

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

細胞内脂質合成を標的とした抗高病原性ウイルス療法の分子基盤

分担研究課題：細胞内脂質合成を標的とした抗ルジョウイルス療法
の分子基盤

研究分担者：浦田 秀造 (長崎大学熱帯医学研究所 助教)

研究要旨： 本研究は高病原性新型アレナウイルスであるルジョウイルスの細胞内増殖における S1P/SKI-1 阻害の影響を検討し、S1P/SKI-1 阻害が有効な抗ルジョウイルスとなり得るか評価するものである。感染性ルジョウイルスはBSL-4でのみ使用可能であることから、本年度はBSL-2で解析可能なタンパク質発現プラスミドを作製し、ウイルス様粒子 (VLP) 産生系を用いて S1P/SKI-1 阻害剤 (PF-429242) がルジョウイルス表面糖タンパク質 GPC の開裂を阻害すること、S1P/SKI-1 開裂配列の同定、GPC 開裂の VLP への取り込みへの影響、及びマトリックスタンパク質である Z による VLP 産生に必要なアミノ酸ドメイン (L ドメイン) の解析を行った。

A. 研究目的・意義： アレナウイルス科はラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルスを代表として幾種類かの高病原性ウイルスを含む。これら

ヒト高病原性アレナウイルス感染において、ラッサウイルスに対する感染初期のリバビリン静脈内投与、アルゼンチンでのみ認可されているフニンウイルス感染予防のためのフニンウイルス弱毒生ワクチン、が有効であることが示されているが、いずれもFDAの認可はなく、ヒト高病原性アレナウイルスに対する有効なワクチン・抗ウイルス薬の開発は喫緊の課題となっている。更に近年において約3年おきに新種のアレナウイルスが報告されている。このことは近い将来、ヒト高病原性アレナウイルスの出現の可能性を示している。実際、2009年にザンビア・南アフリカ共和国において新型アレナウイルス・ルジョウイルスが同定された。ルジョウイルスはこれまでに感染者は5人と少ないが、そのうち4名が亡くなったため致死率は80%となる。その後ルジョウイルスの発生または新種のヒト高病原性アレナウイルスは報告されていないが、いつ・どこでヒト高病原性新アレナウイルス感染が起きてもお

かしくない。アレナウイルスは一本鎖(-)鎖RNAを二本(Sセグメント・Lセグメント)保有するエンベロープウイルスである(図1)。アレナウイルス科は系統学的・血清学的に旧世界アレナウイルス、新世界アレナウイルスに分類される。新世界アレナウイルス・旧世界アレナウイルスはその細胞内の生活環はもちろん、増殖機構も大きく異なる。一例をあげると旧世界アレナウイルスの多くが α -ジストログリカンを細胞受容体として使用するのに対し、新世界アレナウイルスの多くはトランスフェリン受容体1を細胞受容体として細胞内に侵入する。興味深いことにルジョウイルスは系統学的には旧世界・新世界アレナウイルスのどちらにも分類されない新型アレナウイルスとされている。しかしながら、ルジョウイルスの表面糖タンパク質GPCのアミノ酸配列にはその他のアレナウイルスGPC同様にS1P/SKI-1による開裂配列があり(図4)、S1P/SKI-1がその細胞内増殖機構が未だ不明なルジョウイルスの抗

ウイルス標的となることが予想される。影響を検討した。

そこで本研究において S1P/SKI-1 が抗ルジヨウイルスとなり得るか検討し評価することを目的とした。

B. 研究方法：1) ルジヨウイルス Z 発現プラスミドを作製し、細胞内発現及びウイルス様粒子 (VLP) 産生をウェスタン・ブロット法にて確認した。2) ルジヨウイルス Z の L ドメイン相当配列にアミノ酸変異を導入し (図 2)、VLP 産生能を検討した。3) ルジヨウイルス表面糖タンパク質 GPC 発現プラスミドを構築し、細胞内発現系を確立した。4) ルジヨウイルス GPC の S1P/SKI-1 認識予想配列にアミノ酸変異を導入し (図 5)、GPC の開裂に与える影響を検討した。5) 4) で使用したルジヨウイルス GPC 変異体を使用してルジヨウイルス Z によって産生される VLP 内への GPC もしくは GP2 の取り込みを検討した。6) S1P/SKI-1 低分子阻害剤 PF-429242 を使用し、細胞内においてルジヨウイルス GPC の開裂に与える影

C. 研究結果：1) ルジヨウイルス Z 遺伝子は遺伝子合成し、pCAGGS プラスミドに挿入し、C 末端には HA タグもしくは FLAG タグを付加したプラスミドを作製した。それぞれのプラスミドの 293T 細胞における発現及び VLP 産生能をウェスタン・ブロット法にて確認した (図 3)。2) 野生型においては効率的な VLP 産生が検出されたのに対し、作製した全ての L ドメイン変異体においては VLP 産生が確認されなかった。3) ルジヨウイルス GPC 遺伝子を国立感染症研究所福士博士より分与いただき、PCR にて増幅後 pcDNA3.1 及び pCAGGS プラスミドに挿入した。293T 細胞へのそれぞれのプラスミド導入による発現を確認した (図 6)。GPC の C 末端に FLAG タグを付加することで、全長 GPC 及び開裂後の GP2 が検出できるが、検出に当たって CAYMAN 社の抗 FLAG ポリクローナル抗体が有用であることが明らかとなった。一方で SIGMA 社の M2 抗 FLAG モノクロ

ーナル抗体では検出が確認できなかった。4) 野生型においては S1P/SKI-1 による効率的な開裂から GP2 が優位に検出された。一方で RKLM 配列を AAAA もしくは furin 認識配列である RRRR に変異させた変異体においては開裂による GP2 はほとんど検出されず、未開裂全長 GPC の発現が優位に確認された (図 6)。5) 野生型 GPC の開裂から生じた GP2 の Z による VLP への効率的な取り込みが確認できた。しかし全長 GPC は VLP からは検出されなかった。GPC 変異体においても全長 GPC は VLP から検出されなかった (図 7)。6) PF-429242 10 μ M 及び 30 μ M の添加条件にて効率的に GPC の開裂阻害が確認された (図 8)。

D. 考察: ルジヨウウイルス Z はその他のアレナウイルス Z と同様に細胞内単独発現で VLP を産生することより、マトリックスタンパク質として機能することが明らかとなった。ルジヨウウイルス Z の L ドメイン配列 (YREL 及び

PSAP) がともに VLP 産生に重要であることが示された。このことよりルジヨウウイルスの出芽も他のアレナウイルス同様細胞内小胞輸送経路の一つである多胞体(MVB)経路を利用している可能性が高い。一方、ルジヨウウイルス GPC はその開裂に RKLM 配列が重要であることが示された。Furin 認識配列 (RRRR)変異体においても開裂が観察されない(もしくは著しく開裂効率が悪い)ことから RKLM 配列が GPC の構造全体、特に開裂酵素による認識、に大きく寄与している可能性が示唆された。また GPC の開裂はルジヨウウイルス Z による VLP への取り込みにも重要であることが示された。S1P/SKI-1 阻害低分子化合物 PF-429242 によるルジヨウウイルス GPC 開裂阻害の結果と合わせて考察すると、S1P/SKI-1 阻害はルジヨウウイルス GPC の開裂を阻害し、表面糖タンパク質のウイルス粒子内への取り込みを制限すると考えられる。

E. 結論: ルジヨウウイルス Z によ

る VLP 産生系及び培養細胞への GPC 強制発現系実験において S1P/SKI-1 は Z+GPC によるルジヨウイルス様粒子産生に重要であり、有効な抗ウイルス薬の標的となり得ることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. Shuzo Urata and Jiro Yasuda : The impact of GPC and N-terminal region of Lassa virus Z on virus-like particle release 、 XV international Conference on Negative

