

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05973

研究課題名(和文)新規ネコ白血病ウイルスの病原性解析

研究課題名(英文)Analysis of pathogenicity of novel feline leukemia virus

研究代表者

三宅 在子(MIYAKE, ARIKO)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：20548622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ネコ白血病ウイルス(FeLV)はガンマレトロウイルスの一種であり、家猫に水平伝播し、白血病等の致死性の疾患をもたらす。本研究では、FeLVの病原性に関する新たな知見を得るため、我々が新規に同定したFeLVサブグループであるFeLV-EおよびFeLV-Dの性状について解析を進めた。その結果、両FeLVについて病原性を規定する一因となる感染受容体の確定に至り、細胞の指向性や種指向性も示された。また、FeLV-Dの動物感染実験を行い、FeLVの個体レベルでの病原性について新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FeLV感染症はその発見から既に半世紀が経ち実用化されたワクチンも存在するが、未だその制圧には至っておらず獣医臨床で重要な感染症の一つである。しかしながら、近年におけるFeLVの研究は少なく、その内容も疫学的解析やワクチンの評価などに偏っている。本研究においては、FeLVのウイルス学と病原性に関する新たな知見が得られた。これらはFeLV感染症に臨床的に対処していくための基礎的材料にもなると期待される。

研究成果の概要(英文)：Feline leukemia virus (FeLV) is horizontally transmitted among cats and causes a variety of fatal diseases such as leukemia. In this study, in order to obtain new knowledge on the pathogenicity of FeLV, we analyzed the properties of FeLV-E and FeLV-D, which are newly identified FeLV subgroups. As a result, the infectious receptor which contributed to the pathogenicity of both FeLV was determined, and the cell tropism and the host range of them were also determined. In addition, animal infection experiments of FeLV-D were conducted, and new findings were obtained about the pathogenicity of FeLV at the individual level.

研究分野：ウイルス学

キーワード：FeLV 受容体

1. 研究開始当初の背景

ネコ白血病ウイルス (FeLV) はレトロウイルス科ガンマレトロウイルス属に属するウイルスである。家猫及び一部の野生猫科動物に水平伝播し、リンパ腫、急性骨髄性白血病、再生不良性貧血、免疫不全症等の予後不良な疾患を引き起こす。FeLV の変異頻度は高く、持続感染した個体内では変異や宿主遺伝子との組換えにより新たなタイプのウイルスが高い確率で生じる。変異は特にウイルス粒子の外被を構成するエンベロープ蛋白 (Env) で多く生じるが、Env は標的細胞のウイルス受容体への結合に関わる蛋白であり、その変異は用いる受容体の違いを生み出す。そして受容体の違いは感染標的の拡大と感染による細胞の生理機能への影響の変化をもたらす。結果として病原性の違いを生み出す。FeLV には数種のサブグループが存在する (FeLV-A, -B, -C, -D, -T)。家猫で水平伝播するのは FeLV-A であり、その他のサブグループは感染個体内での変異で新たに生じる。これらのサブグループは用いる受容体の違いにより分類され、各々異なる疾患との関連が報告されている。

我々の研究室では、以前、日本の FeLV 感染ネコ検体を用いた FeLV env 領域 (Env のコード領域) の遺伝子解析を行った。その際、Env の一定領域に集積した変異と挿入を持つウイルスが同定された。当ウイルスについて受容体干渉実験と様々な動物種由来細胞を用いた感染実験を行った結果、当ウイルスは既知の FeLV サブグループと干渉を起こさず、感染宿主域も異なっていた。よって、当ウイルスが既知の FeLV とは異なる受容体を用いることが示された。我々は当ウイルスが形成する新たなサブグループを FeLV-E と命名し、報告した (Journal of Virology, 2016;90:4832-7)。更に、我々は FeLV-E の受容体の同定に取り組んだ。方法としては、FeLV-E 感受性のヒト細胞と非感受性のハムスター細胞とのハイブリッド細胞株ライブラリーを用いた FeLV-E の感受性試験を行い、その結果の量的形質遺伝子座解析により受容体候補因子を数種同定した。その中より、レトロウイルス受容体の一般的な性質である複数回膜貫通型蛋白で、FeLV-A 受容体である THTR1 と系統的に近い Reduced folate carrier 1 (RFC1) が最有力候補として浮かび上がった。

