

「II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 による呼吸器ウイルス活性化機構」

東京大学大学院医学系研究科 教授

竹田 誠

要旨

呼吸器ウイルスは、膜融合タンパク質が宿主プロテアーゼにより開裂活性化されることで感染性を獲得する。TMPRSS2 は多くの呼吸器ウイルスの活性化因子として知られるが、その知見の多くは非自然宿主モデルに基づくものであり、本来の感染宿主内での役割は十分に検証されていなかった。本研究では、自然宿主感染モデルとヒト iPS 細胞由来呼吸器オルガノイドを用いて解析を行った。センダイウイルスでは TMPRSS2 欠損により膜融合タンパク質の開裂、ウイルス増殖および病原性が著しく低下した一方、多塩基性開裂モチーフを持つマウス肺炎ウイルスでは依存性は限定的であった。さらにヒト呼吸器オルガノイドでは、SARS-CoV-2 は TMPRSS2 欠損下でも増殖し、カテプシンを含む複数のプロテアーゼ経路が代替的に機能することが示された。すなわち、TMPRSS2 は呼吸器ウイルス活性化における主要な宿主プロテアーゼであるものの、感染成立は単一のプロテアーゼに依存せず、ウイルスの開裂配列の性質と感染組織に存在する複数のプロテアーゼの組み合わせによる、より複雑な機構によって成立することが明らかとなった。

背景・目的

多くのエンベロープウイルスは、宿主細胞膜との融合によって細胞内へ侵入する。この膜融合はウイルス膜融合タンパク質によって媒介されるが、これらのタンパク質は宿主細胞内で前駆体として合成され、宿主プロテアーゼによる特定部位の開裂を受けることで初めて感染性を獲得する。したがって、膜融合タンパク質の開裂活性化はウイルス感染成立の重要な過程の一つであり、宿主がもつプロテアーゼがウイルスの組織指向性や病原性を規定する主要な宿主因子の一つであることが明らかになっている(1)。

呼吸器ウイルスにおいて、II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ (type II transmembrane serine protease: TTSP) の一つである TMPRSS2 が、インフルエンザウイルス、コロナウイルス、パラミクソウイルスなど複数のウイルスの膜融合タンパク質を活性化することを、細胞実験(2-8)および動物モデル(9-11)により示してきた。実際に、私たちの研究チーム(9)ならびに海外研究グループ(12,13)により、TMPRSS2 欠損マウスではインフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) タンパクの開裂が障害され、ウイルス増殖が著しく低下して病原性がほぼ消失することが示されている。さらに、2003-2004 年に流行した SARS-CoV-1 および 2013 年以降中東地域で流行を繰り返している MERS-CoV においても、TMPRSS2 欠損マウスで増殖性が著しく低下することを明らかにし(11)、TMPRSS2 が呼吸器ウイルス感染症の重要な病原因子であることを示してきた。加えて、申請者らは SARS-CoV-2 流行初期に、TMPRSS2 発現 VeroE6 細胞を用いることで SARS-CoV-2 を効率的に分離培養できることを示し、その後の研究および対策に大きく貢献した(6)。さらにマウスモデルにおいて、TMPRSS2 が SARS-CoV-2 の呼吸器増殖およ

び病態発現に重要であることも明らかにしている(10)。

しかし、これらの知見の多くは自然宿主ではない動物（マウス）モデルや株化培養細胞を用いた実験系に基づくものであり、生体内の感染成立機構をどこまで反映しているかは十分に明らかではなかった。さらに、SARS-CoV-2 流行過程において TMPRSS2 利用能の低いオミクロン株がヒト集団で急速に拡大した事実は、TMPRSS2 が必須因子であるという従来の理解と整合しない可能性を示した。すなわち、ヒト呼吸器感染症における TMPRSS2 の役割の程度や、TMPRSS2 以外の複数のプロテアーゼの関与が示唆されたが、その全体像は明らかではなかった。

