

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101  
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
研究期間：2016～2019  
課題番号：15KK0291  
研究課題名（和文）リバーシジェネティクス法を用いたエボラウイルスの病原性解析（国際共同研究強化）  
  
研究課題名（英文）the study of pathogenicity of Ebola virus disease using reverse genetics system  
(Fostering Joint International Research)  
  
研究代表者  
津田 祥美 (TSUDA, YOSHIMI)  
  
北海道大学・医学研究院・講師  
  
研究者番号：70447051  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,700,000円  
渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：エボラウイルスの主要標的細胞がマクロファージや樹状細胞などの単核性食細胞系であるとされているが、これらの細胞が致命的病態にどのような役割を果たしているかは不明である。本研究ではマクロファージや樹状細胞での増殖が抑制された組換えウイルスを作出しマウスモデルにおける感染実験を行った。その結果、マウスに致命的な病原性を示す親株と異なり組換えウイルスでは病原性が減弱していることが確認された。さらに感染初期にマクロファージでのウイルス増殖を抑制することで全身臓器でのウイルス増殖を遅らせ、制御された免疫応答により誘導された獲得免疫がマウスの生存に重要である可能性が示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

エボラウイルス病はヒトやサルに重篤な出血熱を引き起こす人獣共通感染症である。2014年の大規模なアウトブレイク以後、ワクチンや治療薬の開発が進んでいるが、有効な治療薬や的確な対症療法の開発のための病原性の解明は喫緊の課題である。本研究の成果は、エボラウイルスの初期標的細胞とされていたマクロファージや樹状細胞での感染初期におけるウイルス増殖がその後の致命的病態にどのように関与し、宿主応答を誘導するかを示すものであり、メカニズム解明への一助となるとともに、今後の治療法開発などに非常に重要な知見を与えるものとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) such as macrophages and dendritic cells are early targets for Ebola virus (EBOV) infection. However, the pathobiological significance of EBOV replication to these cells is remaining unclear. Cellular tropism of viruses can be engineered through the insertion of cell-specific target sequences for microRNA in the viral genome. Using this mechanism, we generated recombinant mouse-adapted EBOV possessing a microRNA target sequence (MAEBOV-t) that microRNA is expressed predominantly in the MPS cells and evaluated pathogenicity of MAEBOV-t in mice model. MAEBOV-t showed significantly attenuated pathogenicity in infected mice. Analysis of virus propagation and immune response in infected mice suggest that efficient inhibition of virus replication in the first target cells suppress virus propagation in tissues as well as immune responses, resulting enabled to induce effective immune response for survival.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 病原性

## 1. 研究開始当初の背景

エボラウイルスはヒトや類人猿に、重篤な出血熱（致死率 60-90%）を引き起こす。エボラ出血熱は中央アフリカを中心に小規模のアウトブレイクを度々発生していたが、2014 年に西アフリカのギニア、リベリア、シエラレオネを中心に大規模なアウトブレイクが発生し、死者 1 万人を超す事態となり世界的な問題となった。また、エボラ出血熱を含むフィロウイルス感染症にはいまだ認可されたワクチンや治療法は存在しないために欧米を中心に研究段階であったワクチン、治療薬が試験的に使用された。実際に治験段階ではあるものの治療薬とともに的確な対症療法を受けた欧米の医師らの致死率は明らかに低く、的確な対症療法の重要性が確認されているなど、ワクチン開発とともに、感染症発生後に対処するためには治療薬や的確な対症療法は非常に重要であり、その必要性が再確認されることとなった。

申請者はこれまでエボラウイルスの主要標的細胞の役割に着目し解析を行ってきた。エボラウイルスに感染すると免疫抑制傾向、全身性炎症反応に加えて血液凝固系の破綻を起こし、全身性ショックにより死に至る。これまでの研究からエボラウイルスの主要標的細胞がマクロファージや樹状細胞などの単核性食細胞系であることが示された。しかしながらマクロファージや樹状細胞がエボラウイルス感染の致命的病態にどのような役割を果たしているか、また致命的病態にどのように関与しているのかは未だ不明である。

## 2. 研究の目的

これまでの研究において、エボラウイルスの致命的病原性におけるマクロファージや樹状細胞での増殖の重要性に着目し、microRNA のターゲティングを利用してマクロファージや樹状細胞での増殖が抑制されたウイルスを作出し、解析してきた。ヒトのマクロファージおよび肝細胞由来細胞株を用いた増殖比較実験において microRN の相補配列を組み込んだウイルスは元のウイルスと比較してマクロファージにおいて増殖が抑制されていること、更にマウス馴化株に感染したマウスは重篤な症状を示し致死に至ったのに対し、microRNA の相補配列を組み込んだマウス馴化株ウイルスを感染したマウスはほぼ全て生存する結果を得た（科学研究費補助事業 若手研究 B「リバースジェネティクス法を用いたエボラウイルスの病原性解析」）。