2. 研究の目的

本研究では、FeLV の病原性に関する新たな知見を得るため、我々が新規に同定した FeLV サブグループである FeLV-E の病原性を明らかにすることを目的とした。そのため、まず病原性を規定する一因となる感染受容体を確定し、FeLV-E と当受容体との相互作用を詳細に解析することを目指した。また、FeLV-E の増殖性を含む性状解析に取り組んだ。更に、FeLV-E の個体レベルでの病原性を明らかにするため、当ウイルスの動物感染実験を計画した。一方で、FeLV-E のような新たなサブグループの出現は FeLV の病原性の幅を広げることに繋がることより、FeLV-E の自然界における出現率を明らかにすることを目的とし、疫学調査を行った。

3. 研究の方法

(1) FeLV-E と受容体の相互作用に関する解析 FeLV-E の受容体の候補として上がった RFC1 の強制発現細胞および欠損細胞を作成し、それら細胞における FeLV-E 感受性の有無を評価した。また、RFC1 強制発現細胞において、FeLV-E 感染による受容体干渉効果の有無を評価した。更に、RFC1 に対する FeLV-E の直接的結合をフローサイトメトリーにより検証した。また、受容体との結合における FeLV-E Env の責任領域を明らかにするため、各種の Env 変異体を作成し RFC1 強制発現細胞への感染性を検証した。

(2) 感染性分子クローンの構築および性状解析 FeLV-E env を単離した家猫より、PCR 法にて完全長の FeLV-E プロウイルス DNA の遺伝子クローニングを行った。得られた分子クローンを用いて FeLV-E ウイルス液を作成し、その感染性と受容体の指向性について検証した。更に、FeLV-E の細胞指向性について明らかにするため、家猫由来の各種細胞株における増殖性を家猫で水平伝播している FeLV-A と比較し検証した。また、それらの指向性の差が Env に起因するか否かを検証するため、FeLV-A をバックボーンとし FeLV-E の env 領域を乗せ換えた FeLV-A/-E キメラウイルスを作成し増殖性を調べた。

(3) FeLV-D の動物感染実験 当初、FeLV-E の個体レベルでの病原性を明らかにするための猫感染実験を計画していたが、本研究期間においては、FeLV-E と同様に我々の研究室にて新規に同定された FeLV-D の感染実験を先行して行った。FeLV-D は、FeLV-A と家猫の内源性レトロウイルスとの組み換えウイルスであり、当ウイルスの受容体も本研究期間に同定に至った (論文準備中)。感染が大部分で成立するとされる離乳前 (5 週齢) のネコに FeLV-D (接種には臨床検体より分離された FeLV-A、-B、-D の混合ウイルスを使用) を腹腔内接種し、その後のウイルス動態および宿主側の症状について、経時的に血液を用いた検査を行い、剖検時には各種の臓器を採取しウイルス学的および病理学的解析を行った。

(4) FeLV-E の疫学調査 日本全国の動物病院および検査会社より FeLV 陽性家猫検体を収集し、それら検体における FeLV プロウイルス DNA を PCR 法にてクローニングした。更に、遺伝子配列を決定し、FeLV-E に特徴的な配列を保有するか否かを調べた。同時に培養細胞を用いたウイルス分離を行い、分離されたウイルスについて、FeLV-E を含む各種 FeLV サブグループとの干渉実験を行いサブグループを決定した。

4. 研究成果

(1) FeLV-E と受容体の相互作用に関する解析 猫の RFC1(FeRFC1)及びヒトの RFC1(huRFC1) の発現ベクターを作成し、FeLV-E に非感受性を示す MDTF (Mus Dunn Tail Fibroblast) 細胞へ導入したところ、FeLV-E の感受性が認められた (図 1)。一方、既知の猫ガンマレトロウイルス株 (FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-D, ERV-DC10, ERV-DC14) は、これらの細胞に感染しなかった。また、HeLa 細胞は元々 FeLV-E に感受性を示すが、RFC1 欠損させた HeLa 細胞を用いたところ FeLV-E に抵抗性を示した (図 2)。当 RFC1 欠損 HeLa 細胞に feRFC1 あるいは huRFC1 を導入すると、再度 FeLV-E の感受性が認められた。以上の結果より、RFC1 が FeLV-E に特異的な受容体であることが示された。