本研究ではこれらの課題を明らかにするため、(1) 自然宿主動物感染モデル、(2) ヒト組織環境を模倣した iPS 細胞由来呼吸器オルガノイドの二つの系を用いて解析を行い、呼吸器ウイルス感染成立における TMPRSS2 の役割を再評価するとともに、他の宿主プロテアーゼを含めた感染成立機構の体系的理解を目的とした。

方法

本研究では、呼吸器ウイルス感染成立における宿主プロテアーゼ TMPRSS2 の役割を検証するため、自然宿主動物感染モデルとヒト呼吸器オルガノイドモデルの二つの実験系を用いて解析を行った。

まず自然宿主における役割を評価するため、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスを用いた感染実験を実施した。ウイルスとして、マウスを自然宿主とする致死性呼吸器ウイルスであるセンダイウイルスおよびマウス肺炎ウイルスを用いた。これらはそれぞれ膜融合タンパク質の開裂部位に単塩基性モチーフおよび多塩基性モチーフを有しており、宿主プロテアーゼ依存性の異なるモデルとして選択した。既報のインフルエンザウイルス研究でも、単塩基性モチーフを持つウイルスでは TMPRSS2 依存的に病態が成立する一方、多塩基性モチーフを有するウイルスではフーリンなどのプロプロテインコンバーターゼを利用することで TMPRSS2 非依存的に感染が成立することを示している(9, 10)。

各ウイルスを経鼻感染させ、体重変化および生存率を指標として病原性を評価した。さらに気管支肺胞洗浄液および肺組織を採取し、プラークアッセイによりウイルス増殖量を測定した。肺組織については病理組織学的解析および免疫組織化学染色を行い、感染細胞分布と炎症病変の進展を評価した。また、肺組織抽出物を用いて免疫沈降および免疫ブロット解析を行い、膜融合タンパク質の開裂状態を定量解析した。

次にヒト呼吸器組織環境における役割を検証するため、ヒト iPS 細胞由来呼吸器オルガノイドを用い、さらに CRISPR-Cas9 法により TMPRSS2 遺伝子ノックアウト呼吸器オルガノイドを作製した。野生型オルガノイドと KO オルガノイドに複数の SARS-CoV-2 株（初期株および各種変異株）を感染させ、培養上清および細胞内のウイルス RNA 量をリアルタイム RT-PCR で定量し増殖能を比較した。さらにセリンプロテアーゼ阻害剤およびカテプシン阻害剤を用いた阻害試験を行い、感染成立に寄与するプロテアーゼ経路を解析した。加えて免疫蛍光染色および組織学的解析によりウイルス抗原局在を評価した。補助的に、VeroE6/TMPRSS2 細胞および肺上皮由来 Calu-3 細胞を用いた感染実験と膜融合活性評価系を行い、各ウイルス株のプロテアーゼ利用特性と膜融合能を比較解析した。

