

SARSに関する研究の概要

1. SARSコロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究

(1) 研究年度 平成 16 年度

(2) 主任研究者(所属機関)

田口 文広(国立感染症研究所ウイルス第 3 部)

(3) 分担研究者(所属機関)

横田恭子(国立感染症研究所免疫部)、岡田全司(国立療養所近畿中央病院臨床研究センター)、石井孝司(国立感染症研究所ウイルス第 2 部)、黒澤良和(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)、山本典生(東京医科歯科大学)、山田靖子(国立感染症研究所動物管理室)、宝達 勉(北里大学獣医畜産学部)、池田秀利(動物衛生研究所感染症研究部)

(4) 概要

- ①研究目的：重症急性呼吸器症候群 (SARS) は、コロナウイルス (SARS-CoV) による致死率の極めて高い新興感染症であり、予防治療法は未だ確立されていない。本研究の目的は、SARS の病態を把握し、SARS に対する有効で安全なワクチン及び抗ウイルス剤の開発のための基礎的研究である。
- ②研究方法：ウイルスは SARS-CoV (HKU39849 と Frankfurt-1 株) 猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) を用いた。SARS-CoV の増殖、力価測定は VeroE6 細胞で行った。SARS-CoV 遺伝子をクローニングし、大腸菌、哺乳動物培養細胞で発現するため各々のベクターに挿入した。また、SARS-CoV 遺伝子を含む組み換えワクシニアウイルス DIs を作成した。免疫には BALB/c, C57Bl, SCID-PBL/hu マウスを用いた。SARS-CoV 受容体 ACE2 遺伝子分離にはフェレットを、FIPV 感染には SPF 猫を用いた。
- ③結果と考察：SARS-CoV 増殖はプ鴻 e アーゼにより著しく亢進し、肺炎重症化でのプロテアーゼ関与が示唆された。マウスを用いた不活化ワクチン、DNA ワクチン、組み換えワクチン研究では、SARS-CoV に対する細胞性及び液性免疫が惹起され、マウス体内のウイルス増殖を抑える抵抗性を賦与できたワクチンもあった。抗ウイルス剤としては、2 種類の薬物が培養細胞レベルでの抗 SARS 活性を示した。また、フェレットが SARS 感受性 ACE2 を持つことが判明し、動物モデルとしての有用性が期待される。FIPV 感染における抗体依存性感染増強の発生機序で Fc 受容体の関与が明らかにされ、SARS の病態発生の基礎的研究に貢献した。本年度は、SARS ワクチン開発に向けて期待できる結果が得られた。今後は、ワクチン開発と共に動物モデルを用いたワクチン、抗ウイルス剤の有効性、安全性の評価システムの確立を目指したい。

④結 論： 本研究では SARS の重症化にプロテアーゼが関与すること、マウスを用いた不活化ワクチン、DNA ワクチン、組み換えワクチンが液性、細胞性免疫を誘導することが明らかにされた。また、抗ウイルス剤としても2薬物が発見された。フェレットが動物モデルになる可能性が示唆され、FIPV の抗体依存性感染増強への Fc 受容体の関与が示された。これらの成果をもとに、動物でのワクチン評価システムの確立が期待される。

2. SARSウイルス感染阻止化合物の探索

(1) 研究年度 平成16年度

(2) 主任研究者(所属機関)

菅村 和夫(東北大学大学院医学系研究科)

(3) 分担研究者(所属機関)

石坂 幸人(国立国際医療センター)、服部 俊夫(東北大学大学院医学系研究科)

(4) 概要

- ①研究目的: Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」の複製様式を研究し、特異的阻害剤を発見する。我々が細胞内シグナル伝達分子として同定したSTAM, HrsはESCRT-0に分類され種々の蛋白の輸送制御に関わる。そこで本研究においてはこれらの小胞輸送系蛋白に焦点をあてることにより、SARSウイルスの細胞内吸着から細胞内侵入に至る過程およびウイルス成熟と出芽の詳細を明らかにする。これらのウイルスのライフサイクルを阻害する生理活性物質の検討を行う。このためには多くの阻害薬を高効率にスクリーニングすることが必要であるため、あらたな*in vitro*実験系を構築し、海洋生物、漢方由来エキスを網羅的に探索することによりSARSウイルスの発症コントロールを視野に入れた包括的生理活性物質探索を行う。
- ②研究方法: STAM1/SATM2 ダブルノックアウト細胞株(SSd) Hrs ノックアウト細胞株(HRSd)を作成し、これらのこの細胞株をレトロウイルスベクターを用いてHRSを戻した細胞株(HRSdRe)を樹立し、遺伝子および蛋白の発現の確認を行った。そこにポリオウイルス、サイトメガロウイルスを感染させた。ヒト型に改変されたS蛋白質と受容体であるACE-2をそれぞれ発現させた。その結合を種々の条件で検討する。またS蛋白を表面に持つ、偽ウイルスを作成し、適当な標的細胞を見だし、多検体をスクリーニングできる系を開発する。SARSウイルス侵入阻害物質を発見する。
- ③結果と考察: 様々な条件で比較して3種類のプラスミッドを293T細胞に導入して得て作成した偽ウイルスが最も安定性が高いことが明らかになった。これらの偽ウイルスを用いて、ヒト肝臓由来細胞株であるHepG2への感染効率が高いことが明らかになり、96穴のプレートによりルシフェラーゼ活性を測定できることが明らかになった。
- ④結論: 小胞輸送関連物質のSARS複製に及ぼす役割が明らかになってきた。また新たな感染抑制物質を発見するためのスクリーニング系が開発された。

3. SARSコロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

(1) 研究年度 平成16年度

(2) 主任研究者(所属機関)

森川 茂(国立感染症研究所ウイルス第一部)

(3) 分担研究者(所属機関)

北村 義浩(東京大学医科学研究所)、森田 公一(長崎大学熱帯医学研究所)、松浦 善治(大阪大学微生物病研究所)、奥野 良信(大阪府立公衆衛生研究所感染症部)、田代 真人(国立感染症研究所ウイルス第三部)、棚林 清(国立感染症研究所獣医科学部)、長谷川 秀樹(国立感染症研究所感染病理部)、納富 継宣(栄研化学株式会社生物化学研究所)

(4) 概要

- ①研究目的：SARSは1類感染症に指定されている。実験室感染を回避できるウイルス培養を必要としない血清診断系の開発を行う。他の呼吸器感染症との鑑別診断も行う。初年度は、組換え抗原による抗体検出法の開発、SARS-CoVを用いない安全なウイルス中和抗体測定法の開発、LAMP法によるSARS-CoV検出の至適化と改善、サルへのSARS-CoV感染系の解析、ACE2-トランスジェニックマウスの作製を行う。
- ②研究方法：1) 血清診断法：組換えN蛋白を用いたELISA法を作製した。また、S蛋白を被ったVSV-シュードタイプ、ACE2を被ったシュードタイプバキュロウイルスを作製し、中和抗体測定法を開発した。イムノクロマト法を開発するために抗体を作製した。2) 遺伝子検出法：LAMP法の有用性を検討した。また、感度向上のための基礎検討を行った。鑑別診断用LAMP法の基礎検討を行った。3) モデル動物系：SARS-CoV感染サルにおけるウイルスの動態と免疫応答を解析した。また、ヒトACE2発現トランスジェニックマウスの作出を試みた。
- ③結果と考察：1) 血清診断法：組換えN蛋白を用いた血清診断系では、他のコロナウイルスとホモロジーの高い領域を除くことで特異性が高められた。VSV-シュードタイプを用いて中和抗体測定が10時間で可能になった。ACE2を被ったシュードタイプバキュロウイルスも作製できた。迅速なイムノクロマト法に用いる構造蛋白のペプチド抗体を作製した。2) 遺伝子検出法：LAMP法はRT-PCRより迅速で高感度であった。また、RNA抽出法等の改良により感度が向上できた。迅速鑑別用LAMP法の基礎データを得た。3) モデル動物系：SARS-CoV感染サルでは、咽頭・直腸拭液からウイルス遺伝子が検出され、感染10日目以降に抗体が検出された。トランスジェニックマウス3系統でACE2発現を確認した。これらは、より迅速で安全な実験室診断の確立につながるものである。
- ④結論：SARS-CoVの培養系を使用しない血清診断系により、実験室感染のリスクを回避でき、迅速に抗体測定が可能である。LAMP法は極めて高感度であるが、検出感度の向上によりさらに確実な診断が可能となる。感染サル材料を用いて、今後開発、改良された検査法の精度、感度検定が可能である。トランスジェニックマウスは、より有効なモデル動物系の開発につながると思われる。

4. ペプチド抗体によるSARS(重症急性呼吸器症候群)診断の迅速化

(1) 研究年度 平成16年度

(2) 主任研究者(所属機関)

伊東 恭悟(久留米大学(医学部))

(3) 分担研究者(所属機関)

笹月 健彦(国立国際医療センター)、七條 茂樹(久留米大学(医学部))、切替 照雄(国立国際医療センター研究所)

(4) 概要

- ①研究目的: 患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体により認識される SARS ウイルスの構造蛋白エピトープを同定し、これを用いた迅速診断法を確立する。なお、本研究はベトナム保健省の倫理委員会及び国立国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施した。
- ②研究方法: 台湾人 SARS 感染初期血清、ベトナム健常人、同接触非感染者および同 SARS 感染後6ヶ月患者血清を用いた。ペプチド: SARS-CoV 構成タンパク (spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E))由来の15mer ペプチドをそれぞれ125、43、22、7種類(合計197種類)合成した。抗体測定法: 抗体は、Luminexを用いたflowmetryで行った。実験操作は国際医療センター高度安全管理室内で行った。
- ③結果と考察: SARS 急性期感染患者血清で197種類のうち42種類のペプチドが陽性であった。なかでもS791およびN161が最も高い測定値を示した。42種類のペプチドのうち感染6ヶ月後患者血清で有意に認識される3種類(S791, M207, N161)のペプチドを同定した。本研究では微量の血清量で抗体の測定が可能で、最大100種類の抗原に対する抗体が同時に測定できる、Luminexを用いたflowmetry法を選択した。Nucleocapsid(N)に対する抗体は、急性期で最も高くその後次第に減少するという報告がある。一方、本研究で同定された3種類のペプチドに対する抗体は、6ヵ月後でS791, M207, およびN161に対してそれぞれ51%、60%および42%といずれも高い陽性率を示していることからペプチドに対する抗体測定の有用性が示唆された。しかしながら抗体の検出がSARS感染を診断する上でどのような意味を持つのか今後慎重に解析し検討する必要がある。
- ④結論: 各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。

5. ヒト型抗SARS中和抗体の開発研究

(1) 研究年度 平成16年度

(2) 主任研究者(所属機関)

切替 照雄(国立国際医療センター研究所 感染・熱帯病研究部)

(3) 分担研究者(所属機関)

笹月 健彦(国立国際医療センター)、田代 真人(国立感染症研究所 ウイルス第3部)、七條 茂樹(久留米大学医学部 免疫学教室)、石田 功(キリンビール株式会社医薬カンパニー医薬フロンティア研究所)

(4) 概要

- ①研究目的：本研究では、SARS ウイルス感染予防、感染後の発症予防、発症後の重症化予防と治療法確立を目的とし、ヒト型ウシを用いたヒト型中和抗体の開発を目指す。SARS 患者血清と反応する多数の SARS ウイルス抗原エピトープを同定し、これらエピトープを含むオリゴペプチドをヒト型マウス及びウシに免疫し、大量のヒト型中和抗体を作成し実用化を目指す。
- ②研究方法：抗原ペプチドの候補選定：SARS ウイルス構成タンパク由来の 15mer ペプチドを合計 197 種類合成し、color-coded beads に共有結合させ、これらペプチドに対する抗体は、Luminex を用いた flowmetry で行った。抗原ペプチドのデザイン：SARS 患者に特異的なペプチドの配列を元にペプチドを合成した。組換え蛋白質の調整：His-Tag が除去可能な設計とするため、前者では TEV プロテアーゼというエンドプロテアーゼの認識部位を His-Tag 直下に導入した。大腸菌での大量発現の確認後、ニッケルキレートカラム、His-Tag 除去、TEV プロテアーゼにより精製した。抗体中和活性試験の確立：Vero E6 細胞系をヒト型抗体の中和試験に対して最適化を行なった。
- ③結果と考察：抗原ペプチドの候補選定：SARS-CoV 由来 S、M 及び N 蛋白質の 3 つの蛋白質情報から 197 種類の重なり合うように設計されたペプチドを合成し、感染後の SARS 患者 44 名から採取した血清中の IgG との反応性を検証して、抗原ペプチド候補を絞りこんだ。抗原ペプチドの設計：SARS 患者に特異的な 3 つのペプチドの配列を元にペプチドを合成した。これらの配列に MAP 修飾したもの、インフルエンザ血球凝集素ペプチドまたはユビキチン卵白アルブミンペプチドとこれらの配列を融合させたものの、総計 4 種類のデザインを行った。組換え蛋白質の調整：SARS-CoV 由来蛋白質のうち抗原候補として、S、M 及び N 蛋白質の組換え蛋白質、抗原を調整した。抗体中和活性試験の確立：Vero E6 細胞の細胞変性を指標としたヒト型抗体の中和試験を確立してプロトコールを作成した。
- ④結論：SARS ウイルスの感染防御、感染後の SARS 発症予防、さらに SARS 発症後の重症化予防と治療を目指した。本年度は、抗原ペプチドの候補選定、抗原ペプチドのデザイン、組換え蛋白質の調整、抗体中和活性試験の確立の 3 項目を実施し、大きな進展があった。

6. SARSの感染・発症・重症化の分子機構

(1) 研究年度 平成16年度

(2) 主任研究者(所属機関)

笹月 健彦(国立国際医療センター)

(3) 分担研究者(所属機関)

徳永 勝士(東京大学)、慶長直人(国立国際医療センター)

(4) 概要

- ①研究目的：SARSの感染・発症・重症化には宿主側の要因が深く関与するものと考えられているが、その機構についてはほとんど解明されていない。候補となる遺伝子の変異検索と関連解析、関連分子の機能解析により、SARSの病態解明をめざす。
- ②研究方法：2003年、ベトナムにおいてSARSと診断された62例のうち、書面による同意を得られた44例、SARS患者との接触があったがSARSを発症しなかった病院スタッフ103例、別の病院のスタッフ50例を解析した。血球からゲノムDNAを抽出した。遺伝子多型タイピングは、RFLP法、SSCP法、直接シーケンス法を併用した。
- ③結果と考察：アンジオテンシン変換酵素(ACE1)の挿入欠失多型とSARS重症化との関連性を検討したところ、非低酸素血症群と比較して肺傷害に伴う低酸素血症群では、欠失アリの頻度が有意に高かった。ロジスティック解析の結果、独立因子として、ACE1欠失変異の関与が推定された。血管内皮に発現するACE1によって生成されるアンジオテンシンIIは血管内皮の傷害と関連して、肺の重症化に関与している可能性が考えられる。次に、SARSウイルスの宿主側レセプターであるACE2遺伝子には、新たなバリエーションが同定された。しかしその遺伝子変異とSARS発症との関連は否定的であった。インターフェロン誘導抗ウイルス遺伝子群を候補として、OAS-1遺伝子の、複数のSNPsが、SARSの発症ないし感染と有意な関連を示した。さらに、MxA遺伝子プロモーター領域のSNPはSARS患者の低酸素状態の有無と関連を示した。OAS-1とMxAはそれぞれSARSにおける疾患感受性と重症化に影響を与えているものと推測された。さらに、ウイルスに対する免疫応答の検討に用いられるdsRNA刺激により、活性化マクロファージが、NKG2Dリガンドの一つRAE-1を発現することが明らかとなった。
- ④結論：我々は、ベトナムとの国際共同研究によって、SARSの感染・発症・重症化に関連する遺伝子多型を明らかにした。さらにSARSレセプターACE2の新たなエクソンと新たなSNPsの発見は、今後、重要な情報を提供するものと考えられる。SARSと非HLA遺伝子との関連を検討し有意な結果を得たのは、本研究が世界で初めてであり、その結果は、すでに3報の論文として、国際誌に報告した。