

200500640 A

平成 17 年度厚生労働省科学研究費補助金

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 18 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	1
II. 分担研究報告書	11
SARS ウイルス感染系における STAM1、STAM2、Hrs の役割	11
主任研究者 菅村 和夫 東北大学大学院医学系研究科	
海洋物微生物抽出エキスからの抗 SARS 因子探索	19
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	
桂皮および丁子エキスによる SARS-Cov の侵入阻止効果	22
分担研究者 服部 俊夫 東北大学大学院医学系研究科	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

I. 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：SARS ウイルス感染阻止化合物を発見し、有効な治療薬の開発につなげるために3つの研究プロジェクトを推進した。①ウイルスの吸着、侵入から出芽に至るライフサイクルに着目した研究により、小胞の酸性化に関与している Hrs の欠損した細胞でウイルス感染が亢進することを見いだした。②海洋微生物ライブラリのスクリーニングを行い、感染を抑制する化合物を2種類特定し、構造解析に着手した。③偽ウイルスおよび野生株ウイルスの感染系を用い、漢方薬エキスのウイルス感染抑制効果の検討を行い、桂皮樹皮と丁子から抽出したエキスが感染を抑制することを示し、精製により桂皮樹皮エキスの BuOH 画分に有望な因子が含まれることを明らかにした。

A. 研究目的

2002 年の後半、重症急性呼吸器症候群 (SARS) が中国で発生した。この新しい病気の流行は、新しいコロナウイルスによって引き起こされ (SARS コロナウイルス)、未知の動物のコロナウイルスが、人と感染動物との密な接触によって種の壁を越えたものであるが、それが病原体として同定された。ウイルスは速やかに新しい宿主に適応し人から人への感染性を獲得するだけでなく、より重篤な症状を引き起こすようになった。SARS コロナウイルスの発見は、中国で生きた動物を扱う市場で檻の中にいたジャコウネコから見つかったのだが SARS ウイルス流行が人獣共通感染であるという証拠を与えている。それに続く研究の示唆するところでは、ジャコウネコは SARS ウイルス

の増幅宿主であった可能性がある。香港特別行政区の野生生物を対象にしたコロナウイルスに関する調査研究によれば、コウモリ由来 SARS コロナウイルスがヒト SARS コロナウイルスに近いことが RT-PCR、遺伝子配列解析、酵素免疫学的検定によって明らかになった。航空機での旅行が SARS を急速に世界中に広め、最終的に 26 ヶ国 5 大陸の 8096 人に感染し 774 人の死者をもたらした。

コロナウイルスは一本鎖の+鎖 RNA ウイルスである。ウイルスの遺伝子は、長さが 29~32kb でコロナ様の形態を持ちウイルスエンベロープ膜に包まれている。ウイルスの遺伝子は主なものとして 5 カ所のオープン・リーディング・フレーム (ORF) が存在し、非構造蛋白質であるレプリカゼ複合蛋白質 (ORF1a、ORF1ab) およびス

パイク(S)、エンベロープ(E)、メンブレン(M)さらにヌクレオカプシド(N)をコードしている。これらの蛋白質のうち、レプリカゼ複合蛋白質は感染後直ちにウイルスのゲノムから直接翻訳される。ORF1ab をコードしている配列からは ORF1a、またリボソームシフトにより ORF1ab の二本のポリプロテインが合成される。これに対して、その他のウイルス構造蛋白質は、それぞれに対応した複数のメッセジャー RNA(mRNA)分子から翻訳される。ORF1a と ORF1ab 複合蛋白質は、パピイン様システインプロテアーゼと 3CLプロテアーゼによって分解されてウイルス転写と複製を行う複製複合体を細胞質内で形成する。構造蛋白質として S 蛋白質は、受容体との結合を担っており、また E と M 蛋白質はウイルス様粒子(VLP)形成に最低限必要な蛋白質である。N 蛋白質はウイルスのゲノム RNA と結合しリボヌクレオプロテイン(RNP)を形成する。

コロナウイルスの多くは呼吸器や消化器疾患に関与するが、マウス肝炎ウイルス(MHV)やネコ腹膜炎ウイルス(FIPV)などの一部のコロナウイルスは、呼吸器、腸管だけでなく神経、肝臓などのその他の部位に感染し重篤な疾患をもたらしている。一般的にコロナウイルス属は抗体や遺伝子の分析によって 3 つのサブタイプに分類できる。従来までは FIPV(ネコ)、HCV229E(ヒト)、TGEV(ブタ)などが一型、また BCV(ウシ)、MHV(マウス)、HCV-OC43(ヒト)が二型、IBV(トリ)が三型として分類されていたが、SARS コロナウイルスはこれらのどの型にもあてはまらない四型として新たに位置づけられた。

S 蛋白質はウイルスエンベロープ表面にあり、細胞への吸着と膜融合を仲介する重要な蛋白質である。アンギオテンシン転換酵素 2(ACE2)は SARS ウイルスの機能的な受容体であり、SARS ウイルスの S 蛋白と高い親和性を持って結合し感染を成立させる。

SARS ウイルスがどのようにして細胞に入るのだろうか。これは未だに明らかにされていない。エンベロープを有するウイルスはすべてウイルスエンベロープ膜と細胞膜または細胞小器官の膜との融合によって侵入し、それ以外のウイルスは境界膜を溶かすことにより膜上に小穴を開けウイルス成分を細胞質に放出する。細胞内部へのウイルス取り込み経路にはいくつかの経路がある。しかしそれらを明快に分類することは感染メカニズムを解明する上で非常に重要である。経路 A はクラスリン依存性経路に対応し、経路 B はカベオラを含む脂質ラフトの関与する小胞輸送経路に対応する。またその他の経路として C はピノサイトーシスやファゴサイトーシスなどのダイナミン非依存の経路に対応する。種々のウイルスが、エンベロープ型・非エンベロープ型に分類できるが、両者ともクラスリンの関与する経路と関与しない経路を利用すると報告されている。一般的にクラスリンの関与する経路はまず始めにウイルス-受容体複合体がクラスリン小胞により初期エンドソームへ運ばれ、後に後期エンドソームへ達する。これはウイルスの侵入にもっとも一般的な経路で、セムリキ森林熱ウイルス(SFV)、水胞性口内炎ウイルス(VSV)、アデノウイルス 5 型が代表例である。経路 A では、細胞内に取り込まれたウイルス受