以上の実験系を統合することで、自然宿主個体、ヒト組織様構造、および培養細胞の各階層における

TMPRSS2 および関連プロテアーゼの寄与を多面的に評価した。

結果

1. 自然宿主感染モデルにおける TMPRSS2 の役割

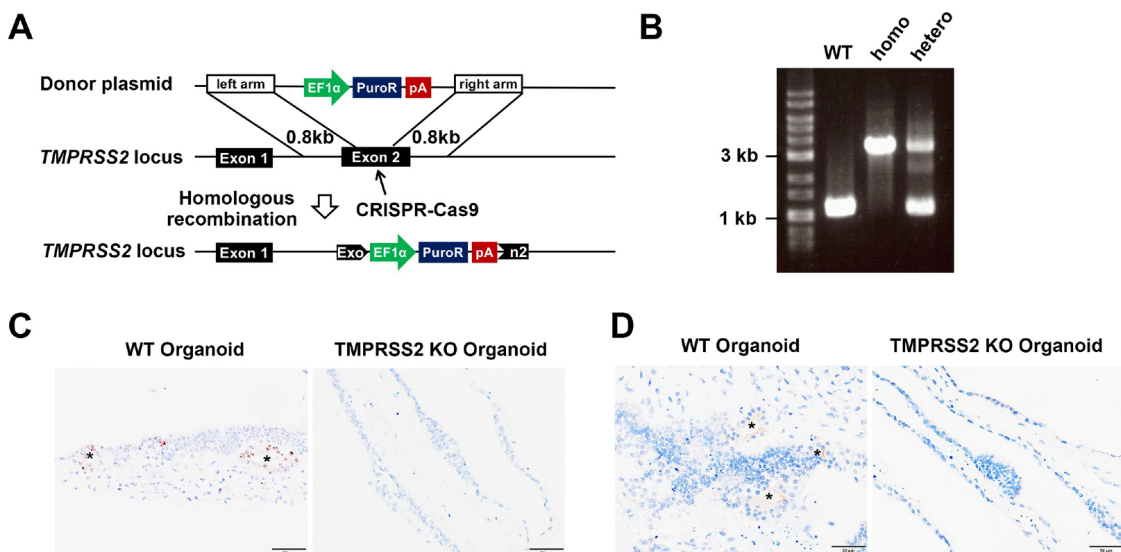
まず TMPRSS2 の生体内での役割を明確にするため、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスを用いた自然宿主感染モデルを解析した。センダイウイルス感染では、野生型マウスに顕著な体重減少と高い致死率が認められたのに対し、TMPRSS2 欠損マウスでは病態が著しく軽減し、致死量は 100 倍以上上昇した。肺組織では、野生型マウスにおいて気管支周囲炎症が肺泡領域へ進展し、ウイルス抗原陽性細胞が時間依存的に増加したが、欠損マウスでは感染拡大が抑制された。感染後期のウイルス量も野生型で顕著に高値を示し、TMPRSS2 が感染増幅に重要であることが示された (Kitai et al. submitted)。

さらに肺組織中の膜融合タンパク質を解析したところ、野生型では開裂型が優位であったのに対し、欠損マウスでは開裂効率が低下していた。以上より、単塩基性開裂モチーフを有する呼吸器ウイルスでは、自然宿主環境においても TMPRSS2 が膜融合タンパク質の活性化および病原性発現に必須であることが示された (Kitai et al. submitted)。

一方、多塩基性開裂モチーフを持つマウス肺炎ウイルスでは、膜融合タンパク質の開裂は TMPRSS2 欠損の影響を受けなかった。病原性およびウイルス増殖は軽度低下したものの、センダイウイルスほど顕著な差は認められなかった。すなわち、開裂モチーフの性質によって TMPRSS2 依存性が規定されることが、自然宿主動物モデルにおいても確認された (Kitai et al. submitted)。

2. ヒト呼吸器組織モデルにおける感染機構

次にヒト呼吸器環境における感染成立機構を検証するため、iPS 細胞由来呼吸器オルガノイドを用いて解析を行った (下図: 引用論文 3 より © American Society for Microbiology. 許可を得て使用)。



