるいはSTAM2を遺伝子導入した細胞株SSdPS1, SSdPS2、コントロールベクターを導入した細胞株SSdCを樹立した。PVRの発現はモノクローナル抗体を用いたFACS解析により行い、STAM1あるいはSTAM2の発現はウエスタンブロット法により確認した。

マウスサイトメガロウイルス(MCMV;エンベロープウイルス)

マウスサイトメガロウイルスは東海大学・古賀博士から分与された。ウイルスの増殖はswiss3T3細胞株を用い、MOI=1においてウイルス感染させ96時間後に培養上清中に放出されたウイルスを回収し、液体窒素にて保管した。実験は専用のP2施設にて行い、管理に当たっては施錠して保管した。ウイルスtiterの測定はswiss3T3細胞を用いたプラークアッセイ法により行った。

ポリオウイルスsavin株(ワクチン株;ノンエンベロープウイルス)

マウスサイトメガロウイルスはポリオ研究所から分与されたワクチン株を用いた。ウイルスの増殖はMDCK細胞株を用い、MOI=10にてウイルス感染させ48時間後に培養上清中に放出されたウイルスを回収した。ウイルスの保管は液体窒素容器にて行った。管理に当たっては専用液体窒素容器に施錠して保管した。ウイルスtiterの測定はMDCK細胞を用いたプラークアッセイ

法により行った。

ウイルス感染

MCMV:細胞(4×10^5)は前日に60mmシャーレに培養しMOI=0.1にてMCMVを37°C3時間感染させた後2回洗浄したのちCO2インキュベーターにて培養した。24, 48, 72時間後に培養上清を回収し放出されたウイルスの定量を直ちに行った。

Poliovirus:上記MCMVと同様にMOI=10にてウイルス感染させ感染を行い、3回洗浄後6,12,24時間後に培養上清を回収し放出されたウイルスの定量を直ちに行った。

ウエスタンブロット

MCMV蛋白に対するモノクローナル抗体を3クローン樹立した。これらはいずれもエンベロープあるいはカプシドに対する抗体であり、MCMV感染細胞中でのウイルス蛋白の産生をモニターする目的で使用した。また、同様にMCMV蛋白に対するラビットポリクローナル抗体を作成した。MCMV感染後、一定時間後に細胞をセルスクレーパーにて剥離回収し遠心後のペレットをCell Lysis Buffer (1%NP-40, 140mM NaCl, 10mMEDTA, 10mM TrisHCl, pH 7.4, 1% aprotinin, 1mM PMSF)にて溶解した。細胞溶解液は4°C, 14000 X gにて遠心しpost nuclear fractionを抽出した。蛋白定量はProtein Assay kit(BioRad)を用いて行い、20ugを5-20% Gradient Gel(和光純薬工業)により分離した。分離後のゲルはImmobilonP(Millipore)に対してブロットした。上記モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体による特異的シグナルは、HRP-標識2次抗体を用いて検出し、ケミルミネセンスはSuper signal west pico detection kit (Pierce)を用いLumilmagerF1 (Roche)を用いて行った。

RNA抽出とRT-PCR

細胞からのRNAの調整はRNA Isolation kit (Promega)にて行った。RT-PCRはOligo-dTを用いSuperScriptIII First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen)を使用した。PCRに用いたプライマーは以下の通りである。

mCMV-ie1-ie3-F;
5'-CGAGTCTGGAACCGAAA-3'
mCMV-ie1-R;
5'-ACAGGACAACAGAACGCT-3'
mCMV-ie3-R;
5'-TGTGAGGCAGTAGTTATACC-3'
mCMV-gB-F;
5'-GCACGTCGTAGGTAAATTGC-3'
mCMV-gB-R;
5'-AGAATGTCACGTGCGACTGG-3'

beta-actin-F;
5'- CCACTGCCACATCCTCTTC-3'
beta-actin-R;
5'-CATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'

DNA抽出とPCR

細胞からのDNAの調整はDNA Isolation kit (Qiagen)にて行い、PCRは構造蛋白gBをコードするウイルスゲノムDNA断片を増幅するプライマーペアを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。

C. 研究結果

SARS-CoV感染症は、幸いにも日本では発生していないが、世界における人的交流のスピードと交流範囲の拡大を考えると、その感染成立機構、病態の解明を早期に行い、その分子基盤に立脚した感染増殖制御活性物質の探索に基づく治療薬開発が必須である。SARS-CoVはコロナウイルス属に分類されるマイナスRNAウイルスである。宿主細胞に対するウイルスの吸着にはACE2が少なくとも関与すると報告されているものの感染後の細胞内侵入、増殖、出芽のライフサイクルには未だ不明の点が少なくない。一方、レトロウイルス、パラインフルエンザウイルス等のエンベロープウイルスあるいはマイナスRNAウイルスの中には宿主への感染成立と増殖、出芽のいずれかの段階において宿主の小胞輸送系を巧妙に利用している。そこで我々の同定した哺乳類小胞輸送蛋白群の関与を明らかにするため、まずエンベロープウイルス(MCMV)およびノンエンベロープウイルス(PV)を用いウイルスの細胞内侵入からウイルス放出に至るステップに及ぼす影響があるか検討した。

