

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07719

研究課題名(和文)ネコモルビリウイルスの病原性と感染機序の解明

研究課題名(英文)Study of pathogenesis and infection mechanism of feline morbillivirus

研究代表者

古谷 哲也 (Furuya, Tetsuya)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60647676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ネコモルビリウイルス(FeMV)は2012年に発見された新しいウイルスで、ネコにおける慢性腎炎への関与が注目されている。我々は、好感度リアルタイムRT-PCRと抗-FeMV抗体検出診断システムの開発を行い、日本国内ネコの尿中FeMVウイルスRNAと血漿中抗FeMV抗体陽性率が、それぞれ、15.1%と22%であることを発見した。腎臓病ネコの腎臓病理切片と抗-FeMV抗体による免疫染色を用いFeMV感染と腎臓病変の関係を調べたところ、尿細管組織萎縮との強い相関がみられた。FeMV局在がほぼ尿細管に限定されていたことも合わせ、今回の研究結果は、FeMVの感染とネコの腎臓病の関係を強く示唆した。

研究成果の概要(英文)：Feline morbillivirus is a new virus species discovered in 2012 and is potentially involved in chronic kidney disease in cats. We developed a real-time RT-PCR and anti-FeMV antibody detection systems, and demonstrated that positive rates of FeMV RNA in urines and anti-FeMV antibody in plasma samples from cats in Japan were 15.1 and 22 %, respectively. We studied association between FeMV and pathological lesions in cat kidney tissues from the ones with kidney diseases, using immunohistochemistry with the anti-FeMV antibody, and found a strong association between detection of FeMV antigen and tubular atrophy in the kidney tissues. Together with the finding that FeMV was localized only on renal tubular tissues, this study suggests strong association between FeMV infection and tubular nephritis in cats.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ネコモルビリウイルス ウイルス検査 病原性 慢性腎臓疾患 病理組織 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

(1) ネコモルビリウイルス (FeMV) は 2012 年に香港で初めて発見された非常に新しいウイルスであるが (引用文献 1)、症例対照研究において、FeMV 感染と尿細管間質性腎炎の関係性が示唆されたため、特に高齢において慢性腎炎の罹患率が非常に高いイエネコにおける、腎炎発症性因子の可能性から注目された。また、FeMV の発見まで、モルビリウイルス属、あるいは上位のパラミクソウイルス科においても、イエネコに病原性を持つウイルスが発見されておらず、そのような初例としても注目された。

(2) 香港における FeMV の最初の報告に次ぎ、申請者によって日本国内のネコから FeMV が検出され (引用文献 2)、その後、他国からの検出も報告されたが (引用文献 3)、FeMV の病原性についての報告は少なく、特に FeMV による疾患機序については、ほとんど知られていなかった。また、FeMV の検出と診断方法についても、初報における RT-PCR 法で用いられたプライマーでは、多くの日本株の検出は行えず、より一般的な FeMV 検出と診断の方法が望まれていた。

2. 研究の目的

FeMV はこれまでの報告では尿細管間質性腎炎との関係が示唆されており、高齢ネコにおいて慢性腎疾患が大きな問題であるが、これまで、その病原性と疾患機序についてはほとんど知られていない。また、診断や研究のための FeMV 検出法は確立されておらず、簡便な検出手法が望まれている。このため本研究では、下記を目的として、ネコの慢性腎炎の治療と予防への重要な貢献を目指す。

(1) 申請者研究室で検出した FeMV ゲノム塩基配列を用いて設計した定量 RT-PCR と、大腸菌によって発現・精製を行った組み換え FeMV 抗原を用いて、FeMV ウイルス RNA と抗-FeMV 抗体の検出系の開発を行い、実際のネコ検体を用いてそれらの有用性を確認する。

(2) ネコの腎臓組織切片を用い、上記発現抗原を用いて作製した抗-FeMV 抗体による免疫染色を行い、詳細な病理所見との比較による統計的解析により、FeMV 感染と腎臓病変の関係性を調べる。

(3) 分離ウイルスにより異なった培養細胞、あるいは SPF ネコにおける FeMV 感染を行い、FeMV の病原性を調べる。また、FeMV の宿主レセプター分子の同定を行い、FeMV の病原性機序の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) ネコ尿サンプル

ネコ尿サンプルは日本国内の獣医クリニックから提供いただいた。患者情報は全て匿名とした。

(2) 新たな FeMV 株の全ゲノム配列解析

ネコの尿サンプルより検出された FeMV ゲノム RNA により、MiSeq (Illumina) を用いた次世代シーケンシングによって、新たな FeMV 日本株 (76 株) の全ゲノム配列を解析した。