Strand Viruses、Granada、Spain、
16-21 June 2013

2. 浦田秀造、安田二郎：ラッサウイルスの粒子形成・出芽解析、第 54 回日本熱帯医学会大会、長崎、2013 年 10 月 4 日-5 日

3. 浦田秀造、安田二郎：アレナウイルスの粒子形成・出芽解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日-12 日

4. 浦田秀造、黒崎陽平、安田二郎：S1P/SKI-1 阻害によるアレナウイルス・ブニヤウイルス複製への影響、第 3 回日本ネガティブウイルス学会、沖縄、2014 年 1 月 13 日-15 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

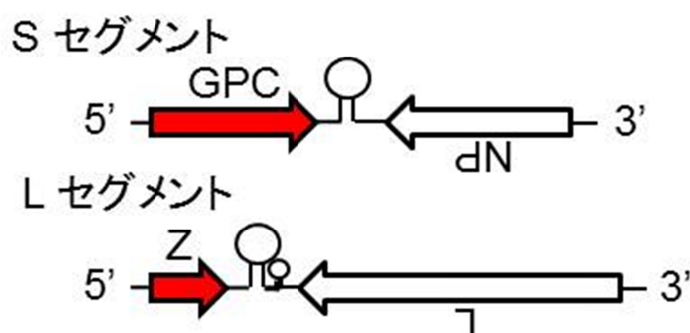


図1 ルジウウイルス (アレナウイルス)ゲノム

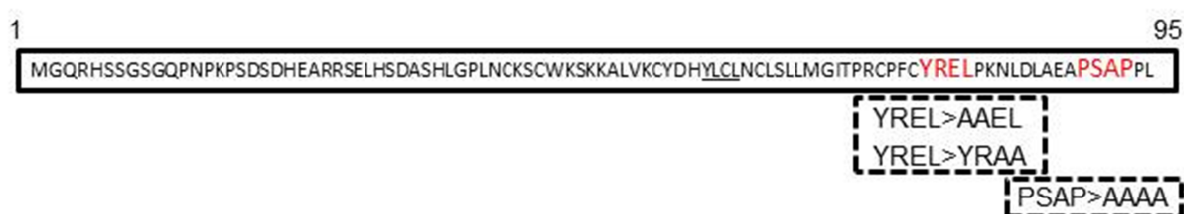


図2 ルジウウイルス Zのアミノ酸配列とLドメイン、及びLドメイン変異体のアミノ酸配列

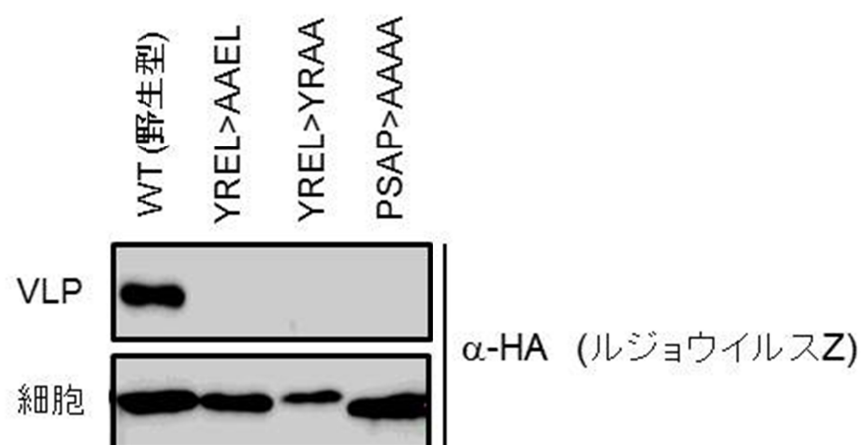


図3 図2に示したルジウウイルス Z 野生型及びLドメイン変異体の細胞内発現・ウイルス様粒子 (VLP)産生の検出

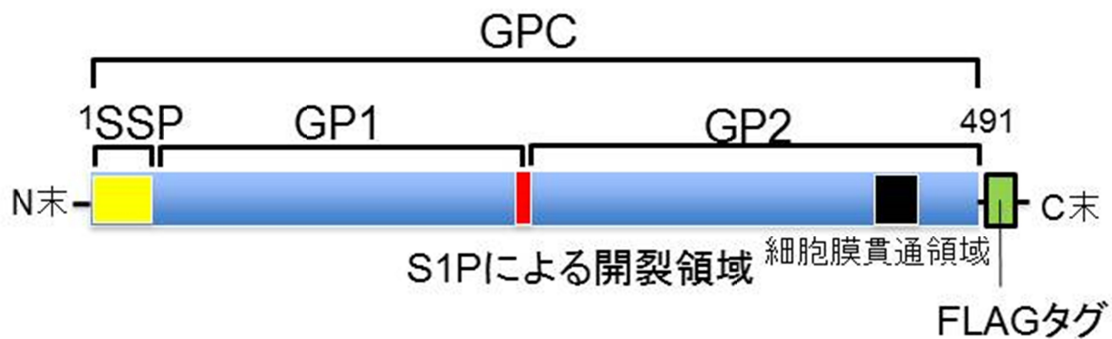


図4 ルジヨウイルス表面糖タンパク質 GPCの模式図

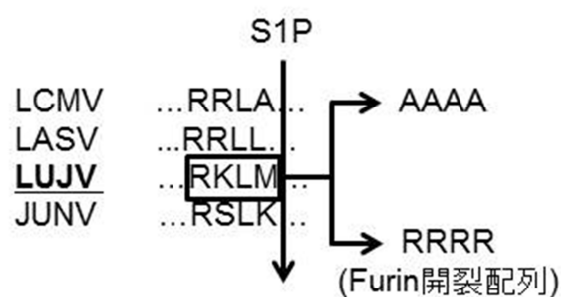


図5 ルジヨウイルス表面糖タンパク質 GPCのS1P/SKI-1開裂予測部位の変異体アミノ酸配列

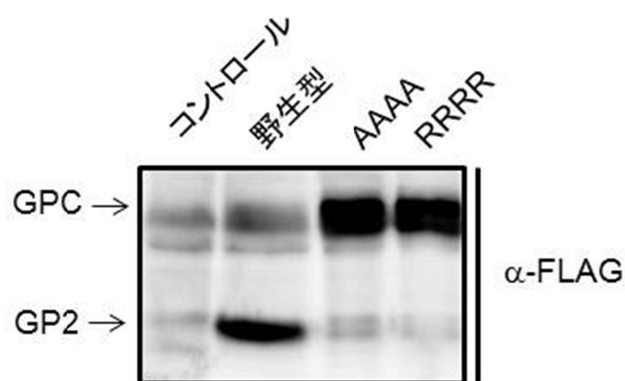


図6 野生型及び図5で示した変異体の293T細胞での発現及び開裂へ与える影響の検討

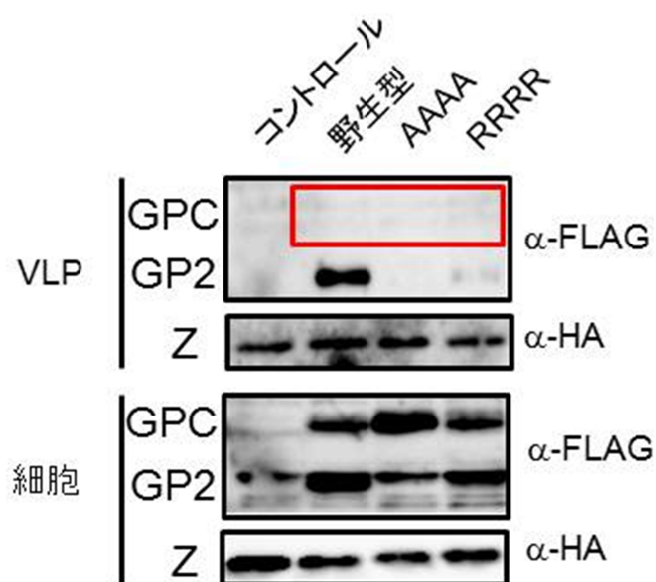


図7 ルジウウイルスGPCの開裂部位変異によるウイルス様粒子への取り込みに与える影響

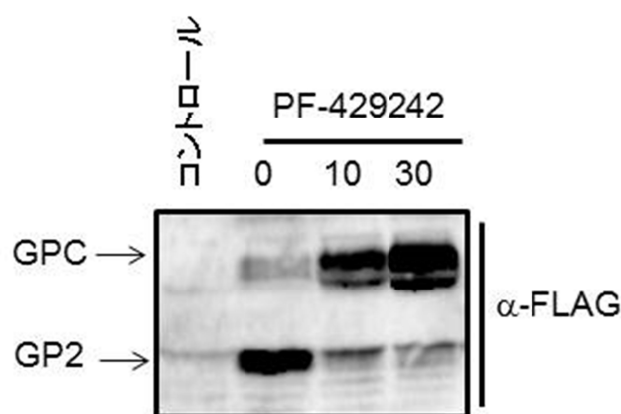


図8 S1P/SKI-1阻害低分子化合物PF-429242のルジウウイルスGPC開裂に与える影響

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

細胞内脂質合成を標的とした抗高病原性ウイルス療法の分子基盤

分担研究課題：細胞内脂質合成を標的とした抗デングウイルス療法
の分子基盤

研究分担者：早坂 大輔 (長崎大学熱帯医学研究所 助教)

研究要旨：本研究は、脂質合成阻害剤である PF-429242 の、デングウイルス (DENV) 感染に対する抑制効果を検証することを目的とし、ヒト由来細胞を用いて、DENV 血清型 2 型 (DENV2) に対する感染抑制効果を調べた。また、DENV Capsid 蛋白 (C 蛋白) と、その細胞内での発現時に重要とされる、宿主の細胞内脂質滴 (Lipid droplets; LD) の関係を、DENV C 蛋白の一過性発現系を作成し調べた。その結果、30 μ M の培養上清中濃度において、PF-429242 が上清中ウイルス量、ならびに細胞内ウイルス RNA 量を有意に抑制することがわかった。さらに、C 蛋白発現系では、共焦点レーザー顕微鏡により、LD 周囲に集積する C 蛋白が観察され、ウイルス抑制のメカニズムとして、LD 減少と C 蛋白との関連が示唆された。以上の結果は、PF-429242 が DENV 感染における抗ウイルス

薬として有用であることを示唆するものであった。今後、他の DENV 血清型に対する抗ウイルス効果を検証すると共に、薬剤存在下において、継続的なウイルス継代を繰り返す中で、薬剤耐性ウイルスの出現を検証する予定である。

研究協力者：内田 玲麻（長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野）

A. 研究目的

デング熱/デング出血熱は、フラビウイルス科、デングウイルス（DENV）の感染により引き起こされる、蚊媒介性の熱性・出血性疾患である。WHO の提唱する「顧みられない熱帯病（NTD）」に挙げられる本ウイルス疾患は、熱帯・亜熱帯地方を中心に年間約 2,000 万人以上が感染し、発展途上国を中心に深刻な社会的・経済的な影響を与えている。患者の多くは、一過性の（古典的）発熱兆候を示すが（Dengue Fever; DF）、一部の感染者では、より重篤なデング出血熱（Dengue hemorrhagic fever; DHF）、デングショック症候群（Dengue shock syndrome;