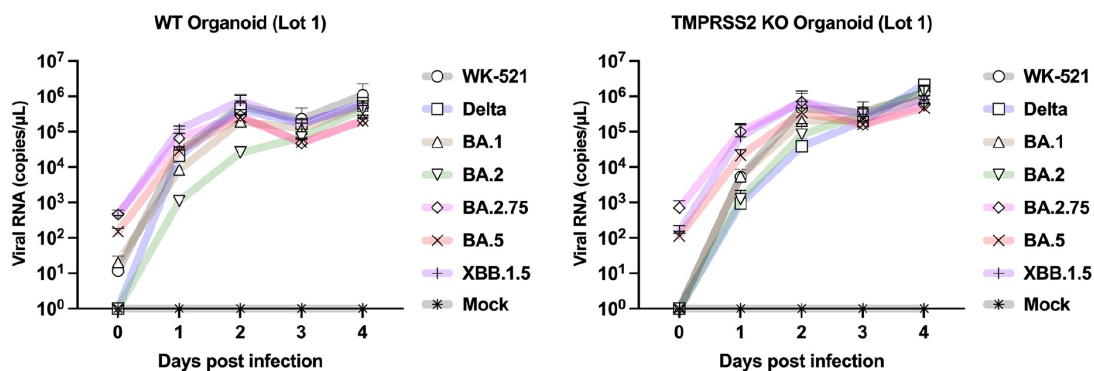
(A) TMPRSS2遺伝子座の標的化戦略の模式図。ドナープラスミド：EF1 α （elongation factor 1 alphaプロモーター）、PuroR（プエロマイシン耐性タンパク質）、pA（ポリアダニル化配列）。

(B) ジェノタイピング。

(C) RNA in situハイブリダイゼーション。TMPRSS2 mRNAを示す代表画像。標的シグナルは3,3'-ジアミノベンジジン（DAB；茶色）で可視化し、対比染色としてヘマトキシリンを用いた。アスタリスクは腺様構造を示す。スケールバー：50 μ m。

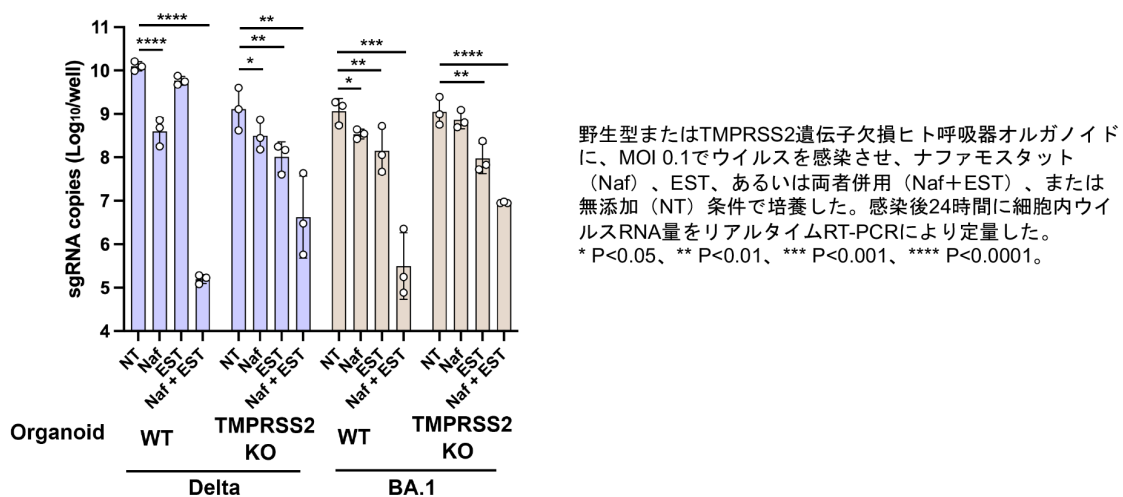
(D) 免疫組織化学染色。TMPRSS2抗原を示す代表画像。標的シグナルはDAB（茶色）で可視化し、対比染色としてヘマトキシリンを用いた。アスタリスクは腺様構造を示す。スケールバー：50 μ m。

TMPRSS2 遺伝子ノックアウトオルガノイドに複数の SARS-CoV-2 株を感染させたところ、すべての株が TMPRSS2 非存在下でも効率的に増殖した。すなわち、ヒト呼吸器組織において TMPRSS2 は感染成立の必須因子ではないことが示された（下図：引用論文 3 より © American Society for Microbiology. 許可を得て使用）。