そこで本研究ではエボラウイルスの主要標的細胞とされるマクロファージや樹状細胞などに着目することにより、エボラウイルス感染症の重篤な症状を誘引する細胞内免疫応答、および出血熱の引き金となる血液凝固系因子の変動の誘因を解明することを目的とした。本課題は治療薬および有用な治療法の開発につなげる研究であり、最も危険なウイルス感染症の 1 つであるフィロウイルス感染症の治療法の開発へ繋がることが期待される。さらに本研究は、同様の症状を示す多くの出血熱意ウイルス感染症にも応用できる可能性が高く、治療薬開発後の応用も期待される。

日本国ではこれまで稼働している BSL4 施設はなかったが、2014 年のエボラウイルスのアウトブレイクなど近年高病原性感染症対策の必要性が高まり、2015 年によりやく国立感染症研究所の BSL 4 施設に稼働許可がおりた。しかしながら診断、検査が主目的であり、今後実際に BSL4 病原体が研究可能となるかは不明である。そのため、日本国内でエボラウイルスを含む BSL 4 病原体の研究がいまだ不可能である現状において、日本国内に所属する研究者が継続的に国際共同研究により海外の BSL 4 施設での経験を積み、密な共同研究体制を構築、継続することは日本のウイルス研究分野の発展においても重要である。本課題により、BSL4 病原体研究経験と国際的な連携を構築することによる日本の高病原性研究への貢献をもう一つの目的とした。

## 3. 研究の方法

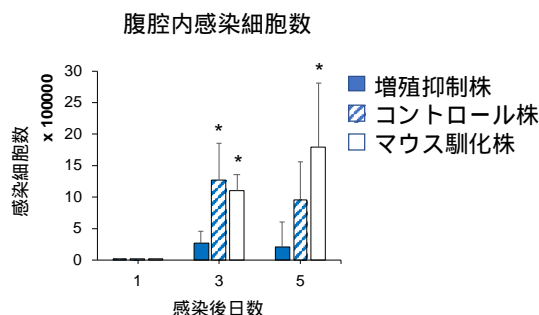
microRNA の相補配列を組み込んだウイルスは元のウイルスと比較してマクロファージにおいて増殖が抑制することを利用し、親株であるマウス馴化株と microRNA の相補配列を組み込んだウイルスをマウスに感染実験した。感染マウスにおける病原性、および感染時に誘導されるサイトカインやケモカインなどの宿主応答や免疫細胞を比較することで、致命的病態を誘導する鍵となる宿主因子を同定した。

1) 致命的病態を誘導するウイルス（マウス馴化株、およびコントロール配列を組み込んだマウス馴化株ウイルス：コントロール株）および致命的病態を引き起こさないウイルス（マクロファージや樹状細胞などの単核性食細胞系に多く発現している microRNA の相補配列を組み込んだマウス馴化株ウイルス：増殖抑制株）をそれぞれマウスに実験感染した。経過観察を行うとともに、感染 1、3、5 日後に各臓器サンプルを回収しウイルス増殖を比較した。

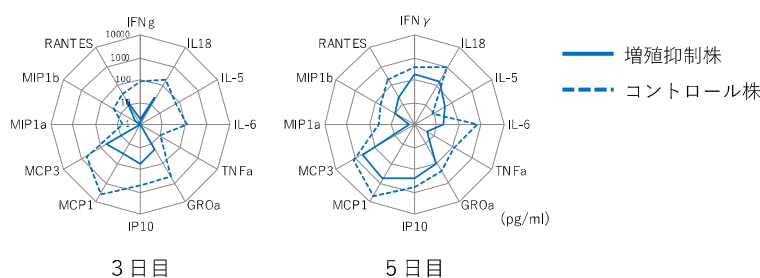
2) 1) で異なるウイルス増殖を示したマウスについて、血中および感染組織で誘導されているサイトカインやケモカインなどの宿主因子を経時的に測定し、異なる病態を誘導していると推測される宿主応答の検出を試みた。

#### 4. 研究成果

1) これまでの解析と同様に、マウス馴化株、機能性を持たないコントロール配列を組み込んだコントロール株、および microRNA の相補配列を組み込むことでマクロファージや樹状細胞での増殖を抑制した増殖抑制株をそれぞれマウスに腹腔内投与により感染させると、マウス馴化株およびコントロール株を感染させたマウスは感染後約一週間で致死的病態をしめす。その一方で、増殖抑制株を感染させたマウスの多くがほとんど症状を示さずに生残し、病原性が減弱していることを確認した。そこで感染マウスより各臓器サンプルを採材し、各主要標的臓器におけるウイルス増殖を比較した。血中ウイルス量、および肝臓、脾臓、腎臓の各臓器において増殖抑制株のウイルス量はマウス馴化株およびコントロール株に比べて有意に低いことが確認された。増殖抑制株感染マウスでは、5日目以降でもウイルス増殖は有意に抑制されており標的臓器における感染の広がりが抑制されていることがわかった。さらにウイルス接種部位である腹腔内におけるウイルス増殖を検討した。腹腔内マクロファージを回収し一定細胞数中のウイルス力価を調べたところ、マウス馴化株およびコントロール株を感染させたマウスでは感染の翌日よりウイルスが検出された。また、増殖抑制株と比較してマウス馴化株およびコントロール株を感染させたマウスでは顕著な感染細胞（感染した腹腔マクロファージ）の増加が確認された（右図）。すなわち、致死的病原性を示すエボラウイルスは、ウイルス感染部位で標的細胞であるマクロファージ細胞に感染して効率的に増幅することで、さらに感染したマクロファージが増加し、血液、リンパ組織などを通じて、全身臓器に感染が広がっている可能性が示唆された。



2) 次に、血中サイトカインおよびケモカインの測定を試みた。感染後1日目ではどのマウスにおいても優位な血中サイトカインおよびケモカインの上昇は確認されなかった。マウス馴化株およびコントロール株を感染させたマウスでは感染3日目より特に IP10 (CXCL10)、Monocyte chemoattractant Protein (MCP-1, MCP-3) や Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1a, MIP-1b) などのケモカインの誘導が確認され、マクロファージや単球に強い誘導がかかっていることがわかった。さらに5日目には測定したほとんどのサイトカイン、ケモカインの強い誘導が確認され、感染末期におけるサイトカインストームの誘導が推察された（下図）。一方で増殖抑制株を感染させたマウスでは、感染3日目では非感染対照群と比較して有意なサイトカインやケモカインの誘導は確認されなかったが、ウイルス増殖の確認された感染5日目、7日目にはマウス馴化株やコントロール株感染マウスで確認されたのと同様のケモカインが遅れて誘導されていることが確認された。



また臓器におけるケモカイン誘導を調べたところ、血中サイトカインと同様に、マウス馴化株やコントロール株を感染させたマウスでは感染3日目に、増殖抑制株では5日目から炎症性サイトカイン、ケモカインが誘導されていることがわかった。さらに感染脾臓細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果、増殖抑制株を感染させたマウスではウイルス接種後7日目に CD8 + T 細胞が増加傾向にあることがわかった。これらの結果より、増殖抑制株を感染させたマウスでは、感染初期に腹腔内で初期標的細胞であるマクロファージにおけるウイルス増殖が抑制されたことで、全身の標的臓器へのウイルスの伝播、およびそれに伴って誘導される全身性炎症反応が遅延したことで、マウスの生残に重要である獲得免疫への誘導が可能となった可能性が示唆された。これらの結果はエボラウイルスの感染初期における標的細胞での増殖の重要性を確認するものであるとともに、これらの細胞での増殖を効率的に抑制することで致死的病態から治療できる可能性を示すものである。

本課題の成果は、エボラウイルスの致死的病態に関連する因子の解明へ重要な知見となると期待される。しかしながら本研究では、もう一つの重要な致死的因子である血液凝固系の破綻のメカニズムを解析するに至らなかった。今後は、宿主免疫応答とともに血液凝固系因子についても解析を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshimi Tsuda, Shelly Robertson, Kimberly Meade-White, Brandi Williamson, Jiro Arikawa, Sonja Best, Hideki Ebihara
2. 発表標題 The role of viral replication in macrophages for pathogenesis of Ebola virus infection
3. 学会等名 9th International Symposium on Filoviruses (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshimi Tsuda, Shelly Robertson, Kimberly Meade-White, Brandi Williamson, Jiro Arikawa, Sonja Best, Hideki Ebihara
2. 発表標題 The role of viral tropism in macrophages in pathogenesis of Ebola virus disease
3. 学会等名 The 65th Annual meeting of the Japanese society of Virology
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ベスト ソニア  (Best Sonja)	国立衛生研究所 ロッキーマウンテン研究所・Laboratory of Virology, IIP unit・Principal investigator	