

SARS-CoV の病原性発現機構の解明

一戸猛志

東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター ウイルス学分野

【研究の背景】

重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS) の原因ウイルスとして同定された Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) は、その高い致死率から臨床上極めて重要なウイルス感染症のひとつである。2002 年から 2003 年までの 1 年間で、8098 人の SARS-CoV 感染者が報告され、そのうち 9.6% の感染者が死亡した。この高い致死率は、SARS-CoV が感染したことによる生体内での高レベルの炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IL-6 など) の誘発が原因であると考えられている。しかし、SARS-CoV が引き起こすこのような炎症性サイトカインの調節不全のメカニズムについては全く明らかにされていない。

【目 的】

本研究では、SARS-CoV による IL-1 β の産生機構を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

申請者は、インフルエンザウイルス M2 遺伝子や EMCV 2B 遺伝子を発現するレンチウイルスを作製し、マウスマクロファージに感染させることにより、NLRP3 inflammasome が活性化することを示してきた¹⁻⁵⁾。同様の方法で、SARS-CoV の 3a, E 遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込み (ViraPower Lentiviral Expression Systems, Invitrogen)、SARS コロナウイルス 3a, E タンパク質を発現する組換えレンチウイルスを作製した。これをマウスマクロファージに感染させ、培養上清中の IL-1 β の産生を ELISA で測定した。ネガティブコントロールには EGFP を発現するレンチウイルスを使用した。各ウイルスタンパク質の細胞内局在は、V5 タグ抗体を用いて共焦点顕微鏡により観察した。また SARS コロナウイルス、または SARS コロナウイルス感染細胞からウイルス RNA を抽出し、ウイルス RNA をマウスマクロファージにトランスフェクションしたときの、インターフェロン β の mRNA 量を定量 PCR 法で、培養上清中の IL-1 β の産生を ELISA で測定した。最後にヒト THP-1 細胞を PMA で処理をしてマクロファージ様細胞に分化させ、SARS-CoV を感染させた。感染 24 時間後に培養上清を回収し、培養上清中の IL-1 β の量を ELISA で測定した。

【結 果】

マウス骨髄マクロファージに、SARS-CoV の 3a, E 遺伝子を発現させた組換えレンチウイルスを感染させると、培養上清中に IL-1 β を検出することに成功した。また SARS-CoV の 3a タンパク質のイオンチャネル活性を欠失させた場合には、IL-1 β の有意な産生は認められなかった。HeLa 細胞に、NLRP3 を単独で発現させると、NLRP3 は細胞質中全体に広がって観察されたが、NLRP3 と 3a タンパク質を共発現させると、NLRP3 が活性化して、核周囲への凝集が観察された。SARS-CoV 3a タンパク質による IL-1 β の産生は、培養液中の過剰な K⁺ や、活性酸素種 (ROS) 阻害剤により抑制された。最後に、PMA でマクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞に、SARS-CoV を感染させたが、培養上清中には有意な IL-1 β を検出することができなかった。

【考 察】

マウス骨髄マクロファージに、SARS-CoV の 3a, E 遺伝子を発現させた組換えレンチウイルスを感染すると、培養上清中に IL-1 β を検出できた。この IL-1 β の分泌や NLRP3 の活性化(核周囲への凝集)には、SARS-CoV 3a タンパク質のイオンチャネル活性が必要であったことから、SARS-CoV 3a タンパク質はそのイオンチャネル活性により NLRP3 inflammasome を活性化させていることが推察された。SARS-CoV 3a タンパク質による IL-1 β の産生は、培養液中の過剰な K⁺や、活性酸素種(ROS)阻害剤により抑制されたことから、SARS-CoV 3a タンパク質による NLRP3 inflammasome の活性化とそれに続く IL-1 β の産生には K⁺ efflux とダメージを受けたミトコンドリアが産生する ROS が重要な役割を果たしていると考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究から、SARS-CoV による IL-1 β の産生機構が明らかになり、SARS-CoV 感染症による炎症を低減する治療薬の開発に役立つ重要な知見が得られた。

【参考・引用文献】

1. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):404-10.
2. Ito M, Yanagi Y, Ichinohe T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002857.
3. Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 29;110(44):17963-8.
4. Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, Koshiba T. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun.* 2014 Aug 20;5:4713.
5. Moriyama M, Chen IY, Kawaguchi A, Koshiba T, Nagata K, Takeyama H, Hasegawa H, Ichinohe T. The RNA- and TRIM25-Binding Domains of Influenza Virus NS1 Protein Are Essential for Suppression of NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 β Secretion. *J Virol.* 2016 Mar 28;90(8):4105-14.