野生型 (WT) およびTMPRSS2欠損 (KO) ヒト呼吸器オルガノイド (ロット1) に、MOI 0.1でウイルスを感染させた際の増殖動態。培養上清中のウイルスRNAコピー数を感染後1、2、3、4日目に定量した。エラーバーは3つの生物学的反復の標準偏差を示す。平均値は正の標準偏差とともに表示した。

一方、セリンプロテアーゼ阻害剤の抗ウイルス効果は TMPRSS2 欠損下で低下し、さらにカテプシン阻害剤を併用することで感染が著明に抑制された。これらの結果は、ヒト呼吸器組織では TMPRSS2 単独ではなく、他のセリンプロテアーゼおよびカテプシンを含む複数のプロテアーゼが協調して感染成立を支えていることを示している。また、SARS-CoV-2 変異株間でプロテアーゼ利用様式が変化し得ることも確認された（下図：引用論文 3 より © American Society for Microbiology. 許可を得て使用）。



野生型またはTMPRSS2遺伝子欠損ヒト呼吸器オルガノイドに、MOI 0.1でウイルスを感染させ、ナファモスタット (Naf)、EST、あるいは両者併用 (Naf+EST)、または無添加 (NT) 条件で培養した。感染後24時間に細胞内ウイルスRNA量をリアルタイムRT-PCRにより定量した。
* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001。

考察

これまで **TMPRSS2** は多くの呼吸器ウイルスに共通する主要な活性化プロテアーゼとして位置付けられてきたが、その多くは非自然宿主モデルや株化培養細胞を中心とした解析に基づく知見であった。本研究では、自然宿主感染モデルとヒト呼吸器オルガノイドを組み合わせることで、**TMPRSS2** の役割を生体条件に近い環境で再検証した点に意義がある。

自然宿主であるマウスに感染するセンダイウイルスでは、**TMPRSS2** 欠損により病原性とウイルス増殖が著しく低下し、膜融合タンパク質の開裂効率も低下した。すなわち、単塩基性開裂モチーフを有する呼吸器ウイルスでは、自然感染環境においても **TMPRSS2** が感染増幅の主要決定因子として機能することが確認された。一方、多塩基性開裂モチーフを持つマウス肺炎ウイルスでは膜融合タンパク質の開裂は **TMPRSS2** に依存せず、病原性への影響も限定的であった。この結果は、ウイルス側の開裂モチーフ構造が宿主依存性を規定することを示しており、インフルエンザウイルス高病原性株の全身感染機構とも整合する。すなわち、**TMPRSS2** は呼吸器特異的感染性を成立させる分子基盤の一つと考えられる。

SARS-CoV-2 については、マウスモデルでは **TMPRSS2** が主要な増殖因子の一つとして機能する一方(10)、ヒト呼吸器オルガノイドでは **TMPRSS2** 欠損下でも効率的に増殖し、感染成立そのものには必須ではなかった(3)。しかし **TMPRSS2** 欠損オルガノイドではセリンプロテアーゼ阻害剤の抑制効果が低下したことから、**TMPRSS2** 利用は感染効率の向上に寄与していると考えられた。さらにカテプシン阻害剤との併用により感染が強く抑制されたことから、ヒト呼吸器組織では複数のプロテアーゼ経路が並列的に働き、代替可能な侵入経路を形成していることが示唆された。すなわち、ヒト組織ではより多様な感染機構が成立していると考えられる。

この知見は **SARS-CoV-2** 変異株の流行動態も説明する。オミクロン株で **TMPRSS2** 利用能が低下しても感染拡大が成立したのは、代替プロテアーゼ経路によって感染が維持されたためと解釈できる。また、その後の亜系統で **TMPRSS2** 利用能が再び増加したことは、感染効率および伝播性の最適化に宿主プロテアーゼ利用が関与する可能性を示している。