DSS）を示し、適切な治療が行われな
い場合、致死率は 20%に達する。

DENV はその血清型から、DENV1 から DENV4 まで分けられ、全ての血清型において、上述の DF、DHF、DSS を起こし得る。また以前より、DENV 感染では、初回感染とは異なる血清型に感染した際、2 回目以降において、より重症化する事が知られており、この現象は、抗体依存性感染増強（Antibody dependent enhancement; ADE）として説明されてきた。これは、ある血清型に対する抗体が、他の血清型において、感染増強効果を示すというものであり、ワクチン開発をより一層困難なものとしている。また、未だ

一般的な実験動物モデルが確立されていないことと相まって、全ての血清型に効果を示すワクチン、抗ウイルス薬の開発には至っていない。

脂質滴 (Lipid droplets; LD) は、細胞内における中性脂肪の貯蔵形態であり、肝細胞、ステロイド産生細胞に限らず、ほぼ全ての生体細胞に存在する。DENV や、同ウイルス科に属する Hepatitis C virus (HCV) の構造蛋白である Capsid 蛋白 (C 蛋白) は、宿主細胞において、LD を発現時の足場とし、この利用がウイルスの粒子形成に必須であることが知られている。脂質合成阻害剤として開発された PF-429242 は、細胞内酵素 S1P/SKI-1 を可逆的、かつ競合的に阻害することで、*in vitro*、実験動物モデルにおいて、コレステロール量および脂肪酸合成量を低下させることが知られている。PF-429242 は、これまで、HCV、Lassa virus (LASV)、Lymphocytic Choriomeningitis virus

(LCMV)、および一部の新世界アレナウイルスにおいて、ウイルス感染抑制が報告されており、今後の抗ウイルス薬としての応用が期待される。

本研究では、未だ有効な抗ウイルス薬の存在しない、DENV 感染に対し、脂質合成阻害を標的とした薬剤による、感染抑制の効果を検証する。

B. 研究方法

1) ウイルス感染実験

PF-429242のウイルス抑制効果を検証するため、PF-429242 30 μ Mを含む培養上清中でHeLa細胞(ヒト子宮頸癌由来)にDENV2 strain 16681 (Infectious clone base)をMOI1で感染させた。また、Mockとして、等濃度のDMSOを含む培養上清とDENV2を用いた。感染、24, 48, および72時間後に培養上清、細胞を回収し、ウイルス力価測定用のサンプルとした。

2) ウイルス力価測定

培養上清中のウイルスは C6/36 E2 細胞を用いたフォーカス形成試験により、ウイルス力価を測定した。10 倍階段希釈した培養上清は C6/36 E2 細胞に感染後、4 日目に 4% Paraformaldehyde により固定、1% NP40 による透過処理後、ブロックエースによりブロッキングを行った。感染細胞の染色にはフラビウイルス共通抗 E モノクローナル抗体 (12D11/7E8) および DAB (3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride) を用いた。

感染細胞中のウイルス RNA を定量するため、DENV2 定量用 Real-time PCR を構築した。DENV2 がコードする非構造蛋白 (NS5) 領域に対するプライマーは以下のように設計した。Forward; 5'-aacatgatgggaaaaagagagaagaa gc-3'、Reverse; 5'-cgtgctccaagccacat g-3'。感染細胞より RNeasy Mini kit (QIAGEN) にて全 RNA を抽出した。抽出 RNA は DENV2 特異的 Reverse プラ

イマー、および Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) を用いて cDNA を作製し、Real-time PCR 用テンプレートとした。全てのサンプルは GAPDH 遺伝子発現量に基づき標準化し、ウイルス RNA コピー数を算出した。

3) 細胞毒性試験

PF-429242 の HeLa 細胞に対する毒性を評価するため、種々の濃度の PF-429242 における、細胞内 ATP の定量を行った。0.3, 3, 30, および 300 μ M の PF-429242 を含む培養上清にて HeLa 細胞を培養し、薬剤適用 72 時間後、培地と等量の CellTiter-Glo reagents (PROMEGA) を加え、ルミノメータにより発光量を測定した。