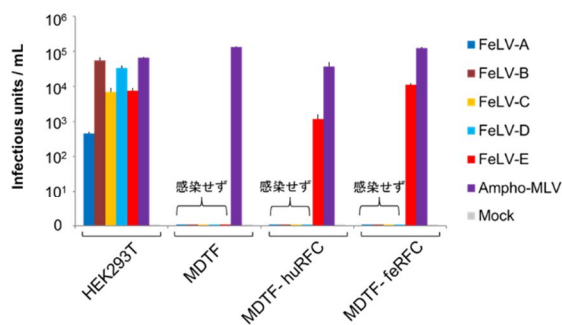


図1 RFC1導入細胞におけるFeLV-Eの感染性

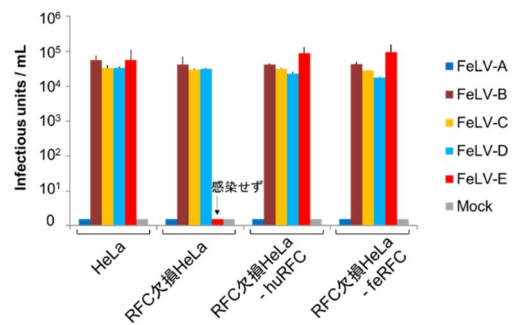


図2 RFC1欠損細胞におけるFeLV-E感受性の喪失とRFC1導入によるFeLV-E感受性の復活

また、RFC1 強制発現細胞において FeLV-E の持続感染を成立させ、当細胞における FeLV-E 重感染の可否を検討した。その結果、重感染は成立せず、RFC1 を介した FeLV-E の受容体干渉効果が示された。更に、HeLa 細胞、RFC1 欠損 HeLa 細胞、および feRFC1 導入 RFC1 欠損 HeLa 細胞に対する FeLV-E の結合をフローサイトメトリーにより評価したところ、RFC の発現がある細胞にのみ FeLV-E は結合し、RFC1 と FeLV-E との直接的結合が示された。また、RFC1 との結合における FeLV-E Env の責任領域を明らかにするため、各種の FeLV-E Env 変異体を作成し RFC1 強制発現細胞への感染性を検証した。その結果、Env の受容体結合領域である VRA におけるわずかに数個のアミノ酸の違いにより、家猫で水平伝播している FeLV-A タイプから FeLV-E タイプへの変換が起きる、つまり感染受容体の変換が起きることが示された。

(2) 感染性分子クローンの構築および性状解析 FeLV-E 感染家猫由来の染色体 DNA を用いて FeLV 感染性分子クローンを再構築し、当ウイルスの性状解析を行った。その結果、当ウイルスは各種の猫細胞株において持続感染することが示された。また、重感染の可否を評価する干渉実験と RFC1 強制発現細胞における感染実験を行った結果、当ウイルスは FeLV-E サブグループに分類されることが示された。以上より、各種の感染実験に利用可能な FeLV-E 感染性分子クローンを新たに確立された。

更に、FeLV-E の細胞指向性について明らかにするため、当ウイルスの家猫由来の各種血球系細胞株 (PBMC、骨髄系細胞、T 細胞、B 細胞を由来とする細胞株) における増殖性を FeLV-A と比較した。その結果、すべての細胞株において当ウイルスは FeLV-A よりも高い増殖性を示し (図 3) FeLV-E が血球系細胞への高い指向性を持つことが示唆された。また、FeLV-A をバツ

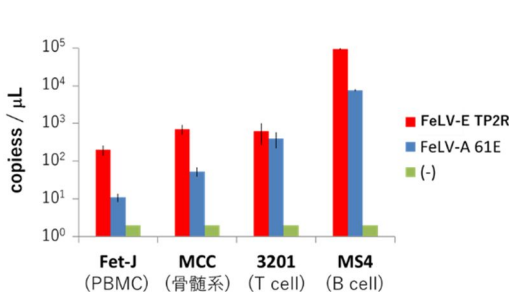


図3 血球系細胞株におけるFeLV-Eの増殖能

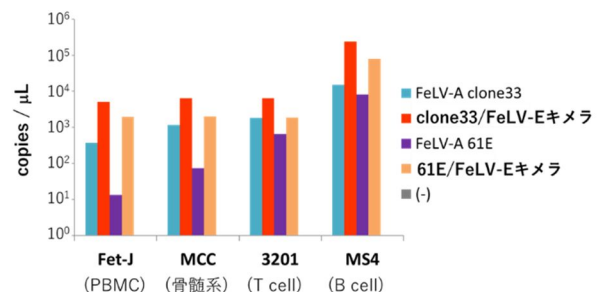


図4 血球系細胞株におけるFeLV-A/-Eキメラウイルスの増殖能

クボーンとし FeLV-E の env 領域を乗せ換えた FeLV-A/-E キメラウイルスを作成し、上記の細胞株における増殖性を調べた。その結果、FeLV-A/-E キメラウイルスはバックボーンとなる

