

プロテアーゼ阻害剤による呼吸器系ウイルスの制御

国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

松山 州徳

1. 目的

急性呼吸器感染症に関わる多くのウイルス（インフルエンザ、コロナ、パラインフルエンザ、メタニューモ等）は、肺に存在するプロテアーゼを利用して増殖することが知られており、プロテアーゼによって組織特異性（トロピズム）と病原性が決められている可能性がある。呼吸器系ウイルスの感染に関わるプロテアーゼは数種類報告されており、プロテアーゼ阻害剤を組み合わせれば、様々なウイルスの感染を特異的、効率的に抑えることができるはずである。宿主プロテアーゼを抗ウイルス薬の標的とすることで多種のウイルスへの感染阻止効果が期待でき、膨大な種類が存在するといわれる呼吸器系ウイルスの何割かを、まとめてカバーする薬を開発できる可能性がある。本研究は、抗ウイルス薬及び治療法の開発に必要な知見を得るための、基礎研究である。

特に最近、肺胞上皮細胞で呼吸器系ウイルスを活性化する宿主因子として、膜貫通型セリンプロテアーゼ（TMPRSS2）の研究が活発になっている。その作用機序はウイルスの種類によって異なるが、インフルエンザウイルス、メタニューモウイルスでは、ウイルスが作られる時に細胞内でTMPRSS2がウイルスのスパイク（S）蛋白に切れ目を入れ、感染可能な成熟ウイルスを作るのに対し、コロナウイルスでは、ウイルスの細胞侵入の瞬間、ウイルスがレセプターに結合した後に細胞表面でTMPRSS2がスパイク蛋白を切り、ウイルス膜と細胞膜の融合反応の引金を引くと考えられている。2012年に、申請者はセリンプロテアーゼ阻害剤「カモスタット」がTMPRSS2を特異的に阻害し、コロナウイルス（SARS-CoV、HCoV-NL63）の細胞侵入を抑えることを報告した。

本研究では当初、TMPRSS2の利用様式がインフルエンザやメタニューモウイルスと同じと考えられるセンダイウイルスを用いて研究をおこなう予定であった。しかし、昨年（2012年）9月にサウジアラビアで中東急性呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）が発見され、我々はこの病原体のための検査対応およびウイルス理解の為に基礎研究に着手する必要性に迫られることとなった。

そもそもヒトに感染するコロナウイルスは4種類（229E、OC43、NL63、HKU1）が知られており、5歳頃までに殆んど全ての人に感染する。鼻風邪あるいは上気道炎を引き起こすだけの普通の風邪であるため、病原体が特定されることは稀であり、流行の実態も調べられていないのが現状である。しかし、2002年に中国広東省で発生した重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）は世界中に拡大し、8,098人に感染し、774人が死亡したことから、我々はコロナウイルスに対する認識を改めることとなった。10年前のSARSの記憶とコロナウイルスが本来持っている伝播性から、今回のMERS-CoVも非常に強い病原性のまま感染拡大することが懸念され、世界中で大きく報道された。現在（2013年12月）までにMERS感染者は163人、死亡者は71人が報告されており、月に20人ほどのペースで感染者は増え続けている。

我々は昨年10月、オランダのエラスマス・メディカル・センターよりMERS-CoVを入手し、BSL3実験室にて研究を開始した。このウイルスに対するプロテアーゼ感受性と、プロテアーゼ阻害剤による感染阻止効果を調べたので報告する。

2. 方法

MERS-CoVの増殖過程において、宿主プロテアーゼを利用する次の3つ段階、①細胞膜融、②ウイルスの細胞侵入、③細胞からのウイルスの放出について解析をおこなった。また、それらの各段階およびウイルスの多段階増殖、細胞変性効果について、ヒト肺胞上皮細胞由来のCalu-3細胞を用いて、セリンプロテアーゼ阻害剤「カモスタット」による阻止効果を調べた。

3. 結果 研究成果

本研究の結果は、本年2012年の9月に下記のJournal of Virology誌に受理され、12月号に掲載されている。

①MERS-CoVが感染したVero細胞を様々な市販のプロテアーゼで処理すると、5時間後に細胞融合が観察された。膜融合は広範なプロテアーゼに誘導されることが分かったが、特に炎症時に誘導される「エラスターゼ」により膜融合活性が誘導されたことは、抗ウイルスのために誘導されるプロテアーゼをこのウイルスは逆に利用して増殖する能力があることを示唆している。また、MERS-CoVの感染した細胞が細胞変性効果（細胞凝集）を見せるのは感染後48程度後であるが、TMPRSS2の発現したVero細胞においては、感染後わずか15時間で巨大な膜融合が観察された。さらにこのTMPRSS2発現細胞のウイルス感受性を調べた結果、非発現細胞よりも100倍感受性が高いことがわかった。

②上記の結果は、肺胞のプロテアーゼおよび炎症性のプロテアーゼがウイルスのスパイク（S）蛋白を活性化することを示唆しているので、次にウイルスの細胞侵入をプロテアーゼが活性化するか否かを解析した。その結果、10 μ g/mlのトリプシン存在下では5倍程度、TMPRSS2発現細胞では20倍程度、ウイルスの感染価が高くなる事がわかった。

③MERS-CoV感染後に、細胞が産生するウイルスの感染価を調べた結果では、TMPRSS2発現Vero細胞では、100倍程度多くウイルスが放出される事がわかった。細胞内と細胞外のウイルスS蛋白の量をウェスタンブロット法で調べた結果、TMPRSS2発現細胞では非発現細胞と較べて、細胞内のウイルスが少なく細胞外に多く放出されていることが分かった。この時、TMPRSS2非発現細胞で作られたウイルスは、180kDaのS蛋白で形成されているが、TMPRSS2発現細胞では180kDaに加え45kDaのS蛋白断片が大量に含まれる事がわかった。この結果は、TMPRSS2がS蛋白を解裂させる事により、ウイルスの放出を促進させていることを示唆している。

上記のTMPRSS2を利用するMERS-CoVの増殖段階について、既に我々が報告しているTMPRSS2阻害剤「カモスタット」による阻止効果を調べた。いずれの3つの段階、①細胞膜融、②ウイルスの細胞侵入、③細胞からのウイルスの放出、においても、効果的なウイルス機能の阻止が見られ、さらに、ヒト肺胞由来のCalu-3細胞においても同様に、細胞変性効果とウイルスの多段階増殖が効果的に阻止されることが示された。

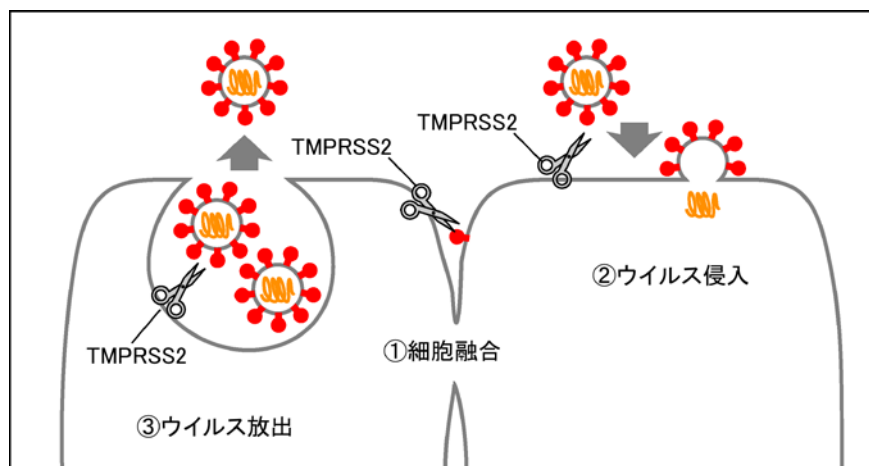


図. 肺胞上皮細胞に存在する膜型セリンプロテアーゼ「TMPRSS2」は、MERS コロナウイルスの、細胞膜融合、ウイルス侵入、ウイルス放出の段階を促進する。プロテアーゼ阻害剤「カモスタット」はTMPRSS2のプロテアーゼ活性を抑え、MERS コロナウイルスの感染を抑える。

4. 考察 まとめ

本研究において最も顕著な結果は、MERS-CoVが感染したTMPRSS2発現細胞が、極めて大きな細胞融合をわずか15時間で誘導したことである。我々の以前の研究では、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）での細胞融合には、同じ細胞で36時間かかっており、SARS-CoVと比べてMERS-CoVが非常に高いTMPRSS2感受性を持っていることを示唆している。このような非常に強い膜融合を誘導するS蛋白の分子機構は不明であるが、細胞上のレセプターの量や存在場所、レセプターとウイルスS蛋白の親和性、S蛋白の細胞内輸送が関与する可能性が考えられる。

プロテアーゼが誘導する膜融合が、病原性に及ぼす効果も不明であるが、膜融合がもたらす細胞傷害は、宿主の免疫系を活性化して炎症の誘導に関わる可能性が考えられる。

また、一般に鼻風邪のコロナウイルスを患者検体から分離することは非常に難しいとされているが、本研究に用いたVero-TMPRSS2細胞はMERS-CoV感受性が非常に高いことと、大きな細胞融合を誘導することから、MERS-CoVのみならず、様々なコロナウイルス分離のための有効な道具になると思われる。

肺胞由来のCalu-3細胞を用いた、TMPRSS2阻害剤の「カモスタット」によるMERS感染阻止を様々な方法で調べた結果は、いずれも効果的に感染と細胞傷害を阻止するものであった。「カモスタット」は既に肺炎を抑える薬として処方箋薬局で入手可能である。本研究結果は、コロナウイルスによる重症肺炎の薬として「カモスタット」を転用する可能性を示したものである。

5. 発表論文、参考文献

Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J Virol.* 2013 Dec;87(23):12552-61.