STAM1/SATM2ダブルノックアウト細胞株SSdおよび同細胞株由来STAM1あるいはSTAM2戻し細胞株SSdS1, SSdS2に対しMOI=0.2にてMCMVを感染させ24時間、48時間および72時間後に細胞培養液上清を回収した。その結果、いずれの時間においてもSSdS1およびSSdS2細胞の放出するウイルス量はSSd細胞の約20—30倍に達していた。この差異が細胞クローンによる差でないか検討するため、各細胞株を検討したが3クローンずつ検討した。感染72時間後の比較において、ウイルス量はSSd, SSdS1, SSdS2に関して大きな違いが認められなかった(図1)。従って、MCMVのウイルス感染に基づくウイルス放出量は

STAM1およびSTAM2に依存していることが明らかになった。

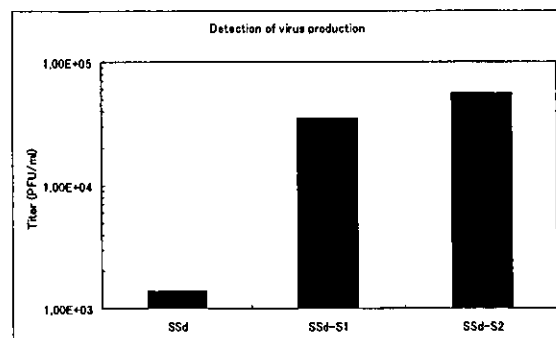


図1 感染72時間後SSd, SSdS1およびSSdS2細胞細胞培養上清中に放出されたMCMV量

次にMCMV感染においてSTAMsが細胞吸着からウイルス放出にいたるウイルスライフサイクルのどの段階に関与するか検討した。MCMV感染後に誘導される初期遺伝子としてie1, ie2およびie3が、後期遺伝子としてgBが知られている。そこで感染6時間、12時間および24時間後に感染細胞からtotal RNAを抽出しRT-PCRによる定量を行った。その結果、ie1およびie3の各初期遺伝子の転写量は感染6時間後においてSSdに比較してSSdS1およびSSdS2において約3ないし4倍に増加していた。さらに後期遺伝子gBの転写量もSSdに比較してSSdS1およびSSdS2では約5倍程度上昇していた。以上の結果より、STAMsはMCMVウイルス感染において吸着侵入から初期遺伝子発現に至る感染早期における関与をすることが想定された。

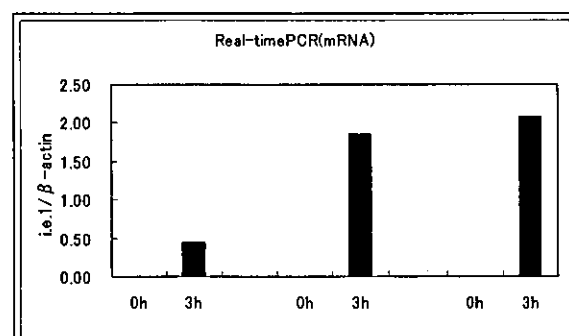


図2 MCMV感染0時間および3時間後のMCMV初期遺伝子ie1の定量PCR

MCMVウイルスの細胞吸着から侵入に至る段階におけるSTAMsの関与を明らかにする目的でウイルス吸着を4℃にて1時間行い、洗浄後に細胞内に侵入したウイルス量をPCR法にて行った。その結果、感染(吸着)後1時間の早期においてSSdの方がSSdS1およびSSdS2細胞よりウイルスDNA量が多かった。従ってSTAMsはウイルス吸着と侵入に関してはほとんど

関与せず、侵入から初期遺伝子転写に至る短時間の間に機能することが判明した。

我々の以前の研究結果からSTAMsはHrsと結合し機能することが明らかとなっている。そこでMCMV感染に関しHrsがSTAMsと同様に関与するか否かを検討した。Hrs欠損HRSd細胞および遺伝子を戻した戻し細胞であるHrsdReに対してMCMV感染実験を同様に行った。その結果、STAMsと同様にHRSdRe細胞の放出するウイルス量はHRSd細胞に比し約5倍の上昇を示した。以上の結果から、STAM1およびSTAM2、HrsはいずれもエンベロープウイルスであるMCMVの感染増殖に密接に関与することが明らかとなった。

