

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)]

分担研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究(H25-新興-指定-009)

SFTS ウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

研究分担者	有川 二郎	北海道大学医学研究科
研究協力者	谷 英樹	国立感染症研究所ウイルス第1部
	福士 秀悦	国立感染症研究所ウイルス第1部
	下島 昌幸	国立感染症研究所ウイルス第1部
	安田 二郎	長崎大学熱帯医学研究所
	西園 晃	大分大学医学部
	山田 健太郎	大分大学医学部
	吉松 組子	北海道大学医学研究科

研究要旨

本研究では SFTS ウイルス(SFTSV)の感染機構・増殖機構・病原性の解明を目的として以下の研究を実施した。リバビリン、インターフェロン- γ 、S1P/SKI-1 阻害剤の抗 SFTSV 効果を複数のヒト由来培養細胞を用いて解析した。その結果、3 剤とも SFTSV の増殖を抑制することがわかった。更に、S1P/SKI-1 活性欠損細胞株を用いて、SFTSV 増殖における S1P/SKI-1 の関与を示した。一方、マウス個体レベルではリバビリン投与はSFTSVの増殖に影響を与えなかった。SFTSV感染マクロファージ細胞系細胞株を用いて、感染による貪食能の亢進および抗体依存性感染増強(ADE)の解析を行った。貪食能亢進は認められなかったものの ADE は確認され、SFTS の病態形成に関与している可能性が考えられた。SFTSVのエンベロープ糖蛋白(GP)は中和のターゲットとなる重要なウイルス蛋白であり、吸着・侵入に関わる多くの機能を持つ。本研究ではGPによって誘導される細胞侵入に関わる現象として、感染細胞の pH 依存性細胞融合の解析を進めた。細胞融合は 25-hydroxycholesterol (25-HC)によって阻害され、ウイルスと細胞膜との融合に作用して阻害効果を示しているものと考えられた。また、この細胞融合能を指標とした簡易ウイルス定量法の確立を試みた。さらに SFTS ウイルスの感染機構、膜融合、中和の解析を目的として、GP を外套したシュードタイプウイルスを用いた解析および GP に対するマウスモノクローナル抗体を作製することを試みた。

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)に対する有効なワクチン・治療薬はなく、現時点で治療法は確立されていない。そこで、現在既に他のウイルス感染症に対して臨床で使用されているリバビリン、インターフェロン- α 、更に研究協力者らが注目している細胞内酵素S1P/SKI-1のSFTSウイルス(SFTSV)複製に与える影響を検討し、抗SFTSV薬としての有用性を細胞レベルおよび個体レベルで検討した。

SFTSの病態について、骨髄におけるマクロファージによる赤血球貪食像(赤血球貪食症候群)、血液凝固系の異常(播種性血管内凝固症候群)、重症化した場合の高い致死性(致死率10~30%)に着目し、in vitroでその機序解明を試みた。血液凝固系異常については、エボラ出血熱ではウイルスに感染したマクロファージが血液凝固系活性化の引き金となるTissue Factor(TF)を過剰に発現することが報告されており、デング出血熱やエボラ出血熱における高い致死性については抗体依存性感染増強(Antibody dependent enhancement, ADE)の関与が考えられている。そこでマウス腹腔マクロファージ由来細胞株Raw264.7細胞を用いて、SFTSV感染Raw264.7細胞の貪食能、TFの発現、および抗GP血清によるADEについて検討を行った。

SFTSVの感染機構および膜融合の解析を目的として、SFTSV各株およびSFTSVのGPを外殻したシュドタイプウイルス(SFTSVpv)、ウイルス感染細胞を用いて、各種解析を行った。また、膜融合による細胞融合を指標とする簡便なウイルス定量法の確立を試みた。さらにGPの機能解析を目的として、GPに対する単クローン

抗体の作成を試みた

B. 研究方法

1) 薬剤の細胞レベルでの抗ウイルス効果

96穴プレートにSW13細胞(ヒト副腎皮質腺癌由来)、293T細胞(ヒト胎児腎由来)、Huh-7細胞(ヒト肝癌由来)を播種し、SFTSV(YG1株)moi=0.1で感染させた。感染2時間後にDMSO(コントロール)、リバビリン(100 μ M)、インターフェロン- α (1 $\times 10^3$ unit/ml)、S1P阻害剤(30 μ M)、またはそれぞれの組み合わせを含む培地に置き換え、更に48時間培養した。S1P阻害剤処理においては最終濃度50 μ Mとなるようコレステロールを添加したもの及びしないものを用意した。また、S1P/SKI-1活性欠損細胞株(SRD12B)においては親株CHO-K1細胞株とそれぞれにmoi=0.1で感染させた。これらの培養上清を96穴プレートに播種しておいたVeroE6細胞に感染させ、感染2時間後に培地を新たな培地と交換した。更に14時間培養を続け、4%パラホルムアルデヒドにて細胞を固定した。固定細胞を抗SFTSV N抗体を用いて標識した。2次抗体にFITC標識抗体を用い、蛍光顕微鏡にてN発現細胞数を測定し、SFTSV力価とした。

2) リバビリンの細胞レベルでの抗ウイルス効果

C3Hマウスに、 5×10^5 FFU量のSFTSVを皮内接種し、感染1時間後から毎日、100mg/kgのリバビリンを腹腔内投与し、血小板および白血球数の変化と、脾臓におけるウイルス増殖を、PBSを投与したコントロール群と比較した。

3) SFTSV 感染 Raw264.7 細胞の貪食能の検討

SFTSV-YG1 株を、培養液(10%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培地)に浮遊させた Raw264.7 細胞と混合し、96 穴プレート中で一晩培養した。続いて、FITC 標識ウサギ IgG 抗体結合ラテックスビーズ (Phagocytosis Assay kit, IgG FITC; Cayman Chemical 社)を培養液中に滴下し、さらに一定時間(1~6 時間)の培養を行った。細胞に取り込まれなかった FITC 標識ビーズについてはトリパンブルー処理により quenching を行い、その後、4%パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定し、0.2% Triton X-100 による透過処理後、抗 NP マウス血清および AlexaFluor568 標識抗マウス IgG 抗体(Life Technologies 社)による間接蛍光抗体法により、ウイルス感染の確認を行った。

4) SFTSV 感染 Raw264.7 細胞における凝固因子 TF 発現の検討

24 穴プレートで培養した Raw264.7 細胞に YG1 株を接種した。2 日間培養後に細胞を回収し、ウェスタンブロット解析に供試した。TF の検出にはウサギポリクローナル抗体 (bs-4690R, Bios 社)を使用した。

5) 抗 GP マウス血清による SFTSV の Raw264.7 細胞における ADE の検討

DNA 免疫法により作製した GP(Gn, Gc もしくは Gn/Gc)に対するマウス抗血清(H25 年度本報告書)を用いた。また、陰性コントロールとして同様に DNA 免疫法により作製した抗 NP マウス血清を使用した。いずれの抗 GP 血清は Vero 細胞を用いた中和試験

(50% focus reduction)で 1:160~≥1:320 の抗体価を示し、抗 NP 血清の中和抗体価は 1:10 であった。ADE の検証は次のように行った。培養液で希釈した YG1 株と培養液で段階希釈した各抗血清を等量で混合し、37 で 1 時間の中和反応を行った。その後、混合液を 96 穴プレートに培養した Raw264.7 細胞に添加し、3 日間培養した。培養後、細胞をパラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定し、0.2% Triton X-100 による透過処理後、抗マウス IgG ヤギ血清 (Mouse-to-Mouse, ScyTek 社)によるブロッキング処理を行った。その後、抗 NP マウス血清および AlexaFluor488 標識抗マウス IgG 抗体(Life Technologies 社)による間接蛍光抗体法により、感染細胞の検出を行った。一方で、ウェスタンブロット解析用にも細胞ライセートを作製し、NP 蛋白質、 β -actin およびマウス IgG 抗体の検出も行った。

6) SFTSV(中国株および日本株)を感染させた細胞での GP の細胞内局在

SFTSV(中国株および日本株)を感染させた細胞での GP の細胞内局在を、複数の抗 GP 抗体を用いて間接蛍光抗体法にて確認した。局在の確認後、感染細胞を低 pH バッファーを用いて細胞融合による巨細胞(シンシウム)形成の有無を確認した。また、シンシウム形成までの時間およびウイルス株間での違いについても検証した。次に、この細胞融合を阻害する候補分子として近年複数のウイルス種において報告されている 25-hydroxycholesterol (25-HC) の抗 SFTSV 活性について評価した。

- 7) 96 穴プレートで培養した Vero 細胞に 10 倍階段希釈した SFTSV を感染させ、上記と同様に細胞融合を起こさせた後、メタノールで固定し、その後メイギムザ染色液を加えた。水洗することによってはがれた細胞は洗い流された。残った細胞は細胞融合の有無を判定し、さらに抗 NP ウサギ血清を用いた蛍光抗体法によって抗原の有無を確認した。これらの解析はすべて 6 穴ずつ実施した。解析結果をもとに細胞融合の有無およびウイルス抗原の有無を指標とした 50%感染価を算出した。
- 8) SFTSV YG1 株の GP のアミノ酸情報をもとに 6 つの部位を選び、大腸菌ベクターで発現させて抗原とした。6 つの部位をコードする cDNA を PCR で増幅し、pET43.1 ベクターに組み込んだ。このプラスミドを大腸菌株 BL-21 に導入し、組換えタンパクの産生を誘導した後、大腸菌を破砕した。得られた分画から 6 ヒスチジンタグを用いて組換えタンパクを精製した。これらの抗原を titer max アジュバントと混合しマウスに免疫した。また、対照としてマウスに SFTS ウイルスを感染させ、抗血清と免疫細胞を得て常法にしたがって単クローン抗体の作成を試みた。
- 1) SW13 細胞, 293T 細胞, Huh-7 細胞のいずれにおいても効率良い SFTSV 増殖が観察された。Huh-7 細胞からのウイルス産生量は 293T 細胞の約 20 倍, SW13 細胞からのウイルス産生量は 293T 細胞の約 5 倍であった。
- 2) 単独投与においては全ての細胞でリバビリン, インターフェロン- α とともに強い抗ウイルス効果を示した (感染性ウイルス産生を ~5% まで減少)。S1P 阻害剤も全ての細胞において感染性ウイルス産生を 15-30% 程度に減少させた。全ての細胞において、どの 2 剤併用もウイルス産生を劇的に減少させた (感染性ウイルス量 1% 以下)。S1P 阻害剤処理 SFTSV 感染細胞においてコレステロール添加の有無はウイルス増殖に影響しなかった。
- 3) SRD12B 細胞からの感染性 SFTSV の産生量は CHO-K1 細胞に比べ 10% 以下であった。マウス個体レベルでは、コントロール群とリバビリン投与群で血小板および白血球減少に差は認められず、また、ウイルス増殖にも差は認められなかった。
- 4) SFTSV の Raw264.7 細胞への感染性。図 2 に示すように SFTSV-YG1 株は、Raw264.7 細胞に感染性を示し、その感染効率は、高感受性である Huh-7 細胞や Vero 細胞と比べて約 1/10 であった。また、感染 3 日目においても感染細胞の拡がり確認されなかった。
- 5) SFTSV 感染 Raw264.7 細胞の貪食能。YG1 株感染・非感染 Raw264.7 細胞においてビーズの効率的な蛍光標識ビーズの取り込みが認められたが、両者の間で顕著な差は認められなかった。
- 6) SFTSV 感染 Raw264.7 細胞における凝固因

(倫理面からの配慮について)

マウス抗血清作製は大分大学動物実験委員会の承認 (承認番号 P01001) および北海道大学動物実験委員会の承認 (承認番号 14-0123) を得て行われた。

C. 研究成果

子 TF の発現: ウェスタンブロット解析により YG1 株感染・非感染 Raw264.7 細胞において共に TF の発現は確認されたが, 感染による発現の亢進は認められなかった。

- 7) 抗 GP マウス血清による SFTSV の Raw264.7 細胞における ADE 現象: 抗 NP 血清では認められなかったが, いずれの抗 GP 血清において ADE 現象が認められた(図 3)。すなわち, 図 3A においてはマウス血清非添加や抗 NP 血清の場合に比べて, 抗 GP 血清の場合では感染細胞数の増加が確認され, 図 3B においては, ウイルス NP 蛋白質のシグナル増加が確認された。抗 Gn 血清については, 低希釈ではウイルス感染抑制が認められ, 高希釈では感染増強が認められたが, 抗 Gc 血清および抗 Gn/Gc 血清については低希釈でも感染増強が認められた。
- 8) SFTSV の GP は, 感染 Vero 細胞の表面にはほとんど存在せず, 小胞体もしくはゴルジ装置内, およびその周辺に局在しているものと考えられた(図 4)。この感染細胞を低 pH バッファーに 2 分間曝露させた後, 培養を続けると pH6.0 のバッファーで処理した細胞ではシンシチウムの形成が認められ, pH5.0 のバッファーで処理した場合, ほぼ全ての細胞が融合した(図 5)。このシンシチウムの形成は, pH5.0 のバッファーで処理した場合は, 処理後 1 時間で既に細胞融合が認められ, 非常に早く融合を起こすことが明らかとなった。また, 中国株および複数の日本株で株間の違いも検討したが, 株間による程度の差は認められなかった。次に, 25-HC の存在下での SFTSV の増殖を検討したところ, 濃度依存

的に SFTSV の増殖が阻害されることが認められた(図 6)。また, 25-HC 処理細胞においては, シュードタイプウイルスの感染も阻害された(図 7)。更に, 感染細胞を 25-HC で処理すると, その後, 低 pH のバッファーで処理してもシンシチウムの形成が認められなかった(図 8)。

- 9) 低 pH 依存性細胞融合として認められる CPE に基づいたウイルス定量法は, 非常に簡便で多検体の中和試験等に有効であると考えられた。しかしながらウイルス抗原を指標とした場合の感染価に比べ約 100 倍低く算出された(図 9)。
- 10) GP の短縮抗原六種類を大腸菌ベクターにより発現させ, 一部をマウスに免疫した(図 10)。さらに YG1 株をマウスに免疫した。その結果, SFTSV 感染 VeroE6 細胞を抗原とする蛍光抗体法において抗体の産生が確認された

D. 考察

リバビリン, インターフェロン- α , S1P 阻害剤の何れも, 細胞種によって抗 SFTSV 効果に差が見られたが, 2 剤もしくは 3 剤併用すると, 相対的效果が観察された(図 1)。それぞれの抗ウイルス効果が異なること, また, リバビリン, インターフェロン- α は既に C 型肝炎治療などで臨床現場で使用されていることから SFTS 感染患者へのこの 2 剤併用療法が有効であることが示唆された。S1P は脂質・コレステロール合成を制御する細胞性因子として知られているが, 本研究において S1P 阻害剤が SFTSV 増殖を抑制するものの S1P 阻害 + コレステロール添加が SFTSV

増殖を回復しなかったことから、SFTSV は S1P によって直接制御されている、もしくは S1P によって制御されるコレステロール・脂質以外の細胞性因子によって制御されているという 2 つの可能性が考えられる。S1P/SKI-1 活性欠損細胞においても SFTSV は増殖することから、S1P/SKI-1 による SFTSV 増殖への関与は間接的であることが示唆された。

マウス個体レベルにおいては、コントロール群とリバビリン投与群では、同程度の血小板および白血球減少が認められ、また、ウイルス増殖にも差は認められなかったことから、個体レベルにおいては、今回用いた系ではリバビリンの抗ウイルス効果は認められなかった。今後、SFTSV のチャレンジ量やリバビリン投与量を検討する予定である。

今回、SFTSV 感染 Raw264.7 細胞において、貪食能の亢進および TF 発現の亢進を認めなかったが、これらについて結論を得るには実際のマクロファージを用いて検討する必要があると考えられた。

一方、Vero 細胞では中和活性を示す抗 GP マウス血清が Raw264.7 細胞においては ADE 活性を有することが確認された。しかし、鈴木らより、SFTS 患者の病理学的解析ではマクロファージにはウイルス抗原はほとんど認められず、主として B 細胞 (post-GC B cell) に認められるとの報告があった。したがって、Fc 受容体を介した ADE の可能性よりむしろ、B 細胞はその表面に膜貫通型の抗体分子 (B 細胞受容体) を発現していることから、SFTSV 感染により誘導された GP 特異的 B 細胞に B 細胞受容体を介して SFTSV が感染する可能性、およびそのことが

SFTS の病態形成・重症化に關与している可能性が考えられた。今後、SFTSV の抗体依存性感染について抗 GP モノクローナル抗体、Fc 受容体発現低感受性細胞、および GP 特異的 B 細胞受容体発現低感受性細胞等を用いて検討することを計画している。

SFTSV の GPI は、感染細胞において細胞表面に局在は確認できないものの、低 pH バッファーで処理すると細胞表面に局在する他のウイルス種と同じように速やかに細胞融合することが認められた。これは、低 pH 環境下で GP の局在が変化するのか、検出できない量の GP が細胞表面に存在している、これで細胞融合が起きているのかなど、今後検討する必要があると思われる。25-HC によるウイルスの増殖阻害は、シュードタイプウイルスでも阻害されることから、細胞侵入の際にも影響していると考えられ、また細胞融合も阻害されることを考えると、ウイルス膜と細胞膜との膜融合の段階に作用して阻害効果を示しているものと考えられた。

細胞融合による CPE を指標とする簡便なウイルス感染価測定法はプラーク法より手技が平易で時間が短縮できるものの抗原を検出する方法より感度が低い点が問題となった。今後方法や細胞を検討する必要がある。また、単クローン抗体については現在作成を進めている。短縮抗原に対するクローンの確立、あるいは感染マウスから確立したクローンを短縮抗原でエピトープを決定する、2 種の方法で部位特異的単クローン抗体の確立を試みる。

E. 結論

リバビリン、インターフェロン- α 、S1P 阻害剤は、

細胞レベルにおいて、それぞれ SFTSV に対して抗ウイルス効果を示し、それぞれの併用は相加的抗ウイルス効果を示した。また、S1P/SKI-1 が SFTSV 増殖に関与していることも示した。しかし、個体レベルにおいては、リバビリンの抗ウイルス効果は認められなかった。

SFTSV で ADE が起こることが確認された。この抗体依存性感染現象は、患者で確認されている B 細胞へのウイルス感染に関連し、それが SFTS の病態形成に関与する可能性が考えられた。

SFTSV の GP は、細胞表面にほとんど局在していないにも関わらず、低 pH 条件下では容易に細胞膜融合を引き起こすことが明らかとなった。また、25-HC は SFTSV の細胞侵入時、特にウイルス膜融合の段階に作用して抗ウイルス効果を示すことが明らかとなり、今後、創薬開発への応用にも繋がる可能性が示唆された。

低 pH 依存性 CPE を利用した簡易感染価測定法により、より簡便な中和抗体測定法を確立できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Nishio S, Tsuda Y, Ito R, Shimizu K,

Yoshimatsu K, Arikawa J.

Seroepidemiological and biological studies on SFTSV. The 10th China-Japan International Conference of Virology Changchun, China (2014.08)

2) Ito R, Tsuda Y, Nishio S, Shimizu K,

Yoshimatsu K, Arikawa J: Analysis of

intracellular localization of virus proteins of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Taipei, Taiwan (2015.01)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

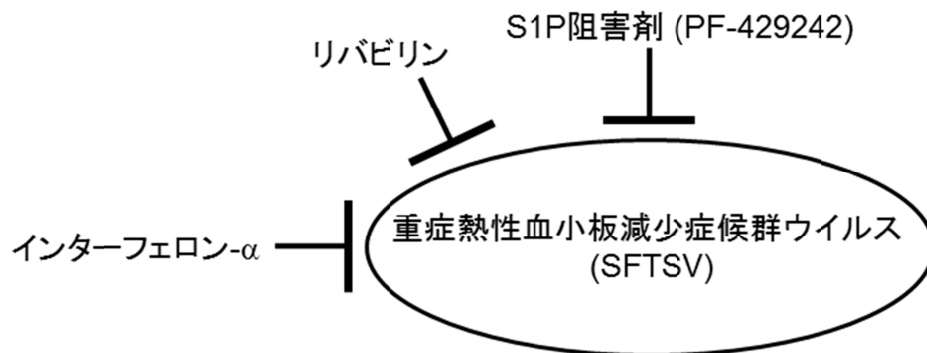


図 1. リバビリン, インターフェロン- α , S1P 阻害剤は細胞レベルにおける SFTSV 増殖を抑制する.

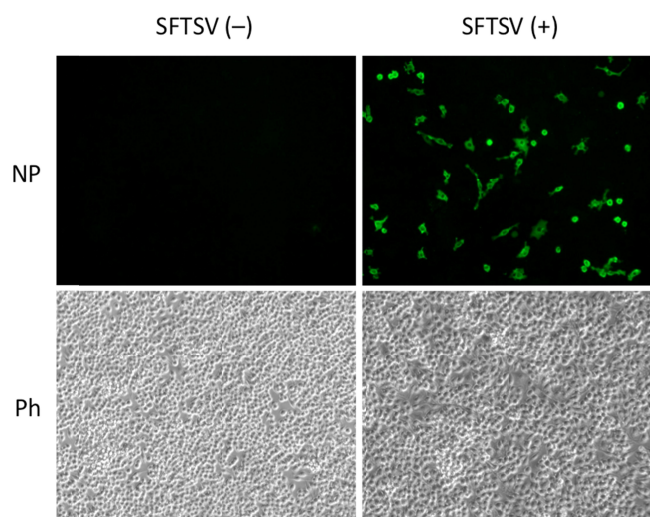


図 2. SFTSV 感染 Raw264.7 細胞の抗 NP 抗体を用いた蛍光染色像(感染 2 日目)
 図中の NP は抗 NP 血清による蛍光染色像を, Ph はその位相差顕微鏡像を示す.

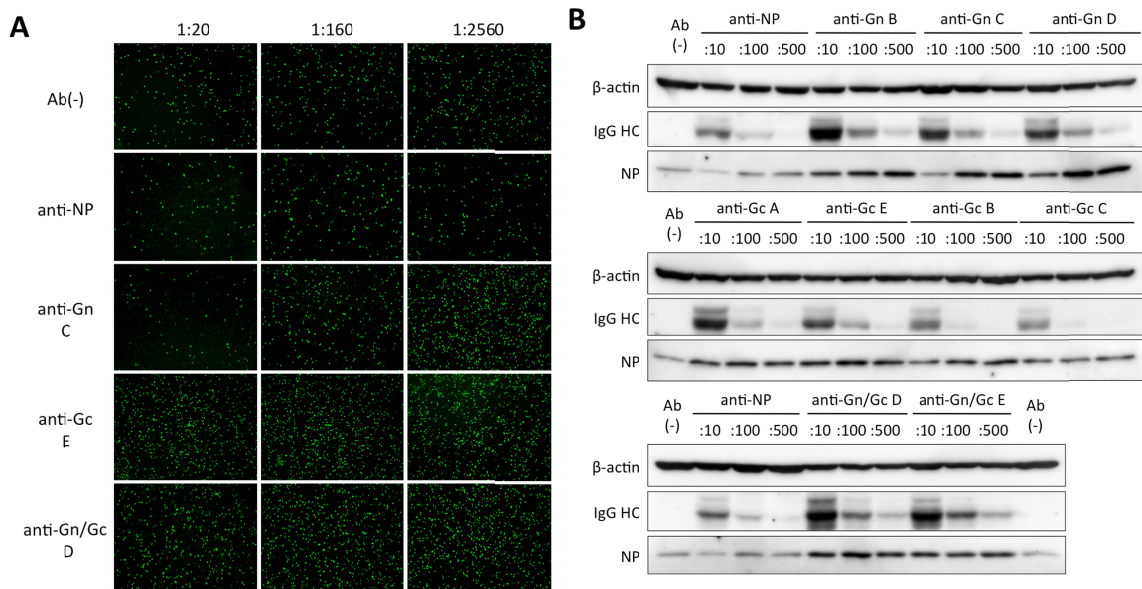


図 3. 抗 GP マウス血清による SFTSV の Raw264.7 細胞における抗体依存性感染増強

A 抗 NP 血清による蛍光染色像. シグナルの一つ一つはそれぞれウイルス感染細胞を示している. 図中上側にはウイルス中和に用いた抗 GP マウス血清の希釈率を, 左側にはその用いた抗血清とマウス個体識別を示した. なお, Ab(-)はマウス血清非添加を示す. 血清は 2 倍階段希釈で 1:20 希釈より 1:2560 希釈まで検討し, 抗 GP 血清については計 9 種類検討したが, 結果には一部を抜粋して示した.

B ウェスタンブロット法による解析. 蛍光染色の場合と同様に中和試験を行い, 細胞についてはライセートを作製し, ウイルス NP 蛋白質, 細胞 β -actin およびマウス抗血清由来の IgG 抗体重鎖 (IgG HC) の検出を行った. IgG HC については HRP 標識抗マウス IgG 抗体により直接検出し, NP および β -actin の検出については, 2 次抗体に HRP 標識 Protein A/G (Thermo Scientific 社) を使用して行った.

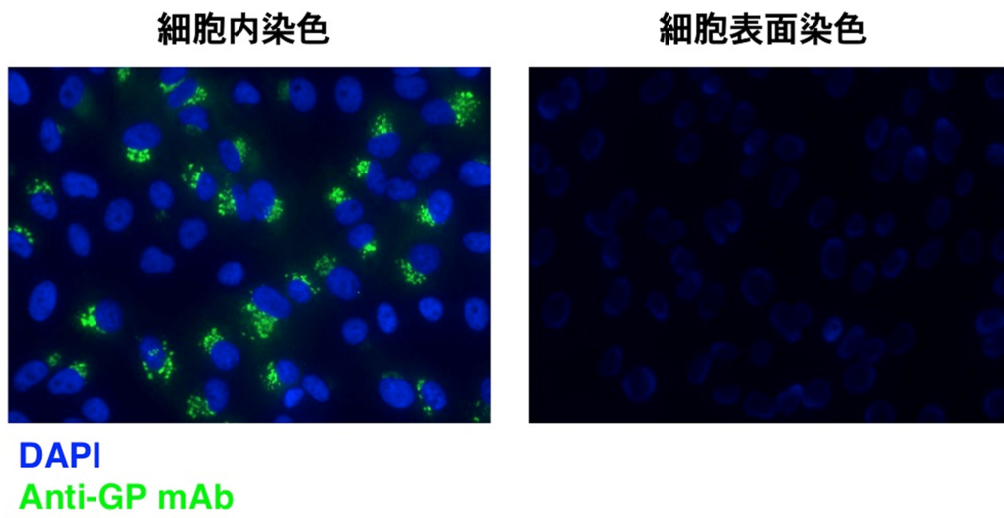


図 4. SFTSV 感染細胞における GP の細胞内局在

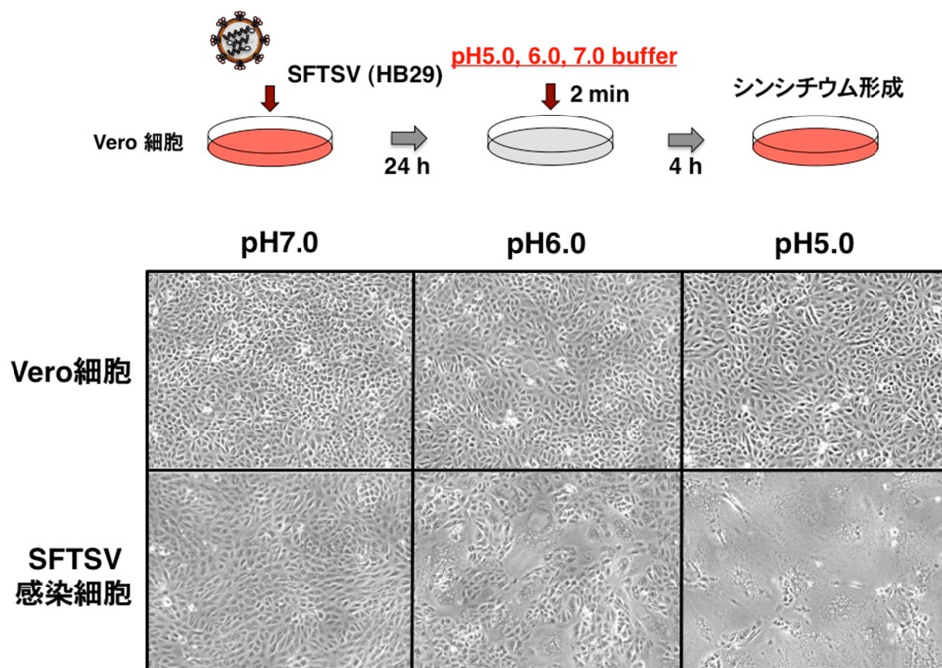


図 5. SFTSV 感染細胞での pH 依存的な細胞融合

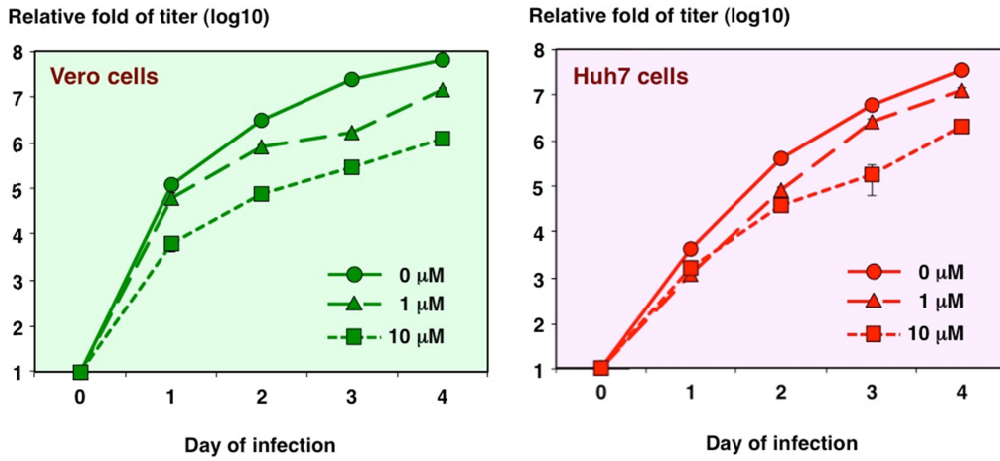


図 6. 25-HC による SFTSV の増殖阻害

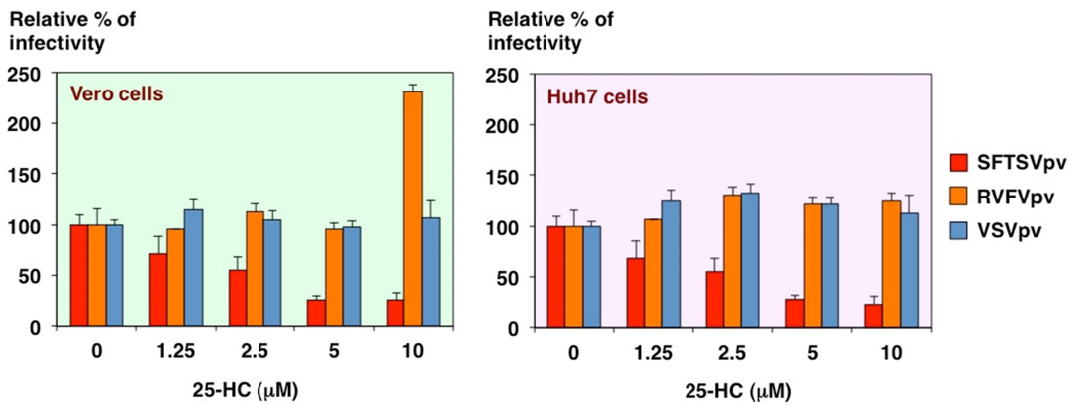
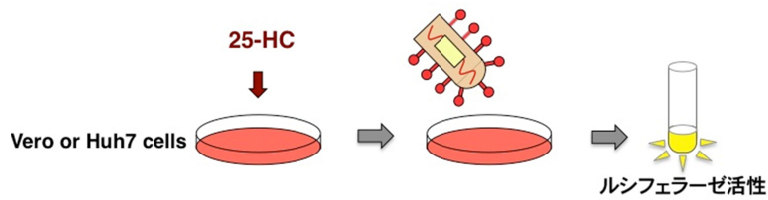


図 7. 25-HC による SFTSVpv の細胞侵入阻害

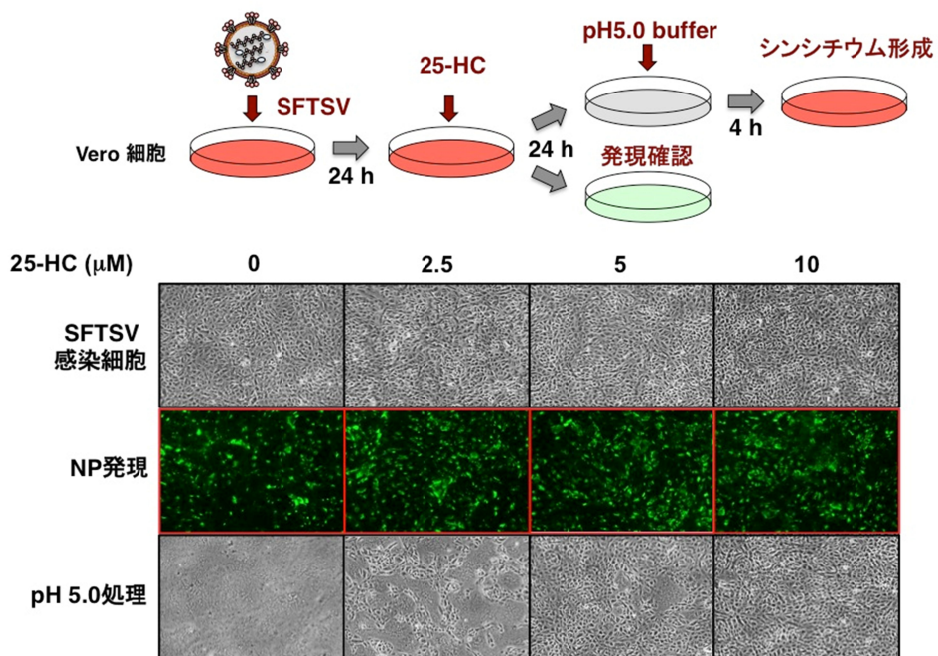


図 8. 25-HC による SFTSV 感染細胞の細胞融合



Buffer pH	Virus dilution							Titer TCID50/ml
	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	
5.6	6/6	6/6	6/6	2/6	0/6	0/6	0/6	1.5×10^5
Positive wells of cell fusion*								
IFA	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	5×10^7

図9. 細胞融合によるCPEを指標としたウイルス力価と蛍光抗体法(IFA)によるウイルス抗原の有無を指標としたウイルス力価の比較

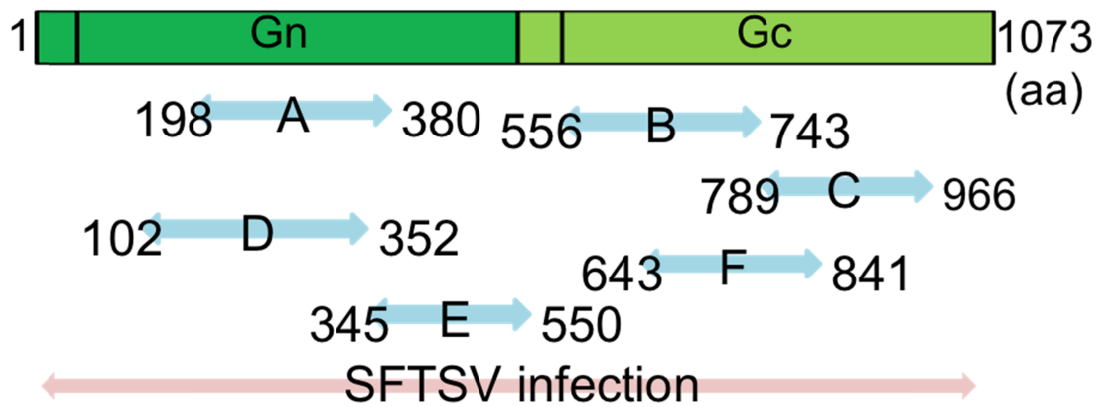


図10. 単クローン抗体作成の試み

YG1株のGPから6つの部位A-Fを選び、大腸菌ベクターで組換えタンパクを作成し、マウスに免疫した。それぞれの部位を示す。