(3) 定量 RT-PCR

本課題開始時に報告されていた FeMV 日本株 6 株ゲノムの L 遺伝子配列をもとに設計したプライマーとプローブを用いたハイブリダイゼーション法により行った。スタンダード DNA は上記 PCR 産物を含む L 遺伝子配列をクローニングした DNA プラスミドを用いた。

(4) FeMV N、P 遺伝子、イヌジステンパーウイルス (CDV) P 遺伝子の発現による大腸菌による発現と精製、抗体検出 ELISA、特異抗体の作製 (上記 1) において得られた配列情報を元に、クローニングした N 及び P 遺伝子を、大腸菌発現プラスミド (pGEX4T-1) に挿入し、大腸菌 BL-21 (DE3) 株を形質転換し、IPTG による発現誘導により、GST 融合蛋白質発現を行った。発現蛋白質はグルタチオンビーズによって精製された。精製 P 蛋白質は ELISA プレートに吸着され、ネコ血漿と二次抗体 (抗-ネコ IgG HRP 抗体) 反応後、TMB 基質による発色を行った。精製 P 蛋白質により委託業者 (Sigma Aldrich) がウサギ免疫を行い、抗血清を作製した。

(5) 腎臓組織切片の作製と免疫染色

腎臓病ネコから得た腎臓組織を用い、ホルマリン固定パラフィン包埋を行い、マイクロトームによる切片作製を行った。切片はキシレンによる脱パラフィンの後、クエン酸緩衝液 (pH 6) 中でのオートクレーブにより抗原回復を行った。切片は上記で作製した抗-FeMV 抗体と反応を行い、2 次抗体と基質 (DAB、和光純薬) によって発色を行った (Envision solution、Dako)。

(6) 培養細胞への FeMV 接種

ネコ尿検体は 450 nm のフィルターを通し、トリプシン (0.1 µg/ml) で 37 °C 15 分間処理した後、CRFK 細胞に接種し、一晚感染を行った。感染細胞は DMEM で洗浄し、2% FCS を含む DMEM 中で培養を行った。細胞は CPE の観察を行い、定期的に定量 RT-PCR によって FeMV RNA の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 新たな FeMV 株の全ゲノム配列解析

定量 RT-PCR によって FeMV が検出されたネコ尿サンプル (検体番号 76) から抽出された FeMV ゲノム RNA により cDNA を作製し、次世代シーケンサーによって全塩基配列を決定した。系統樹解析により、この 76 株はい

くつかの日本検出株(ChJP073, MiJP003, SS3)に最も近縁である事が分かった(図1)

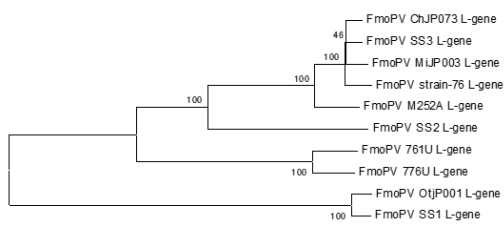


図1 . FeMV 76株 L 遺伝子配列の系統樹解析

(2) 定量 RT-PCR による FeMV の検出
高感度かつ定量的な FeMV ゲノム RNA の検出のための定量 RT-PCR を構築した。ハイブリダイゼーション法による検出のため、日本国内の検出株 6 株の L 遺伝子配列をもとに、プライマーとプローブを設計し、プライマー増幅配列(121 bp)を含む遺伝子配列(401 bp)をクローニングしたプラスミドを用いてコピー数の測定を行った(図2)。これにより、この定量 RT-PCR は、10 コピー程度のゲノム cDNA の検出を行うことができることが分かった。また、これまでに用いられてきたゲル検出による RT-PCR に比べ、10 倍の感度を持つことも分かった(結果省略)。そこで、既に報告済みの 82 サンプルを含む、166 のネコ尿サンプルをこの検出系に用いたところ、既に報告した陽性サンプルを含む 15.1% (25/166) の陽性サンプルが検出され、以前に報告された陽性率(6.1%)より高いことが分かった。