次に以上のような小胞輸送蛋白STAMs、Hrsの機能がノンエンベロープウイルスの感染にも同様に関連するか調べる目的でポリオウイルス(PV)の感染を検討した。PVはヒト細胞に特異的に感染しその受容体はPVRと呼ばれる細胞接着因子であることが判明している。そこで上記マウス由来細胞株を用いた実験系を構築するためヒトPVR安定導入細胞株SSdPをSSd細胞から樹立しSTAM1、STAM2各遺伝子を戻した戻し細胞株SSdPS1、SSdPS2、及びコントロールベクターを導入した細胞株SSdPCを樹立した。PV感染は4℃にて1時間行い、洗浄後0時間から20時間まで上清へのウイルス放出量及び細胞内ウイルス量を検討した。PVの感染増殖はMCMVに比べて有意に速く感染後6時間で感染粒子の放出が十分観察された。その結果、SSdPC、SSdPS1、SSdPS2の3者の放出するウイルス量は8時間、12時間、16時間および24時間のいずれにおいても有意な差異が認められなかった。同時にウイルスをWesternBlot法により検出したところ、同様にSTAM1、STAM2の如何に関わらずウイルス蛋白質の発現量に差異が認められなかった。以上の結果より、STAM1およびSTAM2はノンエンベロープウイルスであるPVの感染増殖に関与していないことが明らかとなった。

D. 考察

SARS-CoVの宿主細胞感染は少なくともACE2を受容体として吸着しその後受容体が初期エンドソーム(Early Endosome)に取り込まれた後にエンドソーム上のイオンポンプの働きに基づく酸性化を必須の過程として細胞質内に侵入することが報告されている。従って、SARS-CoVの細胞内侵入においてはACE2受容体・SARS-CoV複合体が一過性に形成されエンドサイトーシスを経て初期エンドソーム膜に複合体がトランスロケートする可能性が想定されている。さらに、初期エンドソームの酸性化の過程とはエンドソーム成熟過程に他ならない。実際に、初期エンドソームの成

熟過程に伴ってACE2受容体・SARS-CoV複合体をMVB(Multivesicular Body)さらにはLysosomeへと輸送すると考えられる。すなわちSARS-CoVの細胞感染の機構として、以上の過程のいずれかの段階においてエンドソームから細胞質内に逃避し感染成立するものと考えられる。我々の同定したSTAMs・Hrs複合体はHrsのFYVEドメインを介して初期エンドソーム膜上に形成されるPhosphatidyl Inositol-3 Phosphate (Pins3P)に結合しエンドソームに輸送された細胞膜上の蛋白(Cargo)の担体として小胞輸送に必須であることが判明している。すなわちACE2受容体・SARS-CoV複合体はSTAMs・Hrs複合体により密接にコントロールされている可能性が想定される。今回の研究ではまずSARS-CoVと同様の「エンベロープウイルス」に分類することが可能なMCMVを用いて細胞吸着から感染粒子放出に至る過程を追いながらSTAMsおよびHrsの機能との関連を検証した。その結果、STAMsおよびHrsのいずれの小胞輸送関連分子ともMCMVの感染性粒子放出に密接に関連しておりこれらいずれの蛋白の欠損においてもウイルス量にして約10分の1から50分の1に減少していた。STAM1およびSTAM2を同時に欠損した細胞株においては初期遺伝子のみならず後期遺伝子においても遺伝子発現量がウイルス放出量に一致して有意に減少していた。従ってMCMV増殖機構におけるこれら小胞輸送蛋白の役割は吸着、細胞内侵入と脱核を含む感染早期に対する作用であることが示唆された。ウイルス感染1時間後におけるウイルスDNAは、逆にSTAM欠損によってややウイルスゲノム量の増加が認められた。HCMVの感染機序においてはEGF受容体(EGFR)にウイルスが吸着し細胞内にインターナライズし核付近に輸送され核内に脱殻してゲノムが侵入することが報告されている。今回のMCMVを用いた結果から、STAMの機能と細胞内小胞の輸送と細胞内への脱殻の過程に機能していることが想定された。今後、ウイルス・受容体複合体の細胞内動態をリアルタイムで観察しエンベロープウイルスの細胞内小胞との関連を詳細に検討する必要がある。実際にSARS-CoVの感染においてはSARS-CoV感染にエンドソームの酸性化が必須であると報告されていることから小胞の成熟過程がウイルスの侵入に必須であることが示唆されている。この場合にもSTAM-Hrs複合体は・SARS-CoV・ACE2複合体が小胞上に一過性に存在する際にこれら複合体の輸送の運命決定をしている可能性が高い。今後、STAMsあるいはHRS欠損細胞株にACE2を発現させSARS-CoVを感染させる実験系を構築しSARSウイルスのスパイクを表面に有するpseudotypeウイルスを用いた検討を行うことが早急に必要である。