容体は細胞膜へリサイクルされ再利用されるか、あるいはウイルス含有小胞(MVB)に取り込まれ、引き続きリソソーム内で分解される。肝細胞成長因子に制御されるチロシンリン酸化蛋白である Hrs は細胞内のシグナリングと膜輸送に関与する重要な分子である。Hrs は細胞内のユビキチン化蛋白の輸送に関与しているとされる。Hrs は STAM1 や STAM2 と結合し、ESCRT-0 複合体を形成する。この複合体はエンドソームのクラスリンを含む小領域に局在し、ユビキチン化蛋白を認識し、初期エンドソームから MVB/後期エンドソームへのユビキチン化蛋白の輸送に関わる。

ACE2 は SARS ウイルスの受容体として知られており、感染の成立に必須である。ACE2 の結合を阻害する抗体は、マウスにおいて感染を阻止する。SARS ウイルスに感染する細胞株には ACE2 が発現しているが、ACE2 非発現細胞株には SARS ウイルスの感染はみられない。他方、最近、ヒトにおける DC-SIGNR,L-SIGN,CD209L とマウスにおける DC-SIGNR(CD209)は ACE2 発現細胞における SARS ウイルス感染を促進することが報告された。しかし、ACE2 が存在しない条件では、感染がみられない。コロナウイルスの感染に必要な S 蛋白質は N 末端側の S1 と C 末端側の S2 領域に分けられる。S1 領域に受容体結合領域が存在し(SARS ウイルスの場合 318-510aa である)、それを介して受容体と結合する。その後、細胞由来プロテアーゼにより S1 と S2 が開列し、膜融合能をもつ S2 領域が細胞膜との融合を仲介しウイルスゲノムを細胞内に放出する。しかしながら SARS ウイルスの場合、S 蛋白質の S1

と S2 への開列は 2 つの領域を定義することはできるが現在のところ確認されていない。

ACE2 が SARS ウイルス感染に決定的な役割を果たしているという遺伝子的な証拠が *in vivo* での実験で示されている。ACE2 ノックアウトマウスにおいては非常に SARS ウイルスに対して感受性が低く(肺組織 1g あたり $<10^2$ TCID₅₀)、S 蛋白質 mRNA の複製量も緩やかに減少を示した。野生型のマウスに対する *in vivo* の SARS ウイルス感染実験では肺において顕著な ACE2 の発現の減少を示し、ACE2 の発現の減少が SARS ウイルスによって引き起こされる重篤な肺疾患を仲介している可能性を示唆するものであった。SARS ウイルスの S 蛋白質はレニン・アンギオテンシン系の脱制御を通じて急性の肺疾患症状を増悪させる。さらに SARS ウイルスのスパイク蛋白質によって引き起こされる肺疾患増悪は AT1R の抑制によって緩和可能である。

SARS の主な臨床症状は、持続的な発熱、悪寒、筋肉痛、倦怠感、咳、頭痛、呼吸困難などであるが 40~70%の患者が入院後下痢を訴える。報告によれば、プロテアーゼ抑制剤(ロピナビル、リトナビル)をネルフィナビルと組み合わせることで感染初期において抗ウイルス治療効果があるとしている。その一方で、ネルフィナビルは有望な抑制剤で、*in vitro* において侵入後の感染を抑制する。免疫性の肺損傷を防ぐためのインターフェロンやステロイドの投与に関してはさらなる研究が必要である。しかし、HIV 感染者に投与しているプロテアーゼ阻害剤や侵入阻害剤に関して、SARS ウイルス感染者には効果がないとしている

ものもあるが、*in vitro*の研究ではロピナビール、リトナビールといったプロテアーゼ抑制剤の抗ウイルス活性を報告しているものもある。結果においては最新の研究では確かめられていない。カテプシン L の抑制剤が SARS ウイルスの細胞侵入を阻害するという報告がある。SARS 患者に対する漢方薬と西洋医学を組み合わせた場合の有効性と安全性を評価するために 12 の無作為抽出群と、1 つの純無作為抽出群を対象に調査を行った。654 人の患者と 12 種類の漢方薬を対象とし、その結果漢方薬の併用は西洋医学単独と比較しても差がないことが示された。西洋医学の薬剤と漢方薬を組み合わせたら SARS 患者の症状、生活、肺の湿潤緩和、コルチコステロイド濃度といったものを緩和することができるかもしれない。SARS ウイルスに対する漢方薬の *in vitro*での効果について、いくつかのものは抑制効果を示すことが明らかになっている。たとえば、グリチルリチンは SARS ウイルスなどの複製を強力に抑制する。Lycoris radiate(中国名;石蒜)は SARS ウイルスを抑制するもっとも強力な薬物である。TGG とルテオリンは漢方薬由来のエキスであるが、SARS ウイルス野生株の感染系において抗 SARS ウイルス活性を示した。10000 以上の薬品に関してテストを行われ、レセルピン、Aescim、Valinomycin はより効果的な抗 SARS ウイルス剤であることが明らかになった。これに加えて、その他の抗ウイルス治療では siRNA が報告されている。*in vitro*で SARS ウイルスの強力な siRNA 抑制を示したものが、アカゲザルの SARS モデルにおいても臨床利用可能な範囲でその効果と安全性を確認することができた。

SARS 様の症状、SARS ウイルスの RNA 測定と肺の組織異常を観察し、それと免疫組織科学検査が一致して siRNA による抗 SARS ウイルス活性を示した。それは予防あるいは治療の局面において有効であった。ここで用いた siRNA は SARS ウイルスによる発熱を緩和し、ウイルスレベルを下げ、びまん性の肺胞障害を緩和した。

2003 年の最初の流行にもかかわらず、SARS ウイルスに感染した人が少数いる。そのうち数名は大流行の後、局地的な感染をしている。このような症例は SARS が再び世界的な流行を見せる可能性を残していることを示唆するものである。将来のヒトへの大流行を防ぐためには、抗ウイルス剤とワクチンの開発が必要である。

これらを踏まえ、我々は SARS ウイルスの感染および増殖機序を明らかにするための研究と、過程を阻害する物質の探索を並行して推進した。

菅村グループは SARS 偽ウイルスを用いて、様々な細胞株に対する感染効率を検討し、SARS ウイルス感染におけるエンドサイトーシス系および小胞輸送系蛋白の関わりの研究に最適の細胞株を選び、小胞輸送系蛋白を RNAi でノックダウンすることで、その関わりを明らかにすることを目的とした。

石坂グループの本年度の目的は、ウイルスのスパイク蛋白質 (S-蛋白質) と標的細胞のアンギオテンシン転換酵素-2 (angiotensin converting enzyme-2 以下 ACE-2) の結合を阻害する化合物を海洋エキスからスクリーニングし、同定することであった。

服部グループは、SARS ウイルスの感染

機序を明らかにすることと、そのプロセスを阻害する因子の探索を行うことを目的とした。今年度は細胞膜融合系を用い、スパイク蛋白と標的細胞表面の ACE2 との結合の過程を観察した。前年度に作成した偽ウイルス系を用い漢方薬エキスの感染抑制効果の検討を行った。さらに新たな試みとして、偽ウイルス系の代わりに SARS 野生株ウイルスを用いた感染実験も行い、漢方薬エキスの感染抑制効果を検証した。

本研究によって感染阻害物質が同定されれば、再び SARS が流行した際に迅速かつ効果的な対応が可能となる。それは人命のみならず社会的・経済的損失を最小限に食い止めることにもつながると期待される。

B. 研究方法

(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)

ウイルスの細胞内への取り込みの過程の解明を行う。そのためにエンドサイトーシス関連蛋白および小胞輸送関連蛋白の役割に着目した。小胞輸送関連蛋白の発現を阻害したノックアウト細胞あるいはノックダウンを樹立し、感染実験を行いこれらの蛋白の役割の解明を試みた。

(2)海洋微生物抽出エキスからの抗 SARS 因子探索 (石坂)

精製した S 蛋白質を ELISA プレートに結合させたのちに部分精製した ACE-2 を作用させた。これを蛍光標識した抗 ACE-2 抗体を作用させ、蛍光プレートリーダーを用いて結合性をモニターした。さらに S または

ACE-2 蛋白質をセンサーチップに結合させ、ビアコア (Biacore J) を用いて候補化合物エキス中の結合性を解析した。

新たにレンチウイルスを用いた感染システムの立ちあげと (インビトロジェン社製)、ACE-2 活性測定システムの導入も行った。

(3)漢方薬エキスの感染抑制効果の確認 (服部)

感染実験に先立ち、Vero E6(アフリカミドリザル腎上皮細胞由来)、HepG2 (ヒト肝細胞癌由来)、Hela (ヒト子宮頸部上皮癌由来) の他多数の細胞株についてスクリーニングを行い、HIV/SARS 偽ウイルスへの感受性を持つものを選別した。偽ウイルスは昨年報告した方法で作成した。

細胞膜融合抑制分析では 293T 細胞に S 蛋白を発現させ、calceinAM でラベルした。これを pQACE2 プラスミドの導入された Hela 細胞と共培養した後洗浄を行い、倒立型蛍光顕微鏡(×200)で膜融合によって染色された Hela 細胞の数を数えた。

SARS ウイルス野生株 PUMC01 F5 を用いた感染実験を行い、漢方薬エキスの効果を検討した。12 種類の漢方薬を用いた。偽ウイルス感染実験と同じ条件で細胞毒性の検討を行った。HepG2 細胞 1×10^4 個を 96 ウェル plate で培養し、24 時間後に漢方薬エキスを加えた。14 時間培養の後、細胞洗浄を行い、DMEM を加えた。CCK-8 試薬を加えた後に 4 時間後 OD450 を読み取り 50%成長抑制の濃度を決定した。有望な漢方薬についてエキスの精製を行った。桂皮樹皮は、50%アルコールで 2 時間還流した。抽出物は減圧下で濃縮しこれを第 1 画分とした。これを純水で溶解しエチルアセター

ト層は濃縮を行い、それぞれ第 2 画分、第 3 画分、第 4 画分とした。

C. 研究結果

(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)

SARS-CoV のスパイク (S) 蛋白を発現する偽 SARS-CoV 感染系を用い、ウイルスの吸着および侵入を検討した。その結果、細胞内侵入には ACE2 の発現が必須であるほか、クラスリン重鎖 (CHC) の発現が関連することが判明した。さらに小胞輸送関連蛋白である HRS 依存性に侵入制御を強く受けることが判明した。したがって、SARS-CoV の感染成立において、ACE2、クラスリンおよび ESCRT 小胞輸送系蛋白群が密接に関与することが明らかとなった。

(2)海洋微生物抽出エキスからの抗 SARS 因子探索 (石坂)

4500 種類のエキスをスクリーニングした。陽性検体は、現時点で以下のようになっている。また三次スクリーニング陽性の 10 検体のうち、5 個に ACE-2 活性が認められている。

<スクリーニング結果>

固相法陽性検体数	550 個
Biacore 陽性検体数	45 個
抗ウイルス活性陽性検体数	10 個
構造決定中検体数	1 個

(3)漢方薬エキスの感染抑制効果の確認 (服

部)

HIV/SARS 感染抑制実験によると桂皮樹皮エキス (CCE) と丁子エキスが細胞毒性を示さずに感染を抑制した。その選択的指標 (SI) は 6.67 と 12.93 であった。桂皮樹皮エキスは標的細胞を前処理することで感染を抑制したが、丁子エキスにはそのような効果はみられなかった。

桂皮樹皮エキスの 4ethanol-aqueous fractions を検討したところ、BuOH の画分と AcOE の画分は低濃度で明らかな抑制を示した。しかしながら、後者の画分は強い細胞毒性を示した。BuOH の画分の HIV/SARS に対する SI は 4 であった。

293T-S と Hela-ACE2 を用いた細胞膜融合系を用いて桂皮樹皮エキスと丁子エキスおよびそれらの画分の感染抑制効果を検討した。その結果、桂皮樹皮エキスの BuOH 画分が強力な抑制効果を示した。

感染性ウイルスに対する薬剤の抑制効果を観察した結果、桂皮樹皮エキス、丁子エキスに感染抑制効果を認めた。それらの精製画分についての検討も行った結果、桂皮樹皮エキスの Aq.EtOH 画分と BuOH 画分が感染を強力に抑制することが示された。

D. 考察

(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)

以前の報告にある ACE2 に加えて、本研究により、エンドサイトーシス関連分子であるクラスリン重鎖および小胞輸送関連分子 Hrs がウイルス増殖に影響していることがわかった。したがって①SARS-CoV の細胞内侵入にはクラスリン依存性経路が密接

に関わること、②小胞依存性細胞内侵入経路が存在し、通常ではウイルス分解がMVB依存性に行われていること、が考えられる。特に、小胞の酸性化に関与しているHrsの欠損した細胞ではウイルス感染が亢進した。実際に小胞輸送関連分子Hrsの欠損によりMVB形成が異常となり、結果として肥大化形態を呈したことと密接に関連したものと解釈している。

(2)海洋微生物抽出エキスからの抗SARS因子探索 (石坂)

海洋エキスライブラリーから、10個の候補化合物がスクリーニングアウトされた。二次・三次スクリーニングまで陽性を示しながら、培養上清中の抗ウイルス活性の再現性が不安定なために、その後のスクリーニングを行うことができない候補エキスが少なからず認められた。培養法の一層の改良が望まれる。

現在、1検体について、逆相クロマトグラフィーを用いた精製を試みている。クロマトグラフィー後の精製パターンで得られるピークに一致して抗ウイルス活性が認められている。この検体について、年度内に構造に関する情報を得、合成を試みることを目指す。

(3)漢方薬エキスの感染抑制効果の確認 (服部)

偽ウイルス感染系と細胞膜融合系を用いて、桂皮樹皮エキスと丁子エキスがSARSウイルスの感染を抑制することを明らかにした。これらの感染系は、ウイルスのスパイク蛋白と標的細胞膜上のACE2との結合を検出するものであることから、桂皮樹皮

および丁子エキスはSARSウイルスが標的細胞に侵入する過程を阻害するものであると考えられる。桂皮エキスで細胞を前処理した場合感染が阻止され、丁子エキスにはそのような効果がみられなかったことから、その作用機序が異なることが示唆された。

さらに、それらの精製画分についての検討を行い、桂皮樹皮エキスのBuOH画分に感染を強力かつ有効に抑制する因子が含まれることを示した。

臨床応用の可能性を探るために、感染性ウイルスに対する抑制効果の検討もを行い、桂皮樹皮エキスの有効性を確認した。今後は動物モデルでSARSウイルスの感染抑制効果の検証を行い、治療に有効な薬剤の開発につなげるとともに、漢方薬エキスがどのようなメカニズムでSARSウイルスの感染を抑制しているのかを解明し、ウイルス感染機序の解明に貢献することを目指す。

E. 結論

小胞の酸性化に関与しているHrsの欠損した細胞ではウイルス感染が亢進した。小胞輸送関連分子がウイルス増殖に影響していることがわかった。これは、小胞依存性のウイルス分解が抑制されるためであると考えられる。

海洋微生物抽出エキス 4500種類のスクリーニングの結果、10個のSARS感染阻害因子を得た。そのうち1種類について逆相クロマトグラフィーによる精製を試みている。感染を抑制する候補物質が複数発見された。従来ほとんど手のつけられていなかった資源の有望性を示すものである。

偽ウイルスを用いた細胞膜融合過程の観察、感染性のウイルスを用いた実験を行い、

この過程を桂皮樹皮エキスと丁子エキスが阻害することを明らかにした。桂皮エキスで細胞を前処理した場合感染が阻止され、丁子エキスにはそのような効果がみられなかったことから、その作用機序が異なることが示唆された。さらに、有効因子を同定するためにエキスの精製を行い桂皮樹皮エキスのBuOH画分に有望な因子を含むことを示した。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

論文

(菅村分)

1. Niinuma, A., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F., Tanaka, N., Sugamura, K., Xie, L., Green, P.L. and Fujii, M.

Aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop through the nuclear factor of activated T cells by nonleukemogenic human T-cell leukemia virus type 2 but not by leukemogenic type 1 virus. *J. Virol.*, 79, 11925-34, 2005.

2. Hendriks, J., Xiao, Y., Rossen, J.W.A., van der Sluijs, K.F., Sugamura, K., Ishii, N. and Borst, J. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J. Immunol.*, 175, 1665-1676, 2005.

3. Wang, X., Ria, M., Kelmenson, P.M., Eriksson, P., Higgins, D.C., Samnegård, A., Petros, C. C., Rollins, J., Bennet, A.M., Wiman,

B., de Faire, U., Wennberg, C., Olsson, P.G., Ishii, N., Sugamura, K., Hamsten, A., Forsman-Semb, K., Lagercrantz, J. and Paigen, B. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nature Genet.*, 37, 365-372, 2005.

4. 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.

(石坂分)

1. Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 66, 627-631, 2006.

2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1499-1506, 2005.

3. Shimura M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS* 19, 1434-1438, 2005.

(服部分)

1. Li, D., Gu, H., Zhang, S., Zhong, Z., Zhuang, M., and Hattori, T.
YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China. *J. J. Infectious Diseases*. 59:42-45. 2006.
2. Usami, O., Xiao, P., Ling, H. and Hattori, T.
Competitive study of monoclonal antibodies against the HIV-1 gp41 core structure. *Microbiology & immunology*. 50:131-34. 2006.
3. Haizhou, Z., Yan, L., Hong, L., Yangcheng, L., Bingcheng, H. and Hattori, T.
Cloning and analysis of HIV-1 envelope CHNHLJ03009 isolated from an infected individual in Heilongjiang province. *Chinese Microbiology and Immunology*. In press
4. Ashino, J., Ashino, Y., Guio, H., Saitoh, H., Mizusawa, M. and Hattori, T. Low antibody response against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomized tuberculosis patients. *The Int. J. Tb. Lung Dis.*, 9:1052-3. 2005.
5. 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*, 4: 650-7,2005.

口頭発表

(菅村分)

US-Japan 23rd Annual Immunology Board Meeting
(Seattle, Jul.26-27, 2005)
Roles for a T cell Costimulatory Molecule OX40 in Survival of Effector Memory

CD4⁺ T cells

(石坂分)

1. 大沢宜明、芳賀しおり、石坂幸人 SARS ウイルスに対する分子標的治療法の開発 題 28 回 日本分子生物学会年回 神戸、平成 17 年 12 月。

(服部分)

1. Toshio Hattori, X Peng; H Ling; M Zhuang
The inhibitory effect of chinese herb on SARS pseudotyped virus infection.
Lipid rafts and cell function. March 23-28, 2006. Steamboat, Keystone symposium
2. 庄敏 第 14 回感染症呼吸器疾患セミナー
The inhibitory effect of Chinese herb on SARS-CoV entry. 1st July, 2005. 仙台

H. 知的財産の出願・登録情報

特許取得

(菅村分)

1. Protein AMSH and cDNA thereof
特許番号：米国特許(United States Patent) US6,838,551 B2
出願人：Kazuo Sugamura and Nobuyuki Tanaka
特許日：Jan. 4, 2005.
2. PROTEIN AMSH AND cDNA THEREOF
特許番号：豪州特許 Austrian patent No.: 773, 717.
出願人：Sugamura, K and Tanaka, N.
特許日：Sept.16, 2004.

3. タンパク質 AMSH とその DNA
特許番号：特許第 3 7 6 4 2 8 6 号
出願人：菅村和夫、田中伸幸

特許日：平成18年1月27日

器病センター、ブリジストン株式会社

出願日：2005, 11, 4

(石坂分)

1. 遺伝子ベクター

実用新案登録 なし

出願番号：特 2005-320952

その他 なし

出願人：国立国際医療センター、国立循環

Ⅱ.分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

SARS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、SARS-CoV の感染、細胞内侵入への関与を検討した。(結果) SARS-CoV の Spike (S) 蛋白を発現する偽 SARS-CoV 感染系を用い、ウイルスの吸着および侵入を検討した。その結果、細胞内侵入には ACE2 の発現のほか、クラスリン重鎖 (CHC) の発現が相関することが判明した。さらに小胞輸送関連蛋白である HRS 依存性に侵入制御を強く受けることが判明した。従って、SARS-CoV の感染成立において、ACE2、クラスリンおよび ESCRT 小胞輸送系蛋白群が密接に関与することが明らかとなった。

■ 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 は全長約 29kb にもおよぶ + 鎖

RNA をゲノムにもつ RNA ウイルスである。コロナウイルスは一般的に 3 つのグループに分類されていたが、SARS-CoV がこれらのどのグループにも属さないことが分かり他のコロナウイルスより複雑な複製戦略をとっていることが示唆されている。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 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ものが存在している。

宿主細胞には ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) と呼ばれ

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。昨年度の研究においてエンベロープウイルス(MCMV)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が密接に関与していたことから、本年度はSARS-CoV偽ウイルスを用いて吸着から細胞内侵入にいたる感染初期にまず焦点を当てその詳細を明らかとすることを目的とした。

一般に一部のコロナウイルスでは細胞内侵入にエンドサイトーシスを利用することが知られている。細胞生物学的にClathrin依存性、Caveolaeを含むlipid raft依存性、pinocytosisやphagocytosis依存性に分類されるエンドサイトーシスが知られている。これまで明らかとなった細胞内へのエンドサイトーシスの例としては、Semliki forest virusおよびVesicular stomatitis virus(VSV)がクラスリン(Clathrin)を利用して細胞内侵入すること、およびSimian virus40(SV40)がカベオラ(Caveolae)を利用して細胞内侵入することがよく知られている。しかしながら、SARS-CoVがこれらのどの経路を利用して細胞内に侵入しているかは未だに解明されていない。したがって、本研究によりSARS-CoVの細胞内侵入の機構を明らかにすることで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

細胞株

Caco-2 (ヒト結腸由来ガン細胞); HepG2 (ヒト肝細胞癌由来); 293T (ヒト初期腎細胞); HRT18G (ヒト直腸ガン細胞); COS7 (アフリカグリーンモンキー腎細胞) Huh 7 (ヒト高分化型肝細胞癌由来)

プラスミド

pCMV Δ R8.2, pNL43-R-E-, pHR'CMV-Luc, pMDG, CMV/R-SARS-S, pcDNA3.1-SARS, pNGV-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ジェ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。A-MLV envを発現するpDJ1は京都大ウイルス研より分与された。PcDNA3.1-ACE2-C9はACE2の発現に使用した。

SARS偽ウイルスの作成

5×10^6 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、リン酸カルシウム法を用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。

pCMV Δ R8.2(7ug), pHR'CMV-Luc(7ug), SARS Spike発現のためにpCMV/R-SARS-S(0.8ug)、VSV G発現のためにpMDG(7ug)、またA-MLV env発現のためにpDJ1(7ug)。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、上清を回収し0.45umのフィルターでろ過したのち-80°Cで保存した。

偽SARS-CoVウイルス感染

10^4 のHepG2細胞を96穴プレート上で培養し、25uLの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、50uLのmammalian cell lysis bufferを加えてcell lysateを回収する。25uLのcell lysateのluciferase activity (RLU)をLuciferase assay

reagentで処理したのちluminometer (Berthold)で測定し、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。

本研究に使用したprimerは以下のとおりである。

1) ACE2

5'-gcactcacgattgttgggact-3'

5'-attagccactcgcacatcctc-3'

2) Clathrin heavy chain (CHC)

5'-cgcttgctcagcggttgaa-3'

5'-catcaactggggctgacat-3'

3) Caveolin-1

5'-ggagatcgacctggtaacc-3'

5'-acacggctgatgcactgaat-3'

ウエスタンブロット

ACE2、CHC蛋白に対する抗体を使用した。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℃, 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10% ポリアクリルアミドゲル(和光純薬工業)により分離した。分離された蛋白をImmobilonP(Millipore)に対してブロットした。上記モノ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。

(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

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における分子生物学的機構には未だ不明の点が少なくない。そこで本研究

ではまず偽SARS-CoVの宿主細胞感染成立の詳細を以下の通り検討した。

1. SARS-CoV偽ウイルスの作成と感染性

ウイルスの細胞内侵入を検討するために、SARS-CoV偽ウイルスを調整しSARS-CoV偽ウイルスの性質を検討した。SARS-CoV偽ウイルスはエンベロープにSpike蛋白を発現する以外は、基本構造をHIVと同一にしている。偽ウイルスを含む培養上清を超速心法により濃縮し、得られた沈殿を可溶化後にSDS-PAGE法により展開しウエスタンブロット法によりウイルス粒子内のSpike蛋白を検出した(図1A)。その結果、SARS-CoV偽ウイルスのみにS蛋白の発現が認められ、コントロールとして用いたVSVおよびAMLVの偽ウイルスでは検出されなかった。したがって、我々の調整したSARS-CoV偽ウイルスが実際にS蛋白を発現していることが確認できた。

次に数種類の細胞株に対する偽ウイルスの感受性を調べた。これまでの報告では、Caco-2 およびHuh 7においてSARS-CoVの感染性があることが報告されている。我々の実験の結果では、Caco-2 およびHuh 7において感染性が認められた。同様にHepG2、293Tにおいても感染性が認められた。この結果は基本的に報告されているとおりのtropismであった(図1B)。

これまでの報告でSARS-CoVの感染には宿主のACE2が受容体として必須であることがわかっている。そこで次に、作成した偽SARS-CoVウイルスがACE2依存的に細胞内に侵入するかを調べた。SARS-CoV偽ウイルスに対して感受性を示さなかったHRT18GとCOS7細胞にACE2を一過性に発現させ、それぞれのコントロール細胞と比較しながら感染実験を行った。その結果、ACE2を発現させた細胞で感染性が認められたものの、ACE2の代わりにEGF受容体を導入した細胞株では感染性が認められなかった。したがって、HRT18GとCOS7細胞においては感染のためにACE2が必須であることが判明した。ウエスタンブロットの結果と合わせ、これらの結果から作成した偽ウイルスがSARS-CoVと同一の性質を保有することが確認できた。さらに、今回実験に使用したSARS-CoV偽ウイルスを用いることで、SARS-CoVの感染系を定量的かつ安全に行えることがわかった。

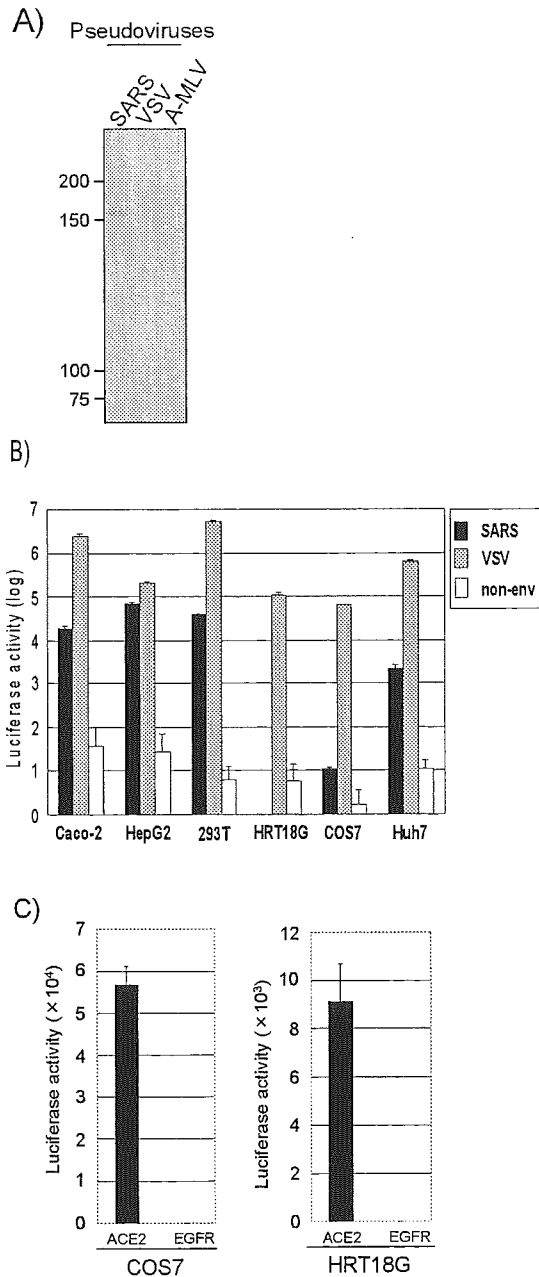


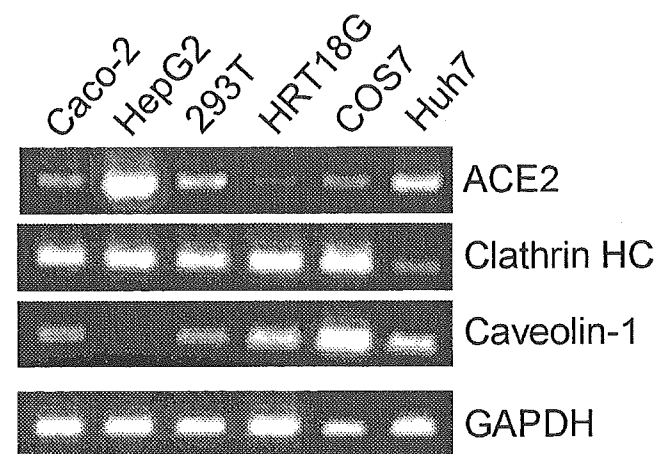
図1
偽SARS-CoVウイルスの作成とその感染性。
(A: 培養上清中に放出されたウイルス様粒子(VLP)中に認められたS蛋白, B: 各種細胞株を用いた偽SARS-CoVウイルス感染。C: ACE2発現による非感受性細胞の感染性獲得。感染性はluciferase値で示している。)

2. 各種細胞間におけるACE2およびエンドサイトーシス関連分子発現量の定量的比較

次に、SARS-CoVの細胞内侵入機構を解明するために、SARS-CoVの受容体であるACE2、細胞内へのエンドサイトーシスに関連した分子である

Clathrin HC (CHC) およびCaveolin-1のmRNA および蛋白発現量の比較を、RT-PCRとwestern blottingにより比較した(図2)。その結果、ACE2のmRNAの発現はHepG2に非常に強いことが判明した。さらにCaco-2, 293Tにおいても発現が認められた。一方、Huh7においてもACE2は発現していたが、COS7では発現はほぼ測定限界下限であった。一方、western blottingにおいては、ACE2の発現はHepG2で非常に強く認められ、Huh7と293T細胞に弱く発現していた。長期露光においてはCaco-2に発現が軽度認められたが、HRT18GとCOS7ではいずれも発現量は検出限界以下であった。以上の結果から、図1Bで見られたSARS-CoV偽ウイルスの感受性とACE2の発現は少なくとも定性的に一致していた。またHepG2細胞においてのみ他の細胞より強いACE2の発現が確認できた。次にエンドサイトーシス関連分子の関与を調べる目的で、クラスリンとカベオリンに着目し発現を検討した。CHCに関してはmRNAレベルではHuh7で発現量が低かったものの、蛋白レベルの検討では調べたすべての細胞に発現していた。Caveolin-1はCaveolae形成において必須分子でありcaveolin-1の発現を比較することでcaveolae発現量の比較が可能であることがわかっている。Caveolin-1 mRNAはHepG2細胞を除くすべての細胞株において発現していた。またwestern blottingにおいては、COS7とHRT18Gに強い発現が認められたものの、少なくともHepG2にはcaveolin-1を発現していなかった。

以上の結果より、SARS-CoV偽ウイルスの感受性はACE2の発現細胞において高く、少なくとも感染細胞はクラスリン重鎖を発現していたものの、感染性にcaveolin-1は必須でないことがわかった。



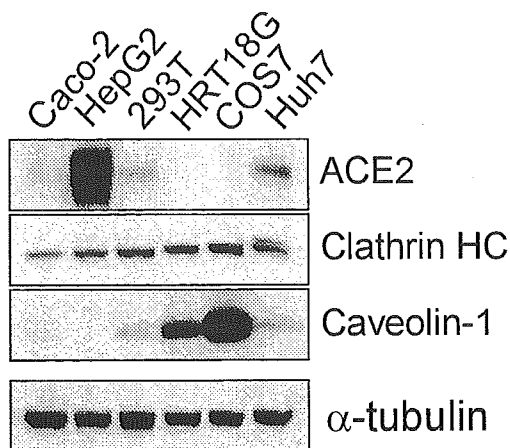


図2. ACE2、CHC、Caveolin-1のmRNAおよび蛋白発現量の比較(上:mRNAのRT-PCR法解析、下:western blottingによる蛋白量解析)

3. HrsノックダウンによるSARS-CoV偽ウイルス感染の検討

エンドサイトーシスされたウイルスは小胞内において受容体と結合した状態から最終的に小胞膜と融合し最終的に細胞質内へと脱出すると考えられる。この過程において小胞の成熟が関与し同時に小胞輸送系が機能する可能性がある。そこで、SARS-CoVウイルス感染における、小胞輸送系主要分子Hrsの機能を検討する目的でsiRNAを用いたノックダウンを行った。293T細胞を用いた蛋白レベルの検討の結果、ほぼ95パーセントのノックダウン効果が得られることがわかった(図3A)。そこで、この条件下で3種の偽ウイルスの感染がHrsにより影響を受けるか検討した。その結果、Hrsノックダウンは偽SARS-CoVの感染時に感染効率を有意に上昇させた(図3B)。一方、VSVにおいては感染性の上昇は有意であったもののその程度はSARS-CoVに比較して軽度にとどまった。AMLVの感染ではHrsの関与はほとんど認めることができなかった。以上の結果から、SARS-CoVの感染はHrsが負に制御しており、Hrsのターゲティングにより感染性が有意に上昇することが判明した。

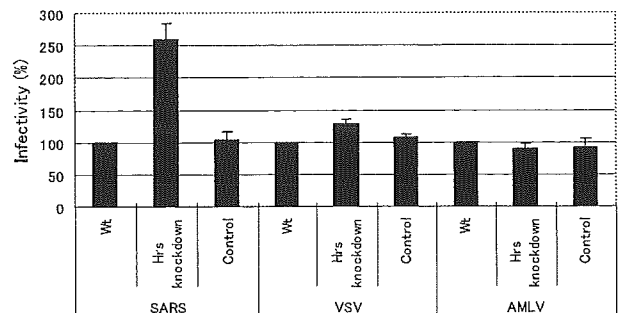
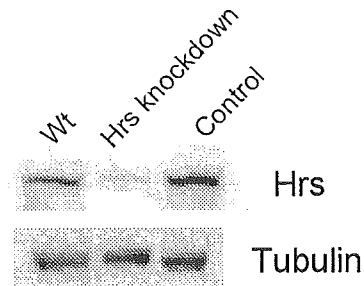


図3.

Hrsノックダウンによる偽SARS-CoV感染(上:Hrs蛋白のRNAiによるノックダウン、下:Hrsノックダウンによる偽SARS-CoV, 偽VSV, 偽AMLVの感染性の比較。Infectivityはルシフェラーゼ値を補正した値(%)で示した。)

D. 考察

本研究ではSARS-CoVの細胞内進入にACE2が必須であることが確認できた。ACE2は既にSARS-CoVの受容体であることが知られており、我々の今回の実験データはこれまでの報告と一致する。今回、HepG2が偽SARS-CoVに高感受性であった。しかしながら、野生型のSARS-CoVの感染系を用いた報告では我々の結果に比べHepG2の感受性は決して高くない。この理由として、野生型を用いた感染から増殖にいたる一連のウイルスのライフサイクルと、偽ウイルスを用いたウイルスエントリーの実験系の差異があることが考えられる。たとえば、MHVではウイルス受容体を発現する細胞が必ずしもウイルス増殖と一致しないことが報告されている。また、我々のウシコロナウイルスを用いた予備的検討においてもコロナウイルスのエントリーと増殖は必ずしも一致せず、たとえばゲノム

複製の段階で宿主側因子の違いにより複製のアレストが認められている。しかしながら、SARS-CoVの細胞内侵入はウイルス感染増殖の最大のステップの一つであることから、重要であることはいうまでもない。今回の検討では、HRT18GおよびCOS7を用いた検討によりACE2の遺伝子導入が感染成立に劇的な効果を示した。このことは、ACE2が感染成立に必須であることのみならず、ACE2以外の共役分子(受容体、エンドサイトーシス関連分子)がすべてこの細胞に具有されていることを示唆している。

本研究では、すべての感受性細胞においてクラスリンの発現が認められた。クラスリンはエンドサイトーシスの主要な経路の一つであることが良く知られ、重鎖と軽鎖がcage構造をとりダイナミン依存性に細胞内小胞にウイルスを積荷として移行させるものと考えられる。一方、もう一つのエンドサイトーシス経路であるカベオリンはHepG2においてmRNAおよび蛋白のいずれも検出することができなかった。この事実から、少なくともカベオリン(caveolin1)はSARS-CoVのエンドサイトーシスには必須ではないことが明らかとなった。今後、エンドサイトーシスにおけるクラスリンの機能を明らかにするため、特異的阻害薬およびRNAiを用いた検討が必要であると考えられた。

小胞輸送蛋白HrsをノックダウンすることによりSARS-CoVの感染性が有意に上昇した。吸着したSARS-CoVは、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および小胞成熟を経て細胞質内に侵入することが報告されている。すなわち一過性に形成されたACE2受容体・SARS-CoV複合体がエンドサイトーシスにより初期エンドソームに移行する可能性が想定されている。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へと輸送する可能性が考えられる。今回の結果は、SARS-CoVのMVB内部小胞への輸送異常により小胞膜においてMVBを経ずにより高効率にfusionが起こった可能性が考えられる。一方、エンドソーム依存性(リソソーム依存性)

ウイルス粒子の分解が阻止された可能性も想定される。これをまとめると、想定されるHrsの関与としては、1)エンドサイトーシス直後のACE2輸送と小胞成熟、2)ACE2/SARS-CoV複合体のMVB内部へのinvagination、3)MVB内部における脱殻、4)MVBあるいは後期エンドソーム膜への融合(Backfusion)の各ステップが挙げられる。Hrsは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Phosphatidylinositol-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。今後、ACE2受容体・SARS-CoV複合体のSTAMs・Hrs複合体によるコントロールを、さらに詳細に解析することが重要と考えられる。特に、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こと、電子顕微鏡によりウイルス侵入、小胞内輸送の超微細構造を検討することが必要である。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ことが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重要であることが期待される。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検討を行うことが必要である。

E. 結論

偽SARS-CoVの感染系を用いて、ACE2、クラスリン、カベオリンおよびHrsの関与を検討した。ACE2は感受性細胞に置いて発現しており、ACE2の導入により複数の細胞を感受性細胞に変換することが確認された。一方、感受性細胞においてはいずれもクラスリン重鎖が発現しており、インターナライズとの関連が期待された。一方で、カベオリンは感受性細胞において欠損している例が認められたことからSARS-CoVのエンドサイトーシスには必須でないことが明らかとなった。小胞輸送系蛋白Hrsは感染抑制に働いている可能性が示唆され、ウイルスの細胞内輸送の関与が始めて明らかとなった。本研究の結果、SARS-CoVのライフサイクルにおけるエンドサイトーシス