4) 細胞内における LD, DENV2 C 蛋白、および RC の局在

DENV2 のコードする C 蛋白ならびに、Replication complex (RC) と LD との、細胞内局在を調べるため、C 蛋白および、非構造蛋白である NS2B/3 蛋白 (R

C の指標として)の一過性発現系を構築した。発現ベクターには pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) を用い、C 末端に FL AG タグを含む、C 蛋白 (aa. 1-114) および NS2B/3 蛋白 (aa. 1346-2093) 領域をクローニングした(GI|158976983)。発現ベクターを HeLa 細胞にエレクトロポレーションし 40 時間後、抗 FLAG 抗体、および BODIPY 493/503 (Invitrogen) により、発現蛋白、LD をそれぞれ染色し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

C. 研究結果

1) PF-429242はHeLa細胞において、DENV2感染を有意に抑制する

PF-429242は30 μ Mの濃度において、上清中のウイルス量、および細胞内のウイルスRNA量を有意に低下させた(図1)。上清中のウイルス量は、感染72時間後において、Mockに比べ、およそ1/100程度に低下した。また、細胞内

ウイルスRNA量は感染48時間後から有意な低下が見られ、感染96時間後まで有意差が見られた。

細胞毒性試験では、300 μ Mの濃度において、90%近くの細胞が障害を受けたものの、30 μ M以下の濃度では、有意な細胞障害は観察されなかった(図2)。

2) 細胞内において、C蛋白、およびRCはLD周囲に集積する

多くの発現細胞で、C 蛋白は核内、もしくは細胞質内、NS2B/3 蛋白は細胞質内に観察された。また、LD は細胞質内に一様に分布していた。

低倍率において、大部分の C 蛋白と LD とは共局在した。しかしさらに、高倍率では、LD 周囲にリング状に集積する C 蛋白が観察された(図3-A)。一方、NS2B/3 蛋白は低倍率、高倍率ともに、LD との共局在は観察されず、高倍率において LD を囲むような像が観察された。また、C 蛋白に見られるようなリング状構造は観察されなかった(図3-

B)。

D. 考察

PF-429242 による DENV2 感染抑制が確認された。30 μ M PF-429242 の適用により、培養上清中のウイルス量が 1/100 程度に抑えられたが、この効果は完全にウイルス増殖を抑える訳ではなく、フォーカスレベル、ウイルス RNA レベル共に、一定のウイルス増殖を認めた。また、ウイルス RNA レベルでは、PF-429242 適用細胞においても、感染 24 時間後まで、Mock と同様のウイルス RNA 増幅を認めた（データ省略）。これは PF-429242 が、ウイルス感染初期の細胞侵入、ウイルス RNA 複製過程に影響を与えないことを示唆している。

C 蛋白は LD 表面上に集積すると考えられる。共焦点顕微鏡像では、LD 周囲にリング状に集積する C 蛋白が観察されたが、細胞内においては、C 蛋白が球状の LD 表面を覆うように集積し

ていると考えられる。DENV、HCV において、LD は C 蛋白発現時の足場として機能し、その周囲に RC が集積すると考えられる。S1P/SKI-1 阻害剤である PF-429242 は、細胞内 LD を減少させ、コレステロール、脂肪酸等を低下させる働きがあり、C 蛋白発現時の足場が減少した結果、ウイルス増殖が抑制されたと考えられる。

一方、アレナウイルスおよび Crimean–Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) では、S1P/SKI-1 は Glycoprotein (GP) の開裂に必須の細胞内酵素であり、フラビウイルス科においても、ウイルス Polyprotein の開裂に間接的、あるいは直接的に関わる可能性は否定できない。また、DENV 感染において、コレステロールや Lipid rafts が細胞侵入の際、重要であることが知られており、PF-429242 がこれら脂質の細胞内量を低下させた結果、ウイルス感染が抑制された可能性も考え

られる。以上より、LD の減少のみを DENV 感染抑制のメカニズムと結論付けるのは時期尚早であり、その分子機構の解明には、さらなる研究が必要である。

近年、大規模な化合物ライブラリーからハイスループットスクリーニングを用いた抗 DENV 薬の探索が盛んに行われているが、これらの未知の化合物を臨床試験まで到達させるには、多くの時間とコストを要する。本研究では、すでに実験動物モデルに応用されている脂質合成阻害剤を対象とするため、今後、同様の手法を用いれば、より低コストでの抗 DENV 薬の開発が可能になると期待される。

E. 結論

本研究により、脂質合成阻害剤である PF-429242 が、DENV 感染抑制に対し有効であることが示唆された。今後は、他の血清型に対する抑制効果、な

らびに、PF-429242 存在下で継続的にウイル継代を行った際の、薬剤耐性ウイルスの出現について、さらに研究を進める。また、DENV の感染抑制機構について、より詳細な分子メカニズムを明らかにすることで、より効果的な薬剤投与方法の開発に繋がると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takamatsu Y., Okamoto K., Dinh DT., Yu F., Hayasaka D., Uchida L., Nabeshima T., Buerano C.C., Morita K.: NS1' protein expression facilitates production of Japanese encephalitis virus in avian cells and embryonated chicken eggs. J. Gen. Virol.

95(2):373-383. 2014.

2) Luat L.X., Ngwe Tun M.M., Buerano C.C., Aoki K., Morita K., Hayasaka D.: Pathologic potential of variant clones of the Oshima strain of Far Eastern subtype tick-borne encephalitis virus.

Trop. Med. Health. In press.

3) Hayasaka D., Shirai K., Aoki K., Nagata N., Simantini D.S., Kitaura K., Takamatsu Y., Gould E., Suzuki R., Morita K.: TNF- α Acts as an Immunoregulator in the Mouse Brain by Reducing the Incidence of Severe Disease Following Japanese Encephalitis Virus Infection. PLOS ONE. 8(8):1-18, 2013.

2.学会発表

1) 早坂大輔、淵上剛志、森田公一：フラビウイロスの分子イメージング：第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会、湯河原 (2013, 5)

2) 青木康太郎、早坂大輔、Mya Myat Ngwe Tun、嶋田聡、森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析：第50回ウイルス学会九州支部総会、長崎 (2013, 9)

3) 早坂大輔、淵上剛志、森田公一：フラビウイロスの分子イメージング：第156回日本獣医学会学術集会、岐阜 (2013, 9)

4) 早坂大輔、青木康太郎、Mya Myat Ngwe Tun、嶋田聡、森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析：第54回日本熱帯医学会大会、長崎 (2013, 10)

5) 高松由基、森田公一、早坂大輔：マウスモデルにおける日本脳炎ウイルスの高病原性に関わる遺伝子を特定する：第20回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会、神戸 (2013, 11)

- 6) Mya Myat Ngwe Tun, Kyaw Zin Thant, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Kotaro Aoki, Aung Kyaw Kyaw, Tin Myint, Thi Tar, Kay Thwe Thwe Maung, Daisuke Hayasaka, Kouichi Morita : Emergence of Chikungunya virus African genotype in Myanmar : 第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸 (2013, 11)
- 7) 早坂大輔、青木康太郎、Mya Myat Ngwe、嶋田聡、森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析：**第 61 回日本ウイルス学会学術集会**、神戸 (2013, 11)
- 8) 高松由基、岡本健太、Dihn Tuan Duc、余福勲、早坂大輔、内田玲麻、鍋島武、Corazon C Buerano、森田公一：日本脳炎ウイルスの NS1'タンパク質は、鳥細胞でのウイルス産生を増加させる：**第 61 回日本ウイルス学会学術集会**、神戸 (2013, 11)
- 9) 白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：日本脳炎感染マウスの予後に関連する脳内浸潤 T 細胞の質的な違い：**第 61 回日本ウイルス学会学術集会**、神戸 (2013, 11)
- 10) Mya Myat Ngwe Tun, Daisuke Hayasaka, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, and Kouichi Morita : TNF- α and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice following tick-borne encephalitis virus infection : **第 61 回日本ウイルス学会学術集会**、神戸 (2013, 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

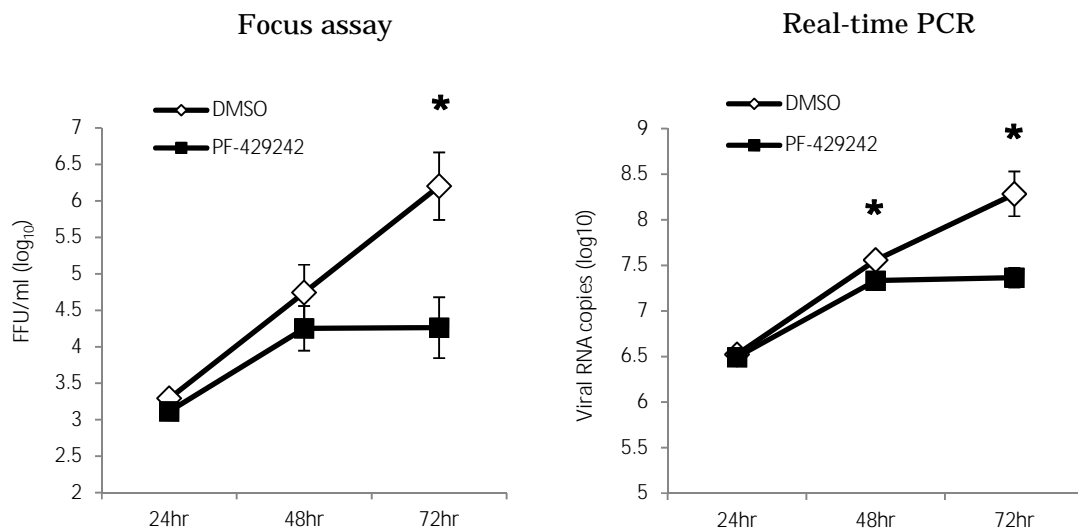


図 1: 30 μ M PF-429242 を含む培養上清において、DENV2 を MOI1 で HeLa 細胞に感染させた。感染、24, 48, および 72 時間後に培養上清、感染細胞を回収し、それぞれ、Focus assay、Real-time PCR によりウイルス力価を測定した。ウイルス RNA のコピー数は、プラスミドスタンダードに基づく絶対定量により算出し、GAPDH 遺伝子発現量を用いて標準化した。Mock には PF-429242 と等濃度の DMSO を用い、それぞれの実験は 3 回の独立した Duplicate により行った。図中のエラーバーは標準誤差を表す。各時間において、T 検定による有意差検定を実施した ($P < 0.01$)。

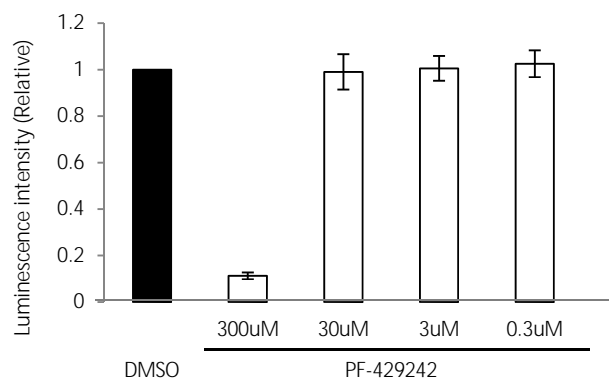


図 2: 300, 30, 3, および 0.3 μ M の PF-429242 を含む培養上清において、HeLa 細胞を 72 時間培養し、細胞内 ATP を CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (PROMEGA) により測定した。Mock には PF-429242 と等濃度の DMSO を用い、それぞれの ATP 量は Mock に対する相対値として算出した。3 回の独立した実験を Duplicate で実施した。図中のエラーバーは標準誤差を表す。

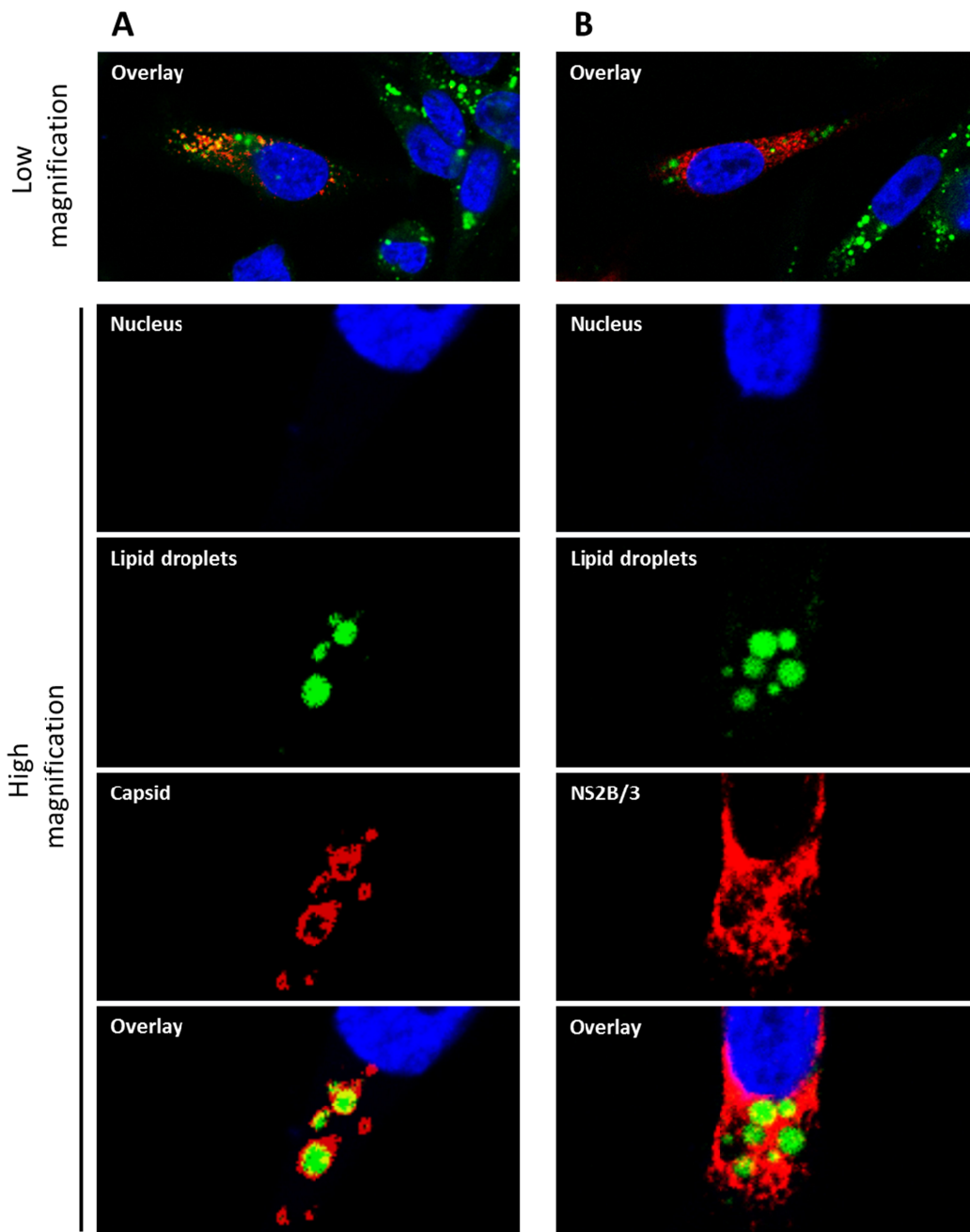


図 3: DENV2 のコードする C 蛋白、NS2B3 蛋白発現プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、40 時間後、抗 FLAG 抗体、および BODIPY 493/503 (Invitrogen) により、発現蛋白 (赤) または LD (緑) を染色した。DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) を含む封入剤にて核 (青) を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM780, Zeiss) による観察を行った。対物レンズには x63 (Low magnification) および x100 (High magnification) を使用し、8 回の Averaging により画像を取得した。

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

細胞内脂質合成を標的とした抗高病原性ウイルス療法の分子基盤

分担研究課題：細胞内脂質合成を標的とした

抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス療法の分子基盤

研究分担者：黒崎 陽平 (長崎大学熱帯医学研究所 助教)

研究要旨：本研究は未だ有効な抗ウイルス療法が確立されておらず、そのヒトへの病原性の高さから人類への脅威となっているクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対して S1P/SKI-1 が有効な標的となり得るか検討・評価するものである。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス表面糖タンパク質 G の開裂に S1P/SKI-1 が必須であることが示されているが、G の開裂機構を含め未だ解明されていない点が多い。本年度は BSL-4 でのみ使用が可能である感染性クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの BSL-2 で解析可能なモデルウイルスであるハザラウイルスを使用してクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対して S1P/SKI-1 が有効な抗ウイルス標的となり得ることを示した。また、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗 Gn 抗体・数種類の G 発現プラスミドを作製し、S1P/SKI-1 による G 開裂を検討でき

る実験系を構築した。

研究協力者： 浦田 秀造 (長崎大学熱帯医学研究所)

A. 研究目的・意義： クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) はブニヤウイルス科ナイロウイルス属に属する三分節マイナス鎖 RNA ウイルスである。CCHFV はダニ媒介性のウイルスで、感染域はアフリカ・ヨーロッパ・アジアと広く、更に致死率は10%前後と考えられており高い。現在有効なワクチン・治療法はない。CCHFV の細胞内での生活環は不明な点が多く残るが、感染性粒子産生のために 2 つのエンベロープタンパク質 Gn/Gc の前駆タンパク質 G の開裂が必要であることが示されている (図 1)。CCHFV の G は 1684 アミノ酸と大きく細胞膜貫通領域を 6 か所保有する (図 1 及び図 4)。G の細胞内における開裂についても不明な点が多くあるが、Pre-Gn の開裂は細胞内酵素 S1P/SKI-1 によることが報告されてお

り (RRL 配列)、本研究において Pre-Gn の開裂を担う S1P/SKI-1 が CCHFV の有効な抗ウイルス薬となり得るか評価することを目的としている。感染性 CCHFV はバイオセーフティーレベル (BSL)-4 においてのみ使用可能であるため、本年度は、CCHFV G 発現プラスミドの作製及び CCHFV のモデルとしてハザラウイルス (HAZV) を使用して研究を進めた。

B. 研究方法：

1. プラスミド及び抗体作製
CCHFV の M 分節 cDNA は Dr. Roger Hewson (Public Health England, UK) より分与していただいた。この DNA を鋳型として PCR 反応にて CCHFV 全長 G 遺伝子を増幅し C 末端に V5/His タグを付加した哺乳類細胞発現プラスミドを構築した (図 2)。G 発

現プラスミド作製にあたり、細胞内タンパク質発現を確認できるブニヤウイルス科 G 発現プラスミドの作製が困難であること、また、発現においてプラスミドのプロモーターの影響が大きいとの情報をもとに、CMV プロモーターによる発現プラスミドと CAG プロモーターによる発現プラスミドを作製した (図 2)。また、CCHFV の Gn または Gc を認識するポリクローナル抗体の作製を外注し (オペロン社)、その評価を行った (図 6)。更に Gn の C 末端に V5/His タグを付加したプラスミド (G803) を作製し、S1P/SKI-1 による Gn (Pre-Gn から GP38 と Gn) の開裂を評価できる系を構築した (図 4 及び図 6)。CCHFV G 同様 HAZV G 発現プラスミドの構築も試みた (図 5 及び図 6)。

2. S1P/SKI-1 阻害剤 PF-429242 による HAZV 増殖への影響

Vero 細胞に HAZV を moi=0.01 で感染させ、DMSO をコントロールとし、PF-429242 を最終濃度 10 μ M もしく

は 30 μ M となるように培地を交換した。HAZV 感染後 24 時間、48 時間後の培養上清中のウイルス力価を SW13 細胞によるプラークアッセイ法にて比較検討した (図 7)。

C. 研究結果：

1. 293T 細胞にて CMV プロモーターによる CCHFV G 発現及び CAG プロモーターによる CCHFV G 発現をウエスタン・ブロット法にて抗 V5 タグ抗体を使用して検出したところ、CAG プロモーターによる Gc の発現が確認された。一方 CMV プロモーターによる CCHFV G の発現は確認できなかった。CAG プロモーターを保有するプラスミドを使用し、外注した抗 CCHFV Gn もしくは Gc 抗体の検出を試みた結果、Gc の検出は確認されなかった (結果示さず)。一方、Gn 抗体による G, preGn, Gn は確認された (図 6)。同様に HAZV G, G803 の細胞内発現、検出も確認できた。

2. HAZV の Vero 細胞でのウイルス増殖が確認できた。コントロールの DMSO 処理と比較し、10 μ M もしくは 30 μ M の PF-429242 処理は約 3 log (約 1000 倍)のウイルス増殖抑制効果を示した。

D. 考察：BSL-4 にて取り扱う必要がある感染性 CCHFV の研究において、本研究にて作製した一連の CCHFV G 発現プラスミドは BSL-2 にて研究を進めるに当たって非常に有用である。また、CCHFV のモデルウイルスとして使用される HAZV も BSL-2 で使用可能であることから感染性ウイルスの解析において有用である。

pCXN2-CCHFVG-V5/His は抗 Gn 抗体により、Gn を含む断片 (G、preGn、Gn)の発現が確認され、S1P/SKI-1 開裂の有無を判断することが可能である。更に、G803 は Gn に焦点を絞り G803 のみならず開裂後の GP38+Gn, そして Gn の発現を V5 抗

体で確認することができる点で有用である。

一方、CCHFV のモデルウイルス HAZV を使用しての S1P/SKI-1 阻害のウイルス増殖に与える影響として、10 μ M の PF-429242 が顕著なウイルス増殖抑制を示すことより S1P/SKI-1 は CCHFV 増殖の有効な標的であることが間接的に示された。

E. 結論

1. S1P/SKI-1 阻害による CCHFV G 開裂を評価するための発現プラスミド及び抗体を作製した。
2. S1P/SKI-1 阻害低分子化合物 PF-429242 は HAZV 増殖を顕著に抑制した。

J. 健康危険情報

特になし

K. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 浦田秀造、黒崎陽平、安田二郎：S1P/SKI-1 阻害によるアレナウイルス・ブニヤウイルス複製への影響、第3回日本ネガティブウイルス学会、沖縄、2014年1月13日-15日

L. 知的財産権の出願・登録状況

なし

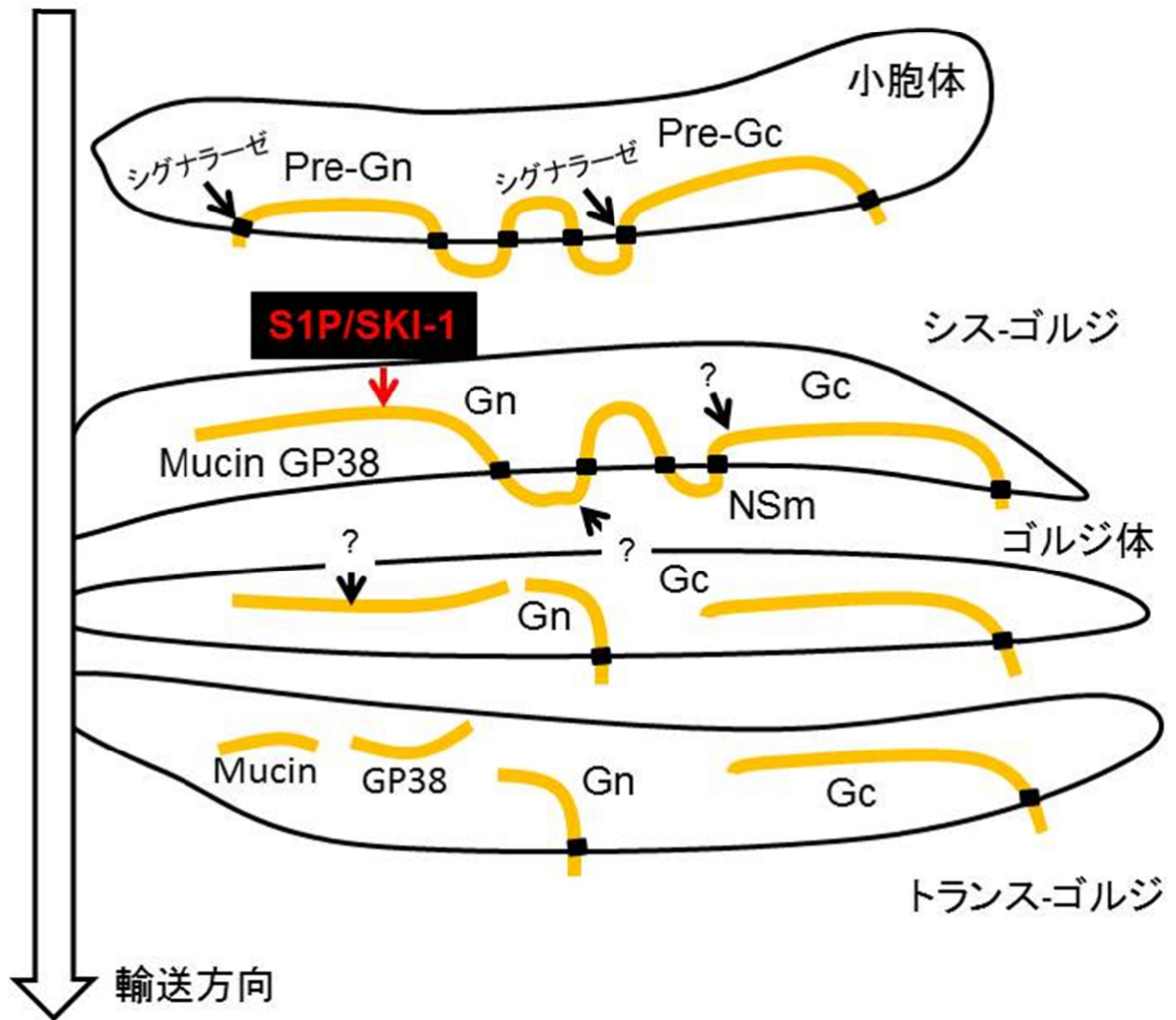


図1 クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) 表面糖タンパク質Gの細胞内輸送図

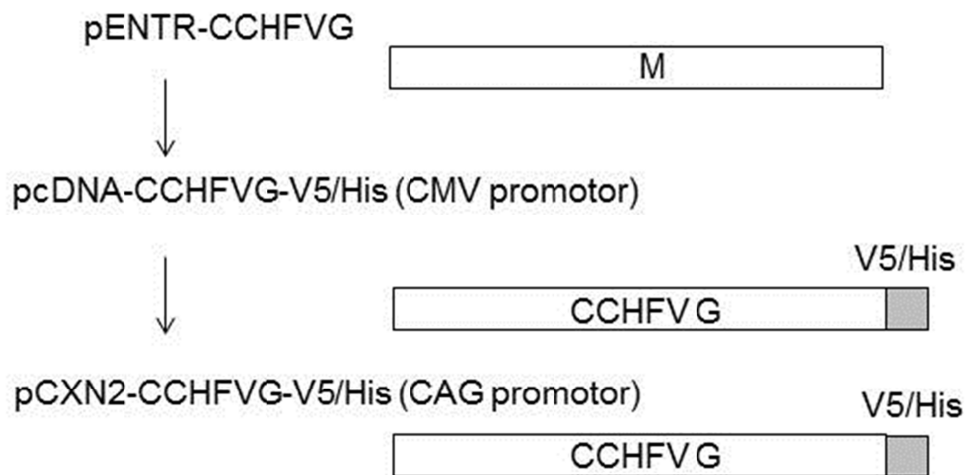


図2 クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) 表面糖タンパク質Gの哺乳類細胞発現プラスミド作製の手順



図3 CCHFV Gの293T細胞導入による発現確認

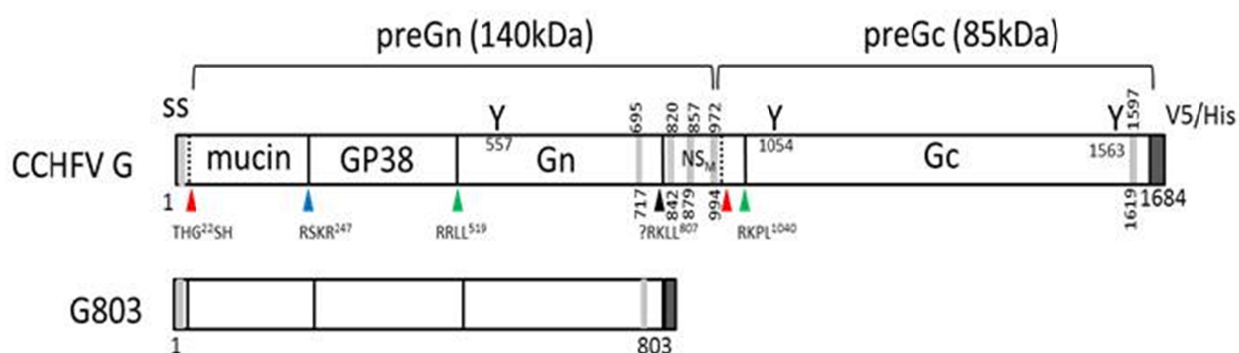


図4 CCHFV Gの模式図及び本研究にて作製した欠損体模式図

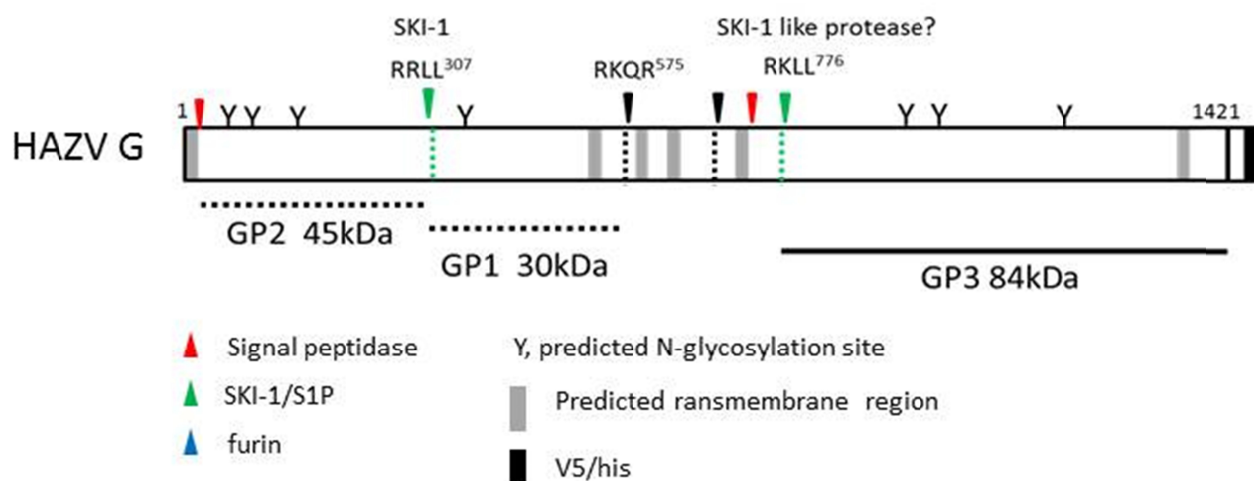


図5 ハザラウイルス (HAZV) Gの模式図

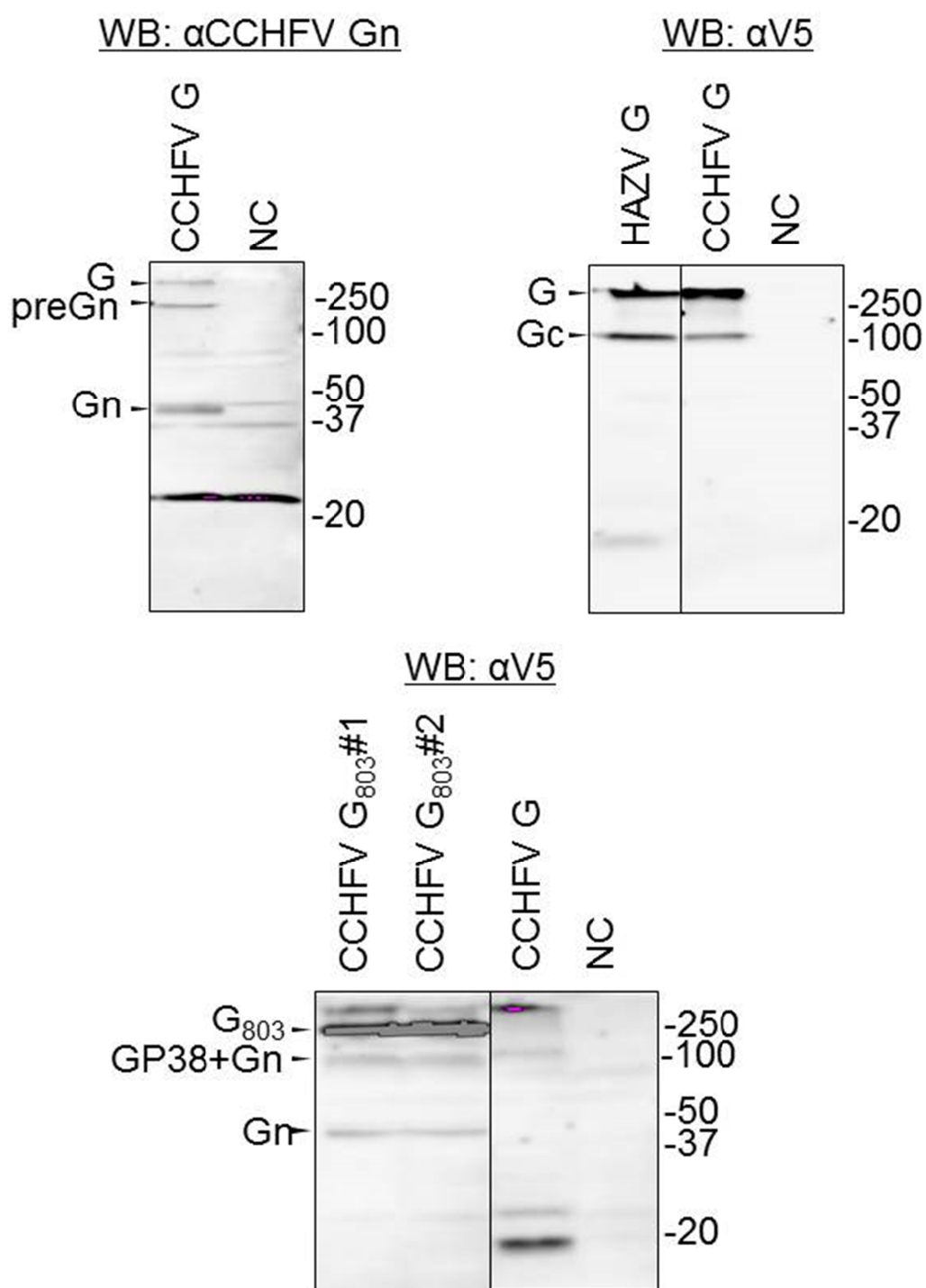


図6 図4にて示したCCHFVG全長及び欠損体の293T細胞における発現および検出の確認 (NC: ネガティブコントロール)

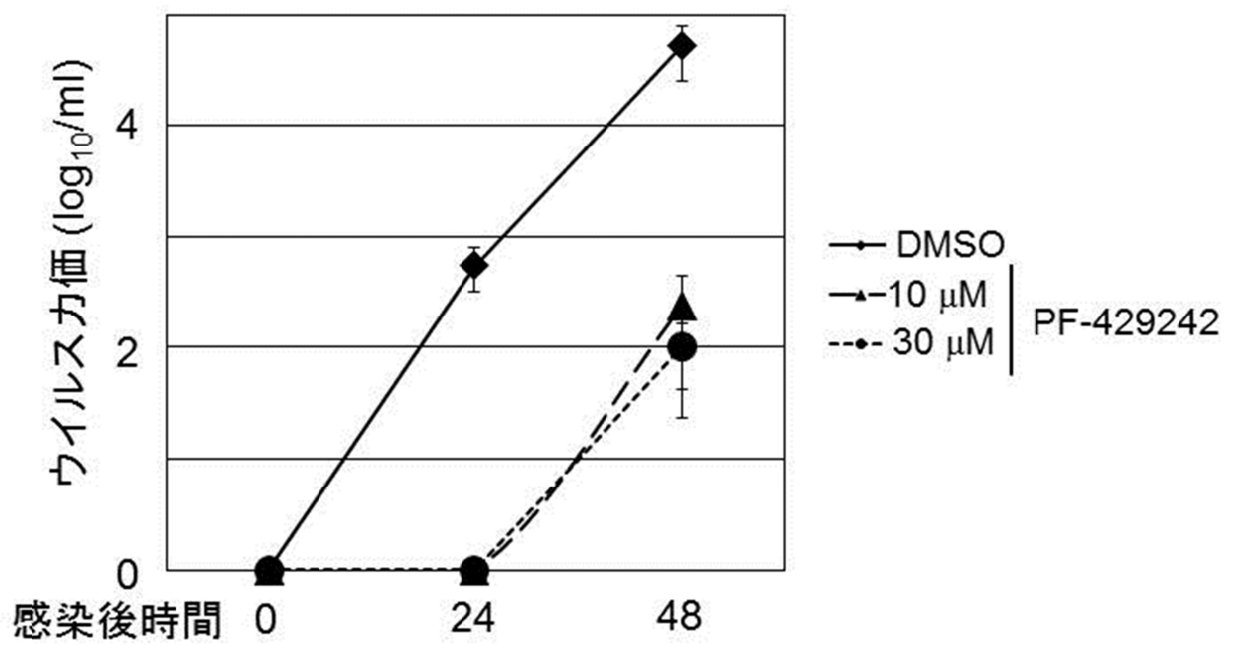


図7 Vero細胞におけるHAZV増殖に対する
S1P/SKI-1阻害低分子化合物PF-429242の影響