以上より、**TMPRSS2** は呼吸器ウイルス感染における重要な宿主プロテアーゼの一つであり、実際に共同研究において **TMPRSS2** に対する抗体医薬が病態軽減に寄与し得る可能性も示された(14)。一方で、ヒト呼吸器感染症では単一プロテアーゼへの依存ではなく、複数プロテアーゼネットワークにより感染が成立していると考えられる。この理解は宿主プロテアーゼ標的型抗ウイルス戦略の再評価を促し、単一酵素阻害では効果が限定的となる可能性と同時に、複数経路を同時に制御することで広域的抗ウイルス効果が得られる可能性を示すものである。

本研究に関連して、**RS** ウイルスやコロナウイルスの研究にも一部寄与しており(15–19)、インフルエンザウイルス **HA** 開裂配列の意義、**RS** ウイルス膜融合タンパク質活性化における **TMPRSS2** の役割、コロナウイルス増殖に関わる新たな分子基盤についても知見が得られている。現在、論文化に向けて追加解析を進めており、今後順次公表する予定である。

本研究では、自然宿主感染モデルとヒト **iPS** 細胞由来呼吸器オルガノイドという相補的な実験系を用いて、呼吸器ウイルス感染成立における宿主プロテアーゼ **TMPRSS2** の役割を体系的に解析した。その結果、単塩基性開裂モチーフを有する呼吸器ウイルスにおいては、自然宿主環境においても **TMPRSS2** が

膜融合タンパク質の活性化と病原性発現に重要な役割を果たすことが明確に示された。一方、ヒト呼吸器組織を模倣したオルガノイドでは、SARS-CoV-2はTMPRSS2欠損下でも増殖可能であり、カテプシンなど複数のプロテアーゼ経路が代替的に機能することが明らかとなった。

すなわち、呼吸器ウイルス感染は単一宿主因子への依存ではなく、ウイルス側の開裂モチーフ構造と宿主組織環境に応じて複数のプロテアーゼ経路が選択的に利用されることが示された。本研究は、これまで主として動物モデルや培養細胞系に基づいて理解されてきたTMPRSS2の役割を、生体条件に近い環境で再定義した点に意義がある。さらに、TMPRSS2に対する抗体による感染抑制効果も確認され、宿主プロテアーゼを標的とした抗ウイルス戦略の有効性が支持された。

以上より、呼吸器ウイルス感染症の病態は単一の侵入経路では説明できず、複数プロテアーゼによる冗長的な侵入機構によって成立していることが示唆された。この知見は、変異株の感染性変化の理解に資するとともに、宿主因子を標的とした新たな治療・予防法の設計に重要な基盤を与えるものである。

共同研究者

柿崎正敏	国立健康危機管理研究機構	国立感染症研究所	呼吸器系ウイルス研究部
白戸憲也	国立健康危機管理研究機構	国立感染症研究所	呼吸器系ウイルス研究部
永田典代	国立健康危機管理研究機構	国立感染症研究所	感染病理部
鈴木忠樹	国立健康危機管理研究機構	国立感染症研究所	感染病理部
小川道永	国立健康危機管理研究機構	国立感染症研究所	細菌第一部
高山和雄	東京科学大学総合研究院難治疾患研究所	人体模倣システム学分野	
坂口剛正	広島大学大学院医系科学研究科	ウイルス学講座	
前仲勝実	北海道大学大学院薬学研究院	創薬科学研究教育センター	

引用論文

1. Takeda M. Cleavage-activation of respiratory viruses - Half a century of history from Sendai virus to SARS-CoV-2. *Jpn J Infect Dis* 2024. 77:1-6.
2. Abe M, Tahara M, Sakai K, et al. TMPRSS2 Is an Activating Protease for Respiratory Parainfluenza Viruses. *J Virol* 2013. 87:11930-5.
3. Kakizaki M, Hashimoto R, Nagata N, et al. The respective roles of TMPRSS2 and cathepsins for SARS-CoV-2 infection in human respiratory organoids. 2025. *J Virol* 99:e0185324.
4. Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, et al. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. 2015. *J Virol* 89:5154-8.
5. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, et al. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. 2010. *J Virol* 84:12658-64.
6. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020. 117:7001-7003.