HIVおよびHTLV-Iをはじめとするレトロウイルス、

Parainfluenzaウイルスの感染増殖においては小胞輸送蛋白がウイルスの出芽に極めて重要な働きを有していることが明らかとなっている。これらのウイルスの場合、特にウイルス構造蛋白(HIV, HTLV-Iにおいてはgag蛋白)がLateドメイン(Lドメイン)と呼ばれるアミノ酸配列を用いて小胞輸送蛋白のいずれかに結合することが明らかとなっている。今後、SARS-CoVの構造蛋白に類似の蛋白機能ドメインが存在するか否か検討する必要がある。一方、今回の検討では少なくともSTAM, HRSの機能はウイルス感染の早期の段階にあることが判明している。この事実はエンベロープウイルスの感染早期において初期エンドソームの機能に依存するステップが存在することを強く示唆している。この現象がMCMVに特有な現象なのかあるいはもっと広範なエンベロープウイルスに認められる現象なのか今後明らかにする必要がある。

今回の検討ではエンベロープを有さないPVの感染にSTAMs, HRSは何ら関与していなかった。この原因としてPVの場合受容体に結合すると速やかにゲノムRNAが細胞内に取り込まれるため小胞輸送に依存していないものと考えられる。しかしながら、NGFにて分化させた褐色細胞種由来ラット細胞株PC12に受容体を発現させた場合には受容体に結合したPVは神経軸索を逆行性に輸送されることが明らかとなった。今回の我々の検討では繊維芽細胞株を用いていることから、小胞の輸送動態と小胞の寿命決定はおそらく細胞種ごとに異なるものと考えられる。今後、ウイルス含有小胞の能動的輸送とSTAMs, HRSの関連について神経細胞を用いた検討が必要であると考えられた。

E. 結論

エンベロープウイルスであるMCMVの感染において小胞輸送蛋白STAM1, STAM2, Hrsはウイルス感染早期吸着以降、初期遺伝子発現以前の段階において重要な働きをしており、特にウイルス含有小胞の細胞核付近への輸送と脱殻に関与することが示唆された。同じくエンベロープウイルスでありACE2を受容体とするSARS-CoVの感染においても密接に関連することが示唆された。今後、Pseudotypeウイルスを用いてSARS-CoV感染との関連を詳細に検討するとともにウイルス構造蛋白と小胞輸送系の会合をふくむ分子基盤を明らかにする必要があると考えられる。本研究の結果、エンベロープウイルスのライフサイクルにおける小胞輸送系の重要性が確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

1 Kobayashi H, Tanaka N, Asao H, Miura S, Kyuuma M, Semura K, Ishii N and Sugamura K. :Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein-sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins STAM1 and STAM2. J Biol Chem., 280:10468-77, 2005.

2 Nakashima A, Morita E, Saito S and Sugamura K.: Human Parvovirus B19 nonstructural protein transactivates the p21/WAF1 through Sp1. Virology. 329:493-504, 2004.

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

1-4. 論文発表 (著書)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

【田中伸幸 研究協力者】

キーストンシンポジウム Ubiquitin and Signaling
2005年2月22 - 27. 米国ニューメキシコ州タオス
Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein-sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins STAM1 and STAM2

2-2. 国内学会発表(口頭・ポスター発表)

【菅村和夫 主任研究者】

なし

【田中伸幸 研究協力者】

第63回日本癌学会

2004年9月29日 福岡

細胞内小胞輸送関連蛋白分子群Hrs, STAMsによるサ

イトカイン受容体・シグナル伝達分子の発現調節

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

Protein AMSH and cDNA thereof

米国特許(United States Patent)

Kazuo Sugamura and Nobuyuki Tanaka

US6,838,551 B2

Date of Patent; Jan. 4, 2005.

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

SARS ウイルス吸着阻害薬開発

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部

研究要旨 SARS ウイルス由来 S 蛋白質とそのレセプターである ACE-2 との結合を検出するシステムを立ち上げ、この結合を阻害する化合物をスクリーニング・同定する。開始サンプルとしては海洋微生物抽出エキスをを用いる。本年度は、2 者の結合を検出するための固相法を立ちあげた。本プロジェクトを通して、この検体ライブラリーの有用性を明らかにしながら、今後の新興・再興感染症に対する特効薬探索ソースとして可能性についても明らかにする。

A. 研究目的

SARS コロナウイルスが感染する際、ウイルスのスパイク蛋白質（S-蛋白質）が標的細胞のレセプターとの結合に重要な役割を担っている。S-蛋白質のレセプターとしてアンギオテンシン転換酵素-2（angiotensin converting enzyme-2 以下 ACE-2）が同定された。本研究では、S 蛋白質と ACE-2 との結合を検出するシステムを立ち上げ、この結合を阻害する化合物をスクリーニング・同定する。開始サンプルは海洋バイオテクノロジーから供与される約 5 万種類の海洋生物抽出エキスをを用いる。ヒットが認められた場合は、精製後構造決定を行う。

これまでの解析から S 蛋白質が ACE-2 に結合するために必要な最小必要領域としてアミノ酸 318-510 が同定されている。本研究ではこの部分を含む S 蛋白質を用いて固相法を立ち上げる。

B. 研究方法

a. S 蛋白質及び ACE-2 蛋白質の発現

SARS ウイルス由来 S 蛋白質遺伝子の発現効率は究めて低く、コドンユーセージを改変した cDNA を用いて行うことが必須であることが報告されている。ヒト型に改変された S 蛋白質 12-672 アミノ酸をコードする cDNA クローンをボストンの Choe 博士から供与を受けた。このうちアミノ酸 280-540 のアミノ酸領域を PCR によりクローニングした。この領域を 2 種類の発現ベクター即ち、バクテリア発現ベクターである pET30 とホ乳動物細胞での発現ベクター pcDNA3.1 に組み込んだ。その際分泌型蛋白質として発現させるために CD5 リーダーシーケンス部分を 5'側に付加し、3'側にヒスタグを付加した形で発現させた。

ACE-2 は C 末側に存在する膜貫通領域を除く形でヒスタグのカセットを挿入した変異体を作成した。2 種類の cDNA を pcDNA3.1 に組み

込み、293FS システムで発現させた。培養上清を透析後、DEAE カラムにアプライし、部分精製した。

b. 固相化システム

バクテリアで発現させた S 蛋白質をニッケルカラムで用いて精製した。PBS で透析後、ニッケルコートされた 96 穴プレートに結合させた。部分精製した ACE-2 を作用させた後、ACE-2 に対する抗体、さらにその二次抗体（ペルオキシダーゼ付加型）、そして最後に基質を作用させることで発色させ、結合性を検定した。コントロールとして、ヒスタグ付き GAPDH を用いた。

c. 抗 SARS 因子探索の基礎検討

海洋微生物抽出エキスはエタノールで調整されている。まず、S 蛋白質に化合物を結合させるために、様々な濃度で溶媒を希釈した溶液を作用させた後、ACE-2 蛋白質を作用させ、結合性の変化を解析した。

C. 研究結果

a. 固相化システム

S 蛋白質をコートしたウエルへの ACE-2 結合性が認められ、GAPDH コート群との有意な差が検出された。しかし、その差は必ずしも大きくはなく、検出システムの安定化の必要性が残された。

b. 溶媒の前処置の影響

希釈したエタノールを ACE-2 の前に作用させることで ACE-2 の結合性が減弱した。これは前処置をする間にニッケルコートされたプレートから S 蛋白質が剥がれている事による物と思われた。今後は、まず海洋エキス希釈液を ACE-2 に作用させた後、プレートに加える

D. 考察

S 蛋白質と ACE-2 の結合性が確認された。しかし、その結合性は当初予想していたほどには強固ではなかった。S 蛋白質のレセプターとして ACE-2 が同定された実験系では、リコンビナント S に結合する蛋白質をプルダウンした後、アミノ酸分析を行った。その際に使用した S 蛋白質はホ乳動物細胞を用いて調整したものであった。S 蛋白質の S1 領域には多くのシステインが存在している。今回使用した 280-540 アミノ酸の部分には 11 個のシステインが認められる。バクテリアシステムで発現させた蛋白質の場合、S-S 結合が不適当なため、ACE-2 に対する結合性が弱い可能性が考えられる。この点を明らかにするために、現在 293 細胞を用いて、S 蛋白質を発現させる事を試みている。

E. 結論

S 蛋白質をコートしたウエルへの ACE-2 結合性が認められた。次年度では、2 者の結合を阻害する因子の探索を開始する。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Taguchi T., Shimura M., Osawa Y., Suzuki Y., Mizoguchi I., Niino K., Takaku F., and Ishizaka Y. Nuclear trafficking of macromolecules by an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 18-26, 2004.
2. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, 3011-3020, 2004.
3. Uchida S, Ohtsubo M, Shimura M, Hirata M, Nakagama H, Matsunaga T, Yoshida M, Ishizaka Y, Yamashita K. Nuclear export signal in CDC25B. *Biochem Biophys Res Commun.* 316:226-32, 2004.
4. Shimura M. et al. Premature sister chromatid separation by Vpr-induced disruption of heterochromatin protein 1. Submitted.