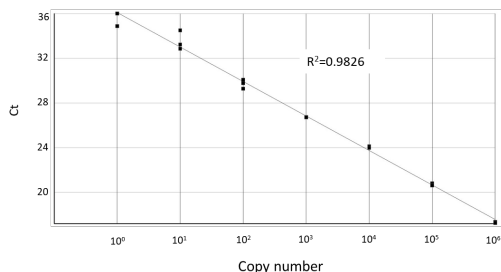


図2 . 定量 RT-PCR の検出感度

(3) 組み換え FeMV N、P 蛋白質の発現と精製

上記に塩基配列を決定した 76 株の配列をもとに、FeMV N 及び P 遺伝子 ORF を PCR 増幅し、GST 融合蛋白発現ベクター pGEX4T-1 にクローニングした。

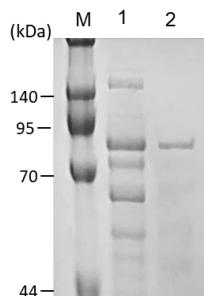


図3 . 精製 FeMV P 蛋白質

N 遺伝子と P 遺伝子はそれぞれクローニングと発現を行ったが、N 遺伝子の発現は見られなかったため、P 遺伝子の精製を行った(図3、1.大腸菌総蛋白質、2.GST 精製蛋白質)。この精製 P 蛋白質を用い、抗 FeMV P 蛋白質抗体検出のため、ELISA を構築した。

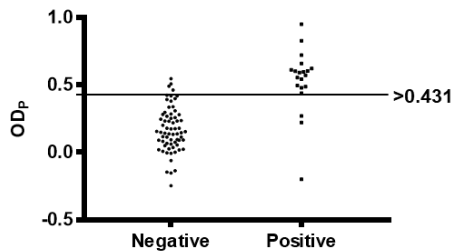


図4 . ELISA 閾値の設定

ELISA 閾値の設定のため、ネコ血漿 100 サンプルのウェスタンブロットングを行い、ELISA の OD 値との比較を行った(図4)。この結果を ROC 解析に用いて設定した閾値(0.431)により、良好な感度(85%)と特異性(94%)が得られることが分かった。この ELISA の検査の結果、22%の FeMV 抗体がネコ血漿検体から検出されることが分かった。また、イヌジステンパーウイルス(CDV)のウイルス抗原との交差反応を調べるため、同様の系で発現した V 領域以外の CDV P 蛋白質を用いて一部の血漿サンプルをウェスタンブロットングで検査したが、FeMV 陽性ネコ血漿の CDV 抗原に対する交差は見られなかった(結果省略)。

(4) ネコ腎臓組織切片を用いた FeMV 抗原の検出と腎臓病変との関連

ネコにおける FeMV 感染と腎臓病変の関連を調べるため、腎臓病ネコの腎臓組織を用い、抗 FeMV 抗体による免疫染色を行ったところ(図5)FeMV 陽性の多くの腎臓組織では尿細管上皮細胞への局在が見られ、移行上皮細胞への局在も一部で見られた。一方、腎臓系球体での局在は見られなかった。このような腎臓組織において見られる各種病変の強さを 4 段階で評価し、FeMV 陽性と陰性それぞれの群における分布を調べた。図6は、各組織部位の典型的な病変についての結果を示しているが、系球体硬化以外は系球体の病変と FeMV 陽性の間には相関は見られず、その一方で尿細管と間質性の病変の間には相関がみられた。

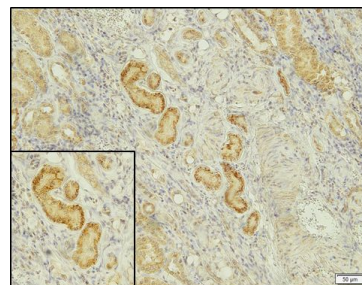


図5 . 抗 FeMV 抗体染色ネコ腎臓組織

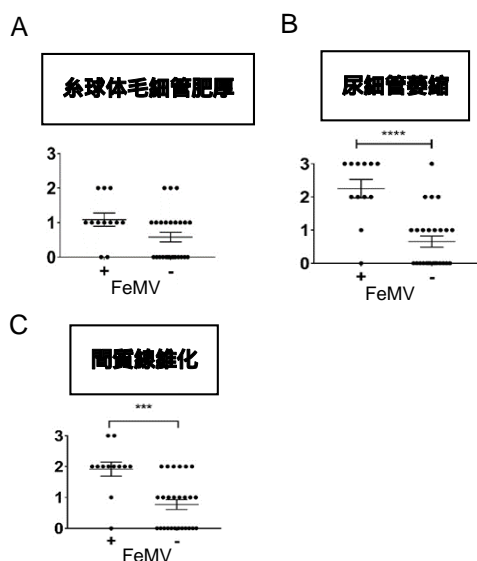


図6 . FeMV と腎臓病変の相関例

また、免疫複合体による組織障害を調べるため、ネコ IgG 抗体による染色も行ったが、抗体の糸球体中の局在と FeMV 陽性の相関は見られなかった。これらの結果と、FeMV の局在が、尿管と移行上皮に限られることを考え合わせると、今回の研究結果は、FeMV の腎臓組織中の感染と尿管、及び間質における病変の強い相関を示唆していた。

(5) FeMV の分離とネコ SLAM 発現細胞における感染について

定量 RT-PCR によって FeMV 陽性であったネコ尿検体を CRFK 細胞に接種を行ったが、2 か月間以上の培養によっても分離は成功しなかった。また、ネコ SLAM を発現ベクターをトランスフェクトした CRFK 細胞によっても FeMV の分離を試みたが、同様に成功しなかった。

< 引用文献 >

- 1 Woo et al., 2012. PNAS. 109:5435-5440.
- 2 Furuya et al., Arch Virol. 2014. 159:371-3. Epub 2013. Aug 9.
- 3 Sieg et al., 2015. Virus Genes. Oct;51(2):294-7.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

古谷 哲也、有川 夏穂、Kripitch Sutummaporn、井村ゆり、Mahmoud Helal、木村佑介、佐伯千春、町田登、和知亜紀子 猫モルビリウイルス研究の現状と課題 - 病原性の解明に向けて - 動物臨床医学 2017 第 26 巻 第 4 号 163-166 査読無し
Arikawa K, Wachi A, Imura Y, Sutummaporn K, Kai C, Park ES, Morikawa

S, Uematsu Y, Yamaguchi T, Furuya T. Development of an ELISA for serological detection of feline morbillivirus infection. Arch Virol. 2017. 162:2421-2425. 査読有
Furuya T, Morikawa S, Miyazawa T. Discovery and current research status of feline morbillivirus. Uirusu. 2016;66(2):147-154. 査読無し
Furuya T, Wachi A, Sassa Y, Omatsu T, Nagai M, Fukushima R, Shibutani M, Yamaguchi T, Uematsu Y, Shirota K, Mizutani T. Quantitative PCR detection of feline morbillivirus in cat urine samples. J Vet Med Sci. 2016 Jan;77(12):1701-3. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

Yuiko Hashizume, Kripitch Sutummaporn, Eun-sil Park, Shigeru Morikawa, Tetsuya Furuya, Cytopathogenicity of new isolates of feline morbillivirus from urine specimens of Japanese cats, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年

Kripitch Sutummaporn, Noboru Machida, Kazuhiko Suzuki, Eun-sil Park, Shigeru Morikawa, Tetsuya Furuya, Correlation between feline morbillivirus infection and pathological features in formalin-fixed kidney sections of cats, and cytokine responses in virus-infected tissues, 第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年

Yuri Imura, Tetsuya Furuya, Akiko Wachi, Mahmoud Atef Youssef Helal, Kripitch Sutummaporn, Kaho Arikawa, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Mizutani, Recent attempt of feline morbillivirus isolation, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日 ~ 25 日

有川夏穂、和知亜紀子、井村ゆり、山口智宏、植松洋介、古谷哲也、組み換え P 蛋白質を用いたネコモルビリウイルス検出系の開発、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6 日 ~ 8 日

井村ゆり、和知亜紀子、有川夏穂、Mahmoud Atef Youssef Helal、Kripitch Sutumaporn、古谷哲也、新たなネコモルビリウイルス株分離の試み、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6 日 ~ 8 日

和知亜紀子、井村ゆり、有川夏穂、山口智宏、植松洋介、古谷哲也、ネコモルビリウイルス遺伝子検査法の改良についての検討、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6 日 ~ 8 日

Kripitch Sutumaporn, Yusuke Kimura, Chiharu Saeki, Noboru Machida, Yuri

Imura, Akiko Wachi, Kaho Arikawa, Mahmoud Atef Youssef Helal, Tetsuya Furuya, Study of feline morbillivirus pathogenicity in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissues from cats with kidney diseases. 第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6 日 ~ 8 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 哲也 (FURUYA, Tetsuya)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：60647676

(2) 連携研究者

前田 健 (MAEDA, Ken)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：90284273

代田 欣二 (SHIROTA, Kinji)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号：70147974