7. Sakai K, Ami Y, Nakajima N, et al. TMPRSS2 Independency for haemagglutinin cleavage in vivo differentiates influenza B virus from influenza A virus. 2016. *Sci Rep* 6:29430.
8. Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, et al. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. 2008. *J Virol* 82:8942-6.
9. Sakai K, Ami Y, Tahara M, et al. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. 2014. *J Virol* 88:5608-16.
10. Iwata-Yoshikawa N, Kakizaki M, Shiwa-Sudo N, et al. Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways. 2022. *Nat Commun* 13:6100.
11. Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, et al. TMPRSS2 Contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. 2019. *J Virol* 93.
12. Hatesuer B, Bertram S, Mehnert N, et al. Tmprss2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice. *PLoS Pathog* 2013. 9:e1003774.
13. Tarnow C, Engels G, Arendt A, et al. TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. 2014. *J Virol* 88:4744-51.
14. Harada M, Matsumoto T, Yamamoto M, et al. Monoclonal antibodies against human TMPRSS2 prevent infection by any SARS-CoV-2 variant. *iScience* 2025. 28:113424.
15. Hashimoto R, Watanabe Y, Keshta A, et al. Human iPS cell-derived respiratory organoids as a model for respiratory syncytial virus infection. 2025. *Life Sci Alliance* 8:e202402837.
16. Kitai Y, Watanabe O, Ohmiya S, et al. Detailed analysis of low temperature inactivation of respiratory syncytial virus. 2024. *Sci Rep* 14:11823.
17. Kitai Y, Kojima S, Aishajiang A, et al. Changes in ORF4 of HCoV-229E under different culture conditions. 2025. *J Gen Virol* 106:002131.
18. Yamagata Y, Toizumi M, Eleouet JF, et al. Improved RSV neutralization assay using recombinant RSV expressing reporter fluorescent protein. 2025. *Methods Protoc* 8:60.
19. Toizumi M, Yamagata Y, Nguyen HAT, et al. Cord blood RSV-neutralizing antibodies and risk of hospitalization for RSV-associated acute respiratory infection in Vietnamese children: A case-cohort study. 2025. *Vaccines (Basel)* 13:963.

助成研究に関連した発表論文

1. Kakizaki M, Hashimoto R, Nagata N, et al. The respective roles of TMPRSS2 and cathepsins for SARS-CoV-2 infection in human respiratory organoids. *J Virol* 2025. 99:e0185324.
2. Kitai Y, Kojima S, Aishajiang A, et al. Changes in ORF4 of HCoV-229E under different culture conditions. *J Gen Virol* 2025. 106:002131.
3. Harada M, Matsumoto T, Yamamoto M, et al. Monoclonal antibodies against human TMPRSS2 prevent infection by any SARS-CoV-2 variant. *iScience* 2025. 28:113424.

4. Hashimoto R, Watanabe Y, Keshta A, et al. Human iPS cell-derived respiratory organoids as a model for respiratory syncytial virus infection. *Life Sci Alliance* 2025. 8:e202402837.
5. Yamagata Y, Toizumi M, Eleouet JF, et al. Improved RSV neutralization assay using recombinant RSV expressing reporter fluorescent protein. 2025. *Methods Protoc* 8:60.
6. Toizumi M, Yamagata Y, Nguyen HAT, et al. Cord blood RSV-neutralizing antibodies and risk of hospitalization for RSV-associated acute respiratory infection in Vietnamese children: A case-cohort study. *Vaccines (Basel)* 2025. 13:963.
7. Kitai Y, Watanabe O, Ohmiya S, et al. Detailed analysis of low temperature inactivation of respiratory syncytial virus. *Sci Rep* 2024. 14:11823.