2. 学会発表

1. Shimura M, Ishizaka Y. Aberrant sister chromatid separation by HIV-1 VPR coupled with disruption of HP1 and kinetochore components. 第 20 回 Oncogene Meeting, Frederick, Maryland, USA, 6 月, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|---|
| 1. 特許取得 | 無 |
| 2. 実用新案登録 | 無 |
| 3. その他 | 無 |

SARSシュードウイルスの作成と漢方エキスの感染阻止効果

分担研究者 服部俊夫 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨: (目的) SARSウイルスの複製を阻止する化合物を作成する目的で、シュードウイルスを用いた感度の高いウイルス侵入測定法を開発した。開発にあたっていくつかの方法を比較検討したが、安定した測定法を開発するには標的細胞をHepG2細胞にし、またHIV遺伝子とレトロ遺伝子を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子とS蛋白遺伝子を共導入する必要があった。またこの過程で、肺由来細胞株で感受性株を見出すことはできなかった。中国の実験動物研究所との共同研究においては、生ウイルスを用いての漢方エキスの影響を観察した。今後は偽ウイルスを用いて、侵入阻止効果の有無を検討する。

■ 協力研究者

斉藤弘樹 東北大学大学院医学系研究科助手

庄敏 ヒューマン・サイエンス財団レジデント

肖鵬 東北大学大学院医学系研究科大学院生

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は感染性のある異型肺炎を臨床像とし、死亡率も高いことが報告されている。SARS患者の大量発生時には様々な治療がなされ、SARSコロナウイルス (SARS-CoV) が原因ウイルスと同定され、世界中の多くの国々、とくにアジアを中心に蔓延した。スパイクタンパク (Sタンパク) は、SARSコロナウイルスの外膜表面に存在しているI型の膜結合糖タンパクで、そのプリカーサーは全長1225アミノ酸残基よりなり、1から13アミノ酸残基からなるシグナルペプチド、14から1195アミノ酸残基によるドメインにより構成されている。1196から1226アミノ酸残基の高親水性領域は膜貫通ドメインで1227から1255アミノ酸残基は細胞室内に存在している。Sタンパクはウイルスの細胞内への侵入において重要で、Sタンパクとウイルスレセプターとの親和性によりウイルスが細胞表面に接着し、その後ウイルスの細胞膜への取り込みがおこなわれる。最近ヒトのACE-2 (human angiotensin converting enzyme-2) がSタンパクと親和性のあるSARSコロナウイルスのレセプターであり、ウイルスの細胞膜への接着や取り込みはpHに関連しているなど、次第にその性質があきらかとなってきた。Sタンパクを抗原としたワクチンの開発や抗ウイルス薬の開発も行われて

いるが、いまだ有効な治療法の確立にはいたっていない。以上のことから、SARSコロナウイルスの細胞への感染、とくにウイルスの侵入の機能を解明し、それを阻害する治療法について検討することを本研究の目的とする。ウイルス感染機構の解明は感度の高い感染の測定法の開発が大事である。ここではレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いた偽ウイルスを作成する。SARSの治療薬は完成していないので

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) 「重症急性呼吸器症候群」は自然な感染は幸いなことに一時的終止符を打ったが、再燃のおそれがあり、また様々な点が解明されていない。ここではウイルスの複製機構のいくつかを解明し、それを阻止する阻止剤を見だし、SARSが再び興った時にそれを迅速に治療し、拡大を阻止することを可能にする。

B. 研究方法

研究方法

細胞株: Vero E6 (アフリカグリーンモンキー腎上皮細胞由来) (国立衛生研究所)

HepG2 (ヒト肝細胞癌由来); Huh 7 (ヒト高分化型肝細胞癌由来); Sq-1 (ヒト肺扁平上皮癌由来); LU65 (ヒト肺扁平上皮癌由来); 86-2 (ヒト肺大細胞癌由来); LK-2 (JCRB) (ヒト扁平上皮癌由来); OB A-LK-1 (ヒト肺大細胞癌由来) (東北大学)

GP2-293T (BD company) 表1

プラスミド: pCMV Δ R8.2, pNL43-R-E-, pHR'CMV-Lu

c, pMDG, CMV/R-SARS-S, pcDNA3.1-SARS, pNGVL-MLV-Gag-Pol, pLZR-Luc以上のプラスミドはDr. DengとDr. Nabel GJから得られた。

CMV/R-SARS-Sはヒトコドンをもち、SARSコロナウイルスのUrbani株 (Accession No. AY27874) と同じタンパクを発現する。

CMV/R-mcs発現ベクターはCMVプロモーターをもち、スプライスドナーとヒトT細胞白血病ウイルス1型のR領域をもつ。

pcDNA3.1-SARSはSARSコロナウイルスBJ01株 (Accession No. AY278488) のSタンパクコドンをもち、そのシグナルペプチドはプラスミノーゲンアクチベーターのそれに置換されている。

pVSVGはBD companyよりえられた。

PcDNA3.1-ACE2-C9は??よりえられた。

SARS偽ウイルスの作成:

5x10⁶の293T細胞を10cmのプラスチックプレート上で培養し24時間後、リポフェクタミンをもちいて各種プラスミドを細胞にトランスフェクションした。

- 1) pCMV Δ R8.2 (7ug), pHR'CMV-Luc (7ug), CMV/R-SARS-S (8ug) あるいは pMDG (6ug)
- 2) pNL43-R-E- (10ug), pcDNA3.1-SARS (10ug)
- 3) pNGVL-GagPol (MLV) (7ug), pLZR-Luc (7ug), CMV/R-SARS-S (400ng)
- 4) pLZR-Luc (10ug), CMV/R-SARS-S (10ug) あるいは pVSVG (10ug) あるいはエンベローププラスミドなし。

12時間のトランスフェクションの後、細胞を洗浄し培養液中で48時間培養し、上精を回収し0.45umのフィルターでろ過したのち-80℃で保存した。培養液中のp24をELISA法 (HIV-1p24 Antigen Assay kit) により測定し、偽ウイルスを間接的に定量した。

細胞へのSARS-CoV偽ウイルス感染:

10⁴のVero E6細胞を96穴プレート上で培養し、5ngのp24に相当する偽ウイルス培養液を加えて16から18時間感染させた後、培養液を交換する。72時間後、細胞をPBSで洗った後、100uLのmammalian cell lysis bufferを加えてcell lysateを回収する。20uLのcell lysateのluciferase activity (RLU)をLuciferase assay reagentで処理したのちluminometerで測定し、細胞内への偽ウイルスの侵入を定量した。

HIV-luc/SARS偽ウイルスをつかった細胞内侵入抑制効果の検討:

5ngのp24相当の偽ウイルスを濃度の異なる漢方薬とともに37℃で30分間インキュベートしたのち、96穴プレート上の10⁴のHepG2細胞に加えた。12時間後、培養液を交換しさらに72時間培養したのち、luciferase activity (RLU)を測定し、細胞内への偽ウイルスの侵入を定量した。

RT-PCR:

全RNAはSuperscript III First-strand Synthesis Systemをもちいて回収された。

ACE2プライマーは以下のとおり。

5'-GGAAAGCTGGAGATCTGAGGTC-3'

5'-GGTCCACCATTGCATCAGTAAC-3'

C. 研究結果

各種細胞での比較:

HIV/SARS偽ウイルスをもちいた細胞へのウイルス親和性の検討は簡便で安全であり、各種細胞でのウイルス親和性について検討した。細胞への親和性は各種細胞で異なっており、HepG2細胞はもっとも親和性が高かった。Huh7とACE2 cDNAをトランスフェクトした293T細胞でも高い親和性がみとめられた。一方、Vero E6と293T細胞では親和性は低かった。コントロールとして、HIV/VSV-Gについても検討したが、HepG2とHuh7でもっとも高い親和性がみとめられたが、Vero E6細胞には感染が認められなかった。(図1)

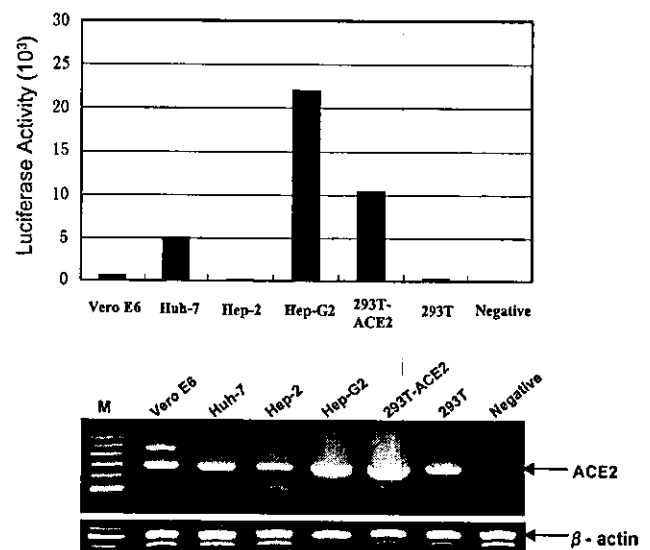


図1 様々な細胞株への感染とACE2発現

ACE2はSARSコロナウイルスのレセプターで、偽ウイルスの細胞内への侵入の際には、外膜の糖タンパクが最初に細胞膜表面にあるレセプターに結合し、エンドサイトーシスによって偽ウイルスが細胞内に侵入すると考えられている。そこで、各種細胞でのACE2の発現についても検討した。ACE2は検討した全ての細胞で発現がみとめられたが、発現量は異なっていた。(図1)

肺由来細胞での比較:

SARSは重症肺炎をひきおこし、その致死率は15から20%と高率であることから、ウイルスの肺への高い親和性が想像される。以上のことから、各種肺由来細胞でのACE2の発現についても検討した。(図2)

