

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15039

研究課題名(和文)慢性腎不全と関連する猫モルビリウイルスの病原性発現機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the pathological mechanisms of feline morbillivirus associated with chronic renal failure

研究代表者

宮沢 孝幸 (Miyazawa, Takayuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80282705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで猫の腎炎とウイルスの関係に注目した研究はほとんどなかった。しかし、2012年に香港で尿細管間質性腎炎と関連するネコモルビリウイルス(FeMV)が発見された。FeMVはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に分類されるウイルスで、猫の尿や糞便から検出されている。アジア、ヨーロッパ、アメリカの様々な国でFeMVの検出がなされていることから、同ウイルスは世界中に広まっていると考えられている。しかし、その一方でこのウイルスの病原性発現機構は不明である。そこで本研究においては、FeMV感染時の宿主の免疫応答に着目し、FeMV感染とウイルス性腎炎の関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

研究成果の概要(英文)：There have been few studies focusing on the relationships between cat nephritis and virus infections. However, feline morbillivirus (FeMV) associated with tubulointerstitial nephritis was discovered in Hong Kong in 2012. FeMV is classified as a member of Family Paramyxoviridae, Genus Morbillivirus, which is detected in urine and feces of FeMV-infected cats. Since FeMV was detected in cats in various Asian, European and American countries, it is considered that the virus is prevalent all over the world. On the other hand, the pathobiological mechanisms of this virus is still unknown. Therefore, in this study, we focused on the immune responses of the hosts in FeMV-infected cats and studied the relationships between FeMV infection and viral nephritis in cats.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ネコモルビリウイルス 猫 腎不全 免疫応答

## 1. 研究開始当初の背景

猫は他の動物と比べて泌尿器疾患の罹患率が高く、14歳以上の高齢ネコの2割以上が腎不全に罹患している。この理由として、猫の腎臓の解剖学的な構造の特殊性を挙げられることが多く、一方で、猫の腎炎とウイルスの関係に注目した研究はほとんどなかった。しかし、2012年に香港で尿細管間質性腎炎と関連するネコモルビリウイルス(FeMV)が発見され、注目を集めている。FeMVはイヌジステンパーウイルス(CDV)や牛痘ウイルス、麻疹ウイルスとともにパラミクソウイルス科に属するウイルスで、猫の尿や糞便から検出されている。アジア、ヨーロッパ、アメリカの様々な国でFeMVの検出がなされていることから、同ウイルスは世界中に広まっていると考えられている。しかし、その一方でこのウイルスの病原性発現機構は不明である。そこで本研究においては、FeMV感染時の宿主の免疫応答に着目し、FeMV感染とウイルス性腎炎の関係を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

### (1) 中和抗体存在下でのFeMVの持続感染

FeMVによって腎炎が誘発される機構の一つにFeMV感染時の宿主の免疫応答が関わっている可能性が考えられた。そこでFeMV感染個体における免疫応答を解析するため、当研究室で分離された株を用いてFeMVに対する中和試験法を新たに開発した。また、開発した中和試験法を用いてFeMVの血清調査を行い、FeMV感染と腎不全の関連を調べた。

### (2) FeMV感染によるインターフェロン(IFN)誘導遺伝子の発現

最近、局所的なIFN産生による腎尿細管上皮の傷害が腎炎を増悪することや、水胞性口炎ウイルス感染細胞では欠陥干渉(DI)粒子がIFN経路を活性化することが報告された。そこでFeMV分離株を用いて、FeMV感染によるIFN誘導遺伝子(ISG)の発現について調べた。

### (3) FeMV持続感染細胞の性状および免疫応答の解析

FeMVは、猫の慢性腎炎と関与するが、発症メカニズムは未だ解明されていない。一部のモルビリウイルス属のウイルスは持続感染することで病原性を発揮することが知られており、FeMVも猫に持続感染している。そこで、FeMVの持続感染モデルとして、*in vitro* 持続感染細胞を作成し、その性状解析を行った。

### (4) ベトナムにおけるFeMVの過去血清調査

現在までに、アジア、ヨーロッパ、アメリカで核酸検査によるFeMVの検出がなされており、同ウイルスが世界各地に広く浸潤して

いることが示唆されている。FeMVの遺伝的多様性は高く、古くからイエネコで流行していたと考えられるが、2012年に初めて報告される以前にFeMVが存在していたかについては不明である。そこで、約20年前にベトナム国内で採取した保存猫血漿を用いて、FeMVの遡及血清調査を行った。

### (5) ネコパラミクソウイルス(FPaV)の国内における発見

FPaVは2015年にドイツで発見されたウイルスで、既知のパラミクソウイルスとは遺伝的に異なるグループを形成する。FPaVは、FeMVとともに猫の慢性腎炎に関与することが疑われているが、これまでドイツ以外に報告はなく、日本での感染状況も不明であった。そこで日本におけるFPaV感染状況を探るため、次世代シーケンシング法によりFPaVの検出を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 中和抗体存在下でのFeMVの持続感染

中和試験には、全国から集めた猫血清または血漿134検体を用いた。56℃30分で非働化した血清または血漿を4倍階段希釈し、FeMVウイルス液と混合した。血清/血漿・ウイルス混合液を、37℃で1時間反応させた後、猫腎由来のCRFK細胞に接種し、4ないし5日後に抗FeMV Nタンパク質抗体を用いた間接蛍光抗体法によって感染を判定した。また、中和抗体価は、接種ウイルスを50%以上中和した血清または血漿の最高希釈倍率の逆数によってあらわした。

### (2) FeMV感染によるIFN誘導遺伝子の発現

猫腎由来CRFK細胞にFeMV SS1株を接種し、感染細胞からRNAを抽出した。ISG15の活性化に必要なUBE1LのmRNAに対してプライマーを設計し、定量的RT-PCRによってFeMV感染細胞におけるISGの発現を調べた。また、FeMVのトレーラー配列上に複数のプライマーを設計し、RT-PCRを行った。

### (3) FeMV持続感染細胞の性状解析

FeMVに感染した猫の尿を採取し、遠心分離によって上清を濾過した。この尿サンプルを、トリプシン存在下で猫腎由来株化細胞であるCRFK細胞に接種した。この細胞を継代し、細胞変性効果(CPE)によりウイルス感染を確認した。この感染細胞は弱いCPEを呈したまま1年以上培養可能であった。そこでこの持続感染細胞の性状解析および顕微鏡観察を行った。

### (4) ベトナムにおけるFeMVの過去血清調査

被検血漿として、1997-98年にベトナム・ハノイ周辺から採取された保存猫血漿79検体を用いた。非働化済の血漿を階段希釈し、FeMV SS1株のウイルス液と混合した。血

漿・ウイルス混合液は、37 で1時間反応させた後、猫腎由来 CRFK 細胞に接種し、4 ないし 5 日後に抗 FeMV N タンパク質抗体を用いた間接蛍光抗体法によって感染を判定した。中和抗体価は、接種ウイルスを 50% 以上中和した血漿の最高希釈倍率の逆数によってあらわした。

#### (5) FPaV の国内における発見

動物病院に来院した猫の尿および血漿、合計 100 検体から RNA を抽出した。これらの RNA を 9 ないし 11 検体で 1 プール、合計 10 プールとし、それぞれ異なるインデックスをつけたライブラリを作製した。MiSeq でのシーケンス解析結果を既知の FPaV ゲノム配列上にマッピングし、候補配列に対するプライマーを用いて RT-PCR を行った。この PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 中和抗体存在下での FeMV の持続感染

FeMV に対する中和試験法を開発し、FeMV 感染時の免疫応答を解析した。その結果、FeMV は猫の腎臓に持続感染し、中和抗体によってもウイルスは完全に排除されずに、感染性のウイルスが尿中に排出し続けることが明らかとなった。また、交差中和試験によって FeMV に血清型が存在するか否かを調べたところ、異なる二つの遺伝型に属する FeMV 分離株で中和活性の差はほとんどなく、その抗原類似性から FeMV の血清型は一つであることが考えられた。さらに、FeMV 感染と疾患の関連を探るため血清調査を行ったところ、腎不全の個体で FeMV の中和抗体陽性率が有意に高く、FeMV 感染によって腎不全のリスクが高まることが明らかとなった。

#### (2) FeMV 感染による IFN 誘導遺伝子の発現

FeMV 感染細胞では ISG の 1 つである UBE1L 遺伝子の発現上昇がみられ、FeMV 感染によって ISG の発現が誘導されることがわかった。また、この細胞中には不完全な FeMV ゲノムであるコピーバック型 DI 粒子が検出された。折り返し地点であるブレークポイントは L 遺伝子の中に複数存在し、そこに接続される再イニシエーション部位もトレラー配列内に複数存在していた。FeMV は腎臓に持続感染し、ISG を誘導すること、さらに DI 粒子を産生することから、FeMV 感染による腎炎発症機構に宿主の異常な持続的 IFN 産生が関わっている可能性が考えられた。今後、その他の ISG、IFN、サイトカイン遺伝子の発現も調べ、FeMV 感染と IFN 誘導の関わりについて探る予定である。

#### (3) FeMV 持続感染細胞の性状解析

FeMV 持続感染細胞では、細胞内及び上清中に感染性のウイルスが検出されていた。感

染細胞内には、上清中よりも多くの感染性ウイルス粒子が含まれていた。この感染細胞の細胞質にはウイルスの N タンパク質の凝集が認められ、電子顕微鏡下で高密度な塊として観察された。また、間接蛍光抗体法により、この N タンパク質の凝集像は感染初期とは異なっていることがわかった。N タンパク質の局在に変化がみられたことから、FeMV 持続感染細胞で何らかの変化が起こっていることが考えられた。

#### (4) ベトナムにおける FeMV の過去血清調査

中和試験法を用いてベトナム国内で採取された保存猫血漿より FeMV の検出を試みたところ、79 検体中 4 検体 (5.1%) において FeMV に対する中和抗体が認められた。このことから、FeMV が少なくとも 1997 年より存在し、イエネコで感染が蔓延している可能性が示唆された。FeMV は香港で発見され、次いで日本で分離報告がなされたが、これまでアジアにおいては日本と香港以外に感染の報告はなかった。したがって、今回がベトナム国内における初の FeMV 感染の報告となった。ヨーロッパやアメリカでも核酸検査による FeMV の検出がなされていることと合わせると、FeMV はかなり以前から存在し、世界的に分布している可能性が考えられた。

#### (5) FPaV の国内における発見

尿由来 RNA のプール中に、複数の FPaV 様配列が検出された。これらの配列に対してプライマーを設計し、複数のプライマーセットで RT-PCR を行ったところ、いずれの組み合わせでも FPaV が検出された。L 遺伝子の配列をドイツ株と比較した結果、90% の相同性を示した。このプールに含まれる 11 検体のうち 3 検体が FPaV 陽性で、いずれも野外ネコであり、FeMV との混合感染はみられなかった。今回我々は日本で初めて FPaV を検出し、国内の猫にも FPaV が感染していることを明らかにした。現在、国内での疫学調査を行うとともに、FPaV のウイルス分離を試みている。また、本研究で用いたウイルス検出法は汎用性が高く、未知ウイルスの検出にも応用できると考えられた。

#### (6) 総括

FeMV は 2012 年に香港で腎炎を発症したネコから分離され、尿細管間質性腎炎との関連が疑われる新興ウイルス感染症である。本研究では、FeMV の病原性発現機構と宿主の免疫応答を調べることにより、ウイルスと腎炎の関わりを明らかにすることを目的として、病原性発現機構の解析を行った。

FeMV 感染と腎不全の関係はまだはっきりとしていないが、FeMV の中和抗体が腎不全の猫で有意に高率に見られたことから、FeMV が腎不全に何らかのメカニズムで関与

していることが考えられる。その一方で、腎臓での FeMV の抗原陽性部位と病変部が異なることから、FeMV が直接的に腎不全と関与していない可能性も指摘されている。しかし、FeMV が IFN 関連遺伝子の発現を上昇させることから、FeMV がサイトカインを介して腎臓で炎症を誘発して、その結果、腎不全を起こしている可能性も考えられる。

猫の腎不全と関連して、最近興味深い研究結果が公表された。ヒトでは血液中のタンパク質 AIM (apoptosis inhibitor of macrophage ; CD5L と呼ばれる) が急性腎不全を治癒させる機能をもっている。ところが、猫の AIM は急性腎不全時に機能せず、そのために猫では正常な治癒・回復が障害されていることがわかった。さらに、マウスのモデルを用いて、ネコ型 AIM に起因する急性腎不全の治癒障害は、AIM タンパク質の投与によって治療できた。猫は AIM 遺伝子の変異により腎不全となりやすいのであるが、その引き金となっているのが腎臓に持続感染している FeMV の可能性も考えられる。

#### 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2件)

古谷哲也、森川茂、宮沢孝幸 ネコモルビリウスの発見と現状について ウイルス、査読有、66 巻、2016、147-154  
DOI: 10.2222/jsv.66.147

宮沢孝幸 猫の新興ウイルス感染症：慢性腎不全と関連するモルビリウイルス 動物臨床医学、査読有、26 巻(4号)、2017、157-162

[学会発表](計8件)

宮沢孝幸 猫の新興ウイルス感染症：慢性腎不全と関連するモルビリウイルス 第 37 回動物臨床医学会年次大会

小出りえ、坂口翔一、桑原千恵子、酒井沙知、中川草、谷利爵公、浅井健一、川上和夫、宮沢孝幸 ネコモルビリウスの交差中和試験による血清学的比較 第 159 回日本獣医学会学術集会

坂口翔一、小出りえ、谷利爵公、入江崇、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルス感染によるインターフェロン誘導遺伝子の発現 第 159 回日本獣医学会学術集会

坂口翔一、大松勉、田向健一、片山幸枝、岡田貴志、土赤忍、岸本麻衣、粉川幸樹、宮沢孝幸、水谷哲也 日本における新規ネコパラミクソウイルスの検出 第 159 回日本獣医学会学術集会

小出りえ、坂口翔一、桑原千恵子、酒井沙

知、浅井健一、川上和夫、宮沢孝幸 ベトナムの猫におけるネコモルビリウイルスの遡及血清調査 第 160 回日本獣医学会学術集会

坂口翔一、小出りえ、神道慶子、野田岳志、水谷哲也、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルス持続感染細胞の性状および免疫応答の解析 第 160 回日本獣医学会学術集会

Sakaguchi, S., Koide, R., Shindo, K., Noda, T., Mizutani, T., Miyazawa, T. Persistent feline morbillivirus infection in CRFK cells. 17th International Congress of Virology

Sakaguchi, S., Koide, R., Nakagawa, S., Miyazawa, T., Mizutani, T. Epidemiologic survey of the feline paramyxovirus infection in Japan. 12th China-Japan international Conference of Virology

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<https://paleovirology.jimdo.com/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

宮沢 孝幸 (MIYAZAWA, Takayuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80282705

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

坂口 翔一 (SAKAGUCHI, Shoichi)

小出 りえ (KOIDE, Rie)

谷利 爵公 (TANIKAGA, Takamasa)

入江 崇 (IRIE, Takashi)

古谷 哲也 (FURUYA, Tetsuya)

水谷 哲也 (Mizutani, Tetsuya)

神道 慶子 (Sindo, Keiko)

野田 岳志 (Noda, Takeshi)

桑原 千恵子 (Kuwahara, Chieko)

酒井 沙知 (Sakai, Sachi)

浅井 健一 (Asai, Ken-ichi)

川上 和夫 (Kawakami, Kazuo)