FeLV-A よりも高い増殖性を示し (図 4) FeLV-E の細胞指向性は Env に起因することが示唆された。

(3) FeLV-D の動物感染実験 新規 FeLV の個体レベルでの病原性を明らかにするため、FeLV-E と同様に我々の研究室にて新規に同定された FeLV-D の猫感染実験を行った (接種には臨床検体より分離された FeLV-A、-B、-D の混合ウイルスを使用)。その結果、ウイルス接種後 3 週から 10 カ月にわたる持続的な感染が確認された。また、一部の猫における剖検により、腸管や脳を含む各種の臓器における FeLV の感染が確認され、当ウイルスが全身へと拡散していることが示された。当感染実験の詳細な解析は現在進行中である。

FeLV-D に関しては、当感染実験に先行して性状解析も進めた。その結果、FeLV-D の受容体が同定され、且つ FeLV-D と同じ受容体干渉グループに属する他の動物種のウイルスも明らかとなった。また、多様な動物種由来の細胞株への感染性も示された。FeLV-D については当初予定していた計画に新たに加わった部分であるが、FeLV 全体としての新たな側面を知ることとなり、FeLV-E の比較対象となる点からも、本研究にとって進展した部分と考えられる。

(4) FeLV-E の疫学調査 日本全国の動物病院および検査会社より FeLV 陽性家猫検体を収集し、それら検体における FeLV-E の保有状況を調べた。検体よりプロウイルス DNA をクローニングし遺伝子配列を決定した結果 (約 200 クローン) および検体より分離されたウイルスを用いた干渉実験によるサブグループ決定を行った結果 (約 50 検体) FeLV-E は検出されず、FeLV-E の出現頻度は非常に低いことが示された。

上記において FeLV-E は検出されなかったが、当調査を通じ新たなタイプの FeLV が発見されており、現在解析を進めている。また、FeLV の変異とそれら変異による病原性の変化について新たな知見を得るため、当検体を用いた次世代シーケンスを含む各種の解析にも着手した。

本研究では、FeLV の病原性に関する新たな知見を得るため、我々が新規に同定した FeLV サブグループである FeLV-E および FeLV-D の性状について解析を進めた。その結果、両 FeLV について病原性を規定する一因となる感染受容体の確定に至り、細胞の指向性や種指向性も示された。また、FeLV-D については動物感染実験を行い、FeLV の個体レベルでの病原性についての新たな知見が得られる状況にある。更に、本研究にて収集した FeLV 陽性家猫検体の解析を進める中でまた新たなタイプの FeLV が発見され、今後の解析により多くの知見が得られると期待される。FeLV 感染症はその発見から既に半世紀が経ち実用化されたワクチンも存在するが、未だその制圧には至っておらず獣医临床上重要な感染症の一つである。しかしながら、近年における FeLV の研究は少なく、その内容も疫学的解析やワクチンの評価などに偏っている。本研究においては、FeLV のウイルス学と病原性に関する新たな知見が得られた。これらは FeLV 感染症に臨床的に対処していくための基礎的材料にもなると期待される。更に、本研究におけるウイルスの変異や受容体との相互作用、病原性についての知見はレトロウイルスに一般化される部分もあり、ヒトやその他の動物のレトロウイルス感染症に応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ngo Minh Ha, Arnal MariaCruz, Sumi Ryosuke, Kawasaki Junna, Miyake Ariko, Grant Chris K., Otoi Takeshige, Fernandez de Luco Daniel, Nishigaki Kazuo	4. 巻 93
2. 論文標題 Tracking the Fate of Endogenous Retrovirus Segregation in Wild and Domestic Cats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01324-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01324-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ngo Minh Ha, Soma Takehisa, Youn Hwa-Young, Endo Taiji, Makundi Isaac, Kawasaki Junna, Miyake Ariko, Nga Bui Thi To, Nguyen Huyen, Arnal MariaCruz, Fernandez de Luco Daniel, Deshapriya R. M. C., Hatoya Shingo, Nishigaki Kazuo	4. 巻 165
2. 論文標題 Distribution of infectious endogenous retroviruses in mixed-breed and purebred cats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 157 ~ 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-019-04454-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyake