

研究成果報告書

1. 研究課題名：RS ウイルスの Fusion 蛋白の開裂活性化機構の解析
2. 研究代表者氏名：北井優貴
3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

2024 年：RS ウイルス感染における TMPRSS2 の関与の解析，第 71 回日本ウイルス学会学術集会

2025 年：生体内におけるニューモウイルス増殖への TMPRSS2 関与の解析，第 72 回日本ウイルス学会学術集会（発表予定）

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

1. 背景

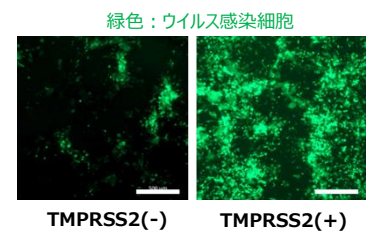
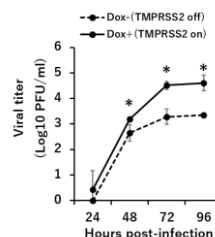
Respiratory syncytial virus (RS ウイルス)は小児を中心に呼吸器感染症を引き起こし、時に新生児や高齢者においてその感染は重篤な細気管支炎や肺炎となる。RS ウイルスを含む多くの呼吸器ウイルスは、宿主細胞のプロテアーゼによって膜融合蛋白の開裂を受けることで病原性(宿主細胞膜との膜融合能)を獲得する。すなわち、プロテアーゼによるウイルスの活性化機構を解明することは、病態形成の理解に寄与する。長らく、RS ウイルスの膜融合蛋白(F 蛋白)の開裂にはプロテアーゼの Furin が主要な役割を担っていると考えられていた。しかし、近年の報告では Furin だけでは F 蛋白の開裂が不完全であることが報告され、他のプロテアーゼの関与が示唆されている。また in vivo における RS ウイルスの感染に寄与するプロテアーゼとして Furin が主であるのか、議論の余地が残されている。そうした背景から申請者は呼吸器組織に高発現し、SARS-CoV-2 やインフルエンザウイルスなどの病原性獲得に寄与している II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ(TMPRSS2) に着目した。本研究では RS ウイルスが Furin によって開裂されるという定説を再検証するとともに、RS ウイルスの病原性獲得における TMPRSS2 の役割を解明することを目的とした。

2. 方法・結果

(I) RS ウイルスの増殖における TMPRSS2 の関与の解析

RS ウイルスの増殖における TMPRSS2 の役割を明らかにするため、TMPRSS2 発現細胞株(HeLa-TMPRSS2、Vero-TMPRSS2)およびテトラサイクリンによる TMPRSS2 発現誘導細胞株(293-3P6C33)へ RS ウイルスを感染させ、培養上清中のウイルスの感染価を測定することで TMPRSS2 が RS ウイルスの増殖に与える影響を評価した。

いずれの TMPRSS2 発現細胞においても、RS ウイルスの感染およびウイルス感染細胞による細胞融合が増強されていた。この結果から、TMPRSS2 が RS ウイルスの活性化に寄与するプロテアーゼであることが示唆された。

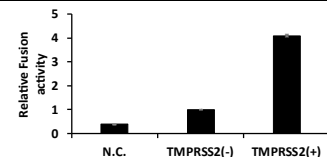


(II) RS ウイルス F 蛋白の開裂および膜融合活性の評価

RS ウイルスの F 蛋白には 2 か所の開裂部位があるため、宿主プロテアーゼによる開裂によって 27 アミノ酸ペプチド(p27)が F 蛋白から遊離する。この p27 に対する抗体を作製し、F 蛋白の開裂をウェスタンブロッティング(WB)およびフローサイトメトリー(FCM)で評価した。さらに、開裂した F 蛋白は膜融合活性をもち、F 蛋白発現細胞は隣接する細胞との間で細胞融合を起こす。F 蛋白の膜融合活性を Dual split protein (DSP)を用いて定量的に評価した。TMPRSS2 非発現・発現細胞に DSP を導入し、RS ウイルスを感染させることで、細胞融合を定量的に評価した。

抗 p27 抗体を用いた WB・FCM 解析では、TMPRSS2 発現による明らかな F 蛋白の開裂促進は確認され

なかった。一方で、DSP システムを用いた定量的な膜融合活性の評価によって、TMPRSS2 発現細胞において F 蛋白が引き起こす細胞融合は有意に増加していることが示された。



(III) 生体におけるニューモウイルス(RS ウイルス、マウス肺炎ウイルス)感染における TMPRSS2 の重要性
より生体に近い環境において、RS ウイルスの感染に TMPRSS2 が関与するのか、東京科学大 高山教授より(野生型、TMPRSS2KO)呼吸器オルガノイドを提供していただき解析した。

野生型・KO 間で明確なウイルス感染の差は認められなかったが、用いた呼吸器オルガノイドのロットの影響も考えられるため、TMPRSS2 を阻害する薬剤を用いた解析を今後検討している。

さらに、RS ウイルスの病原性における TMPRSS2 の重要性を検討した。病原性の解析には、マウスがよく用いられるが、RS ウイルスはヒトを宿主とするウイルスであり、マウスに感染を起こさないため、RS ウイルスと同じくニューモウイルス科に属し、マウス感染系において RS ウイルスの代替として用いられるマウス肺炎ウイルス(PVM)での検討を行った。RS ウイルスおよび PVM はゲノム構造が同じで、どちらも F 蛋白の開裂部位は Furin に開裂される配列である。PVM を野生型・TMPRSS2KO マウスへ経鼻接種し、体重の減少・生存率を指標に病原性を評価した。また、肺におけるウイルス増殖および F 蛋白の開裂を解析した。

PVM 感染は、野生型マウスと比べ TMPRSS2KO において体重減少は軽微に留まり、野生型マウスが半数以上致死となる投与量でも TMPRSS2KO は全匹生存したことから、TMPRSS2 が病原性に寄与していることが示された。また肺におけるウイルス増殖も TMPRSS2KO において低下していた。一方で、F 蛋白の開裂には明確な差は見られなかった。

(IV) 細胞内における p27 の役割

F 蛋白は生合成された感染細胞内で開裂を受ける。すなわち、細胞内には F 蛋白から遊離した p27 が多量に存在することが予想される。抗 p27 抗体による免疫染色より、感染細胞内に p27 が蓄積することが確認された。そこで、細胞内の p27 が宿主細胞に何らかの影響を与えているのか、p27 を発現させた細胞において RNAseq を行い網羅的に解析したが、有意な遺伝子の変動は確認されなかった。

3. 考察

TMPRSS2 はこれまで、SARS-CoV-2 やインフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルスなど多くの呼吸器ウイルスの活性化に寄与することが報告されている。RS ウイルスはこれらのウイルスとは異なり、細胞に普遍的に発現するプロテアーゼ Furin による開裂を受けて活性化すると考えられてきた。しかし本研究より、RS ウイルスの感染および F 蛋白による膜融合に TMPRSS2 が寄与していることが示唆された。さらに、RS ウイルスと同様にニューモウイルス科に属し、Furin による活性化を受けるマウス肺炎ウイルス(PVM)のマウスに対する病原性に TMPRSS2 が寄与していることが示された。これらの結果から、ヒト気道上皮等に発現する TMPRSS2 が RS ウイルスの増殖に寄与し、重症化の一因となっている可能性が示唆された。

一方で、本研究においては TMPRSS2 が RS ウイルスおよび PVM の F 蛋白の開裂を促進している直接的な結果は見られなかった。TMPRSS2 による F 蛋白の開裂が、ウイルス感染時に瞬間的に起こる可能性も踏まえ、今後は解析手法の検討を進める予定である。また開裂による副産物として生じる p27 の機能についても検討を重ね、RS ウイルス F 蛋白の開裂というウイルス活性化に重要なイベントを多面的に解析する予定である。