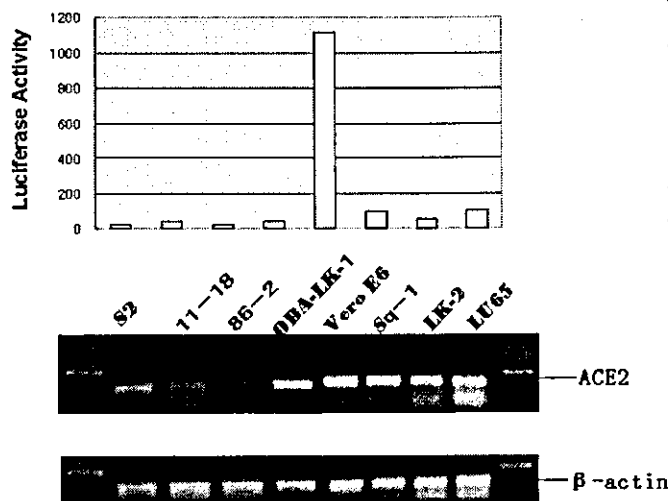


図2 肺細胞株への偽ウイルス感染

偽ウイルスの比較検討：

様々に作成した偽ウイルスを用いて上記のHepG 2に感染させその効率を観察した。これらの実験より3つのプラシミッドを作成したシステムが最も効率がよいことが観察された。

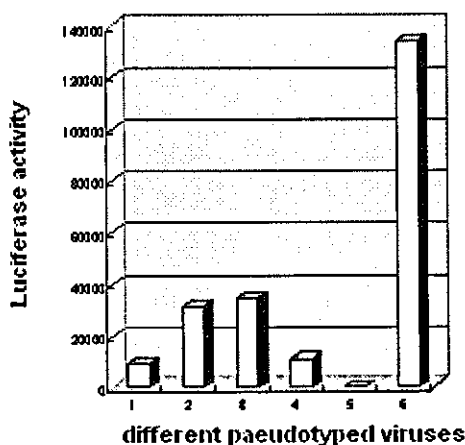


図3 様々な偽ウイルスによるHep G2細胞への感染

1. 200 ng of CMV/R-SARS-S; 2. 400 ng of CMV/R-SARS-S; 3. 800 ng of CMV/R-SARS-S; 4. 8 μg of CMV/R-SARS-S; 5. negative control without envelope plasmid; 6. positive control, 6 μg of pMDG

漢方薬のSARSウイルス複製への影響：SARSウイルスその物を使用したウイルス感染実験は北京動物実験研究所の秦川教授の研究室において行われた。感染阻止率と細胞増殖性を同時に観察し、特異的な抑制率が30%以上を陽性と判定したが、今回使用した漢方薬のいずれも有意な抑制効果を示さなかった。

D. 考察

SARSの潜伏期は10日前後であり、その後発熱、咳き、筋肉痛などの風邪症状が2-3日経過し、そして一部に下痢が生ずる。さらに経過すると感染が遷延し、血小板、リンパ球数が減少し、肝機

能異常などが生じる。下気道症状が強いと、息切れ、空咳が生ずる。90%は自然治癒するが、10%が重篤なARDSを併発し、死亡する。SARS患者の20-30%がICUでの治療が必要となり、10%以上の死亡率となる。胸部X線上では初期に肺炎像を呈するが、その後肺炎像は消退し、新たな間質性肺炎の所見が生じる。この時期の治療にはステロイドによるパルス療法が極めて有用である。また最近、強い下痢症状を呈した患者の剖検例においてウイルスの存在が消化管上皮に観察された。消化管への直接的な感染により消化器症状が生ずることが疑われている。これらのことよりSARSウイルスは肺以外にも感染が生ずる全身性の感染症であることが明らかになった。

一方で我々は限られた種類の細胞では高率に肝臓癌由来細胞に感染を認めた。またSARS患者においては肝機能障害が悪化のマーカーとなることが知られているので感染者個体内では肝臓へのウイルス感染による直接侵襲をも考慮しなければならない。

SARSの治療には様々なものが試みられた。プロテアーゼインヒビター、リバビリン、インターフェロンは一定の効果を現したが、特効薬となるものはなかった。ここではウイルス表面に存在するS蛋白を介した侵入を特異的に阻止する薬剤の開発を目的として偽ウイルスを使用する方法で感染を阻害する物質をスクリーニングする方法を確立できた。今後この方法を用いて感染機構をより解明し、新たな地平にたった感染阻止物質を見出すことができると思われる。

E. 結論

適切なプラシミッドとそれに対応した細胞株を選定することにより SARS ウイルスの侵入を測定できる有用な方法が確立できた。生ウイルスを用いた測定法では検出できなかった侵入阻止活性がこの方法を用いて確定できるかもしれない。またこの研究を通じて、感染機構を研究することが可能になった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Usami O, Xiao P, Ling H, Lui I, Naksone T, and Hattori T Properties of anti- gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients *Microbes and Infection* in press
2. Low antibody response against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomized tuberculosis p

atients J. Ashino, Y. Ashino, H. Guio, H. Saitoh,

M. Mizusawa and T. Hattori The Int J Tb Lung

Dis in press

3. 服部俊夫 SARSを含む新興感染症 日本内科学
会雑誌 印刷中

2. 学会発表

服部俊夫 SARSを含む新興感染症 第102回 日
本内科学会 教育講演 平成17年4月7-9日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし