

研究成果報告書

ウイルス感染に対する宿主自然免疫応答とウイルスによる その抑制の新規メカニズム

熊本大学大学院生命科学研究部・免疫学講座

押海裕之

要旨

ウイルス感染初期の生体防御に自然免疫は必須の役割を果たす。特に、強い抗ウイルス作用を示すサイトカインとして知られる I 型インターフェロンの産生は重要である。ウイルスが細胞へ感染すると、細胞内のウイルス RNA センターとして知られる RIG-I 分子がウイルス RNA と結合し I 型インターフェロン産生が誘導される。我々は、2019 年末からパンデミックを引き起こした新型コロナウイルスに対する自然免疫応答について調べ、新型コロナウイルスがこれらの自然免疫応答を抑制することを明らかとし、さらにその分子メカニズムについて研究を進めた。

目的

COVID-19 のパンデミックなど、ウイルス感染症はヒトの健康と生命を脅かすのみならず、社会の停滞と混乱の原因となる。ウイルスに対する自然免疫応答は感染初期の生体防御に必須である。細胞質内の RIG-I 分子がウイルス RNA を認識すると強い抗ウイルス作用を示すサイトカインの I 型インターフェロンが産生される。この I 型インターフェロンにより RNaseL や PKR などの抗ウイルスタンパク質が産生されウイルスを排除する。RIG-I 依存

的な自然免疫応答は A 型インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスなどの数多くのウイルスに対する自然免疫応答に必須である。一方で、ウイルスは宿主自然免疫応答を抑制する仕組みを進化の過程で獲得し、ヒトの自然免疫応答をくぐり抜け感染を成立させる。例えば、インフルエンザウイルスの NS1 分子や C 型肝炎ウイルスの NS3-4A 分子が RIG-I 依存的な自然免疫応答を抑制することが知られている。

2019 年に発生した SARS-CoV-2 を原因とする COVID-19 感染症はパンデミックとなり世界中で猛威を振るっている。その治療薬の開発のためには SARS-CoV-2 感染時の免疫応答を解明することが重要になる。本研究では SARS-CoV-2 感染時の自然免疫応答に特に焦点を絞り、ウイルス感染時の自然免疫応答とウイルスがそれを抑制する仕組みについて研究を進めた。

結果

新型コロナウイルスの増殖実験

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する自然免疫応答を調べるため、VeroE6/TMPRSS2 細胞へ SARS-CoV-2 (JPN/TY/WK-521 株) を MOI = 0.01 以下で感染させ 2 日後の細胞上清を TCID₅₀ 法で測定したところ、 $1\sim 3 \times 10^7$ TCID₅₀/ml のウイルスを得ることができた。また、MOI = 1 で感染させると 24 時間後には 9 割以上の VeroE6/TMPRSS2 細胞が CPE を示した。SARS-CoV-2 はヒト細胞の ACE2 分子に結合し感染するが、HEK293 細胞や A549 細胞でも弱いながら感染が確認できた。

新型コロナウイルスに対する自然免疫応答

SARS-CoV-2 は+鎖の一本鎖 RNA をゲノムに持ち、その全長はおよそ 3 万塩基の長さである。我々はウイルスゲノム RNA のどの領域が RIG-I に認識されるのかを調べるため、およそ千塩基ずつの断片にわけ合成し、HEK293 細胞へ形質導入し調べたところ、RIG-I 分子により認識されやすい部位が存在することを発見した。一方で SARS-CoV-2 感染粒子を HEK293 細胞へ感染させた場合の I 型インターフェロンの産生は非常に微弱であり、新型コロナウイルスがヒト細胞の自然免疫応答を抑制する機能を有することを発見した。また、RIG-I 活性化に関与する様々な分子のノックアウト細胞を用いて実験をすることで、新型コロナウイルスに対する自然免疫応答に重要な宿主分子を複数同定した。

新型コロナウイルスが自然免疫応答を抑制するメカニズム

SARS-CoV-2 の ORF を発現ベクターにクローニングし HEK293 細胞へ発現させたところ、複数の新型コロナウイルスのタンパク質が I 型インターフェロン産生を抑制することを発見した。特に、コロナウイルスでこれまで機能未知とされたタンパク質が自然免疫抑制を担うことが示唆された。

考察

コロナウイルスは、従来は冬風邪のウイルスとして知られていたが、SARS や MERS など重症化するコロナウイルスがここ数十年の間に現れている。新型コロナウイルスについても SARS や MERS とともに強毒性を示すが、その分子メカニズムは解明されていない。本研究では新型コロナウイルスに対しても本来 RIG-I 依存的な自然免疫応答が生じることが示唆されたが、一方で、新型コロナウイルスの複数のタンパク質が自然免疫応答を抑制することも明らかとなった。これは新型コロナウイルスが重篤化するメカニズムの一つであると考えられる。今後、これらのメカニズムをさらに解明することで新型コロナウイルスに対する新たな治療薬の開発に繋がると期待される。我々は現在自然免疫を標的とする新たな化合物の同定のためケミカルスクリーニングを実施しており、他の治療薬と併用できる新たなタイプの治療薬を同定できると期待される。