

「Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections」

分担研究者 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

研究要旨

我々は、急性呼吸器感染症(ARI)の検査に利用するための、ウイルス高感受性細胞の作成を試みている。数種の ARI ウイルス(インフルエンザ、メタニューモ、コロナ)は肺に特異的に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を利用して細胞に感染することが報告されている。我々は、TMPRSS2 の発現した Vero 及び HeLa 細胞を作成し、既存のヒトコロナウイルス(229E、NL63、SARS)と新型コロナウイルス(HCoV-EMC)に対する感受性を比較した。TCID50、ウイルス増殖、感染細胞の免疫染色を行ったが、いずれのウイルスでも TMPRSS2 発現細胞の方が非発現細胞よりも感受性が高かった。特に新型コロナウイルスでは 100 倍もの高い感受性が見られた。またウイルス増殖が非常に低いと考えられている NL63 において、51 倍の増殖が見られた。TMPRSS2 細胞はコロナウイルスの研究とサーベイランスの分野に貢献できるものと考えられる。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症(ARI)は小児死亡原因の第一位であり、世界では毎日 5,000 人の子供が死亡しているといわれている。多くの ARI ウイルスは咳を介して感染することから感染力が強く、瞬く間に世界中に広がる可能性を内包している。このような感染症に立ち向かうために、我々研究者は国際的なネットワークを構築し、情報を交換できる環境をつくることが必要不可欠であると考え、我々は中国 CDC のインフルエンザ研究センターと連絡をとり、ARI の共同研究体勢の構築を試みている。

ARI ウイルスの研究を難しくしている原因は様々あるが、その一つは、肺胞の性質を維持している良い培養細胞株が無いことにある。培養細胞で増殖が不可能なウイルスは研究が遅れる傾向がある。ヒト肺胞上皮細胞の初代培養は比較的難しく、数代の継代で肺胞の性質が無くな

ってしまうことが知られている。最新の培養法を用いれば、肺胞の性質とインフルエンザウイルスの感受性を維持したまま長時間培養できることが報告されているが、極めて特殊な技術であることに加え高価であり、簡単に扱えるものではない。また、Calu-3 や MRC5 等のよく研究に利用されている肺胞由来の細胞株は、肺胞の性質をある程度維持しており、低いながら様々な ARI ウイルスに感受性があるが、増殖が遅く性状が不安定であり、培養も難しい。肺胞の性質を維持しつつ扱いやすい培養細胞があれば、新たな ARI ウイルスの分離や既存の ARI ウイルスの基礎研究が劇的に進展することが期待できるだけでなく、病原体診断やサーベイランスの分野でも利用できるはずである。我々は様々なウイルスに対して感受性の高い Vero 細胞を用い、ARI ウイルスの感受性がより高くなるように改良を行う。

B. 研究方法

TMPRSS2 発現細胞と非発現細胞を HeLa と Vero 細胞で作成し、様々なヒトコロナウイルス(229E、NL63、OC43、SARS、EMC)を感染させ、細胞変性効果、TCID50、ウイルス増殖を比較した。また、細胞変性を示さなかった NL63 については、抗スパイク蛋白抗体を用いて免疫染色をおこない、感染価を比較した。

C. 研究結果

HCoV-EMC は TMPRSS2 非発現細胞では感染 48 時間で細胞のラウンディングが起こるのに対し、発現細胞では 16 時間程度で、著しく大きい細胞融合が見られた(図 B)。同じ感染価のウイルスを用いて TCID50 で比較した場合、TMPRSS2 発現細胞ではウイルス感受性が 100 倍程度高くなっていた(表)。しかしウイルスの増殖は数倍程度の上昇が見られるのみであった。著しい細胞融合活性がウイルス増殖を阻害していると考えられる。

SARS-CoV については、既に 2010 年に報告している結果と同様であるが、TMPRSS2 発現細胞で、TCID50 は 7.9 倍、ウイルス増殖は 2.5 倍であった(表)。

鼻風邪、上気道炎のコロナウイルス NL63 については、細胞変性効果は見られなかったが、免疫染色(図 A)による感染細胞の計測結果(FFU)では TMPRSS2 発現細胞では 51 倍感受性が高くなっていた(表)。

また他の鼻風邪、上気道炎コロナウイルス

229E には 1966 年に分離され、長年研究室で継代されているラボ株と、2008 年に分離された臨床株があるが、ラボ株で 1.4 倍、臨床株で 11.5 倍の HeLa/TMPRSS2 での感受性が見られた(表)。

さらに、鼻風邪、上気道炎コロナウイルスの OC43 は HeLa では全く細胞変性効果が見られなかったが HeLa/TMPRSS2 では細胞の浮遊が見られた。感受性細胞として知られる RD 細胞との比較では、HeLa/TMPRSS2 の方が 10 倍程度ウイルス感受性が高くなっていた(表)。

D. 考察

コロナウイルスのスパイク蛋白の活性化にはプロテアーゼが必要と考えられており、本研究で用いた細胞では TMPRSS2 がスパイクを活性化したと考えられる。生体内のウイルスは肺胞特異的なプロテアーゼ、特に TMPRSS2 を利用して感染すると考えられるので、生体内にあるウイルスそのものを分離するためには、TMPRSS2 発現細胞を使うことが望ましいと思われる。

E. 結論

HeLa 及び Vero の TMPRSS2 発現細胞はコロナウイルスの分離に有効な細胞である。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

Title

Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections

Name

Shutoku Matsuyama

Department of Virology 3, National Institute of Infectious diseases (NIID), Japan

Abstract

Susceptibility of several human coronaviruses (229E, NL63, OC43, SARS) and the recently isolated novel human coronavirus (HCoV-EMC) to the Vero or HeLa cells that constitutively expressing type II transmembrane serine protease TMPRSS2 (Vero/TMPRSS2, HeLa-TMPRSS2) was assessed. Susceptibility of TMPRSS2 expressing cells were higher than that of non-expressing cells on TCID₅₀. A clear large syncytium was observed in TMPRSS2 expressing cells infected with 229E, SARS and EMC strain, but no CPE in NL63 infected cells. Using a peptide-antibody against the cytoplasmic tail of HCoV-NL63 detected the 51 fold enhancement of NL63 infection in TMPRSS2 expressing cells. For a reason of high susceptibility, Vero/TMPRSS2 cells may contribute to the research and the surveillance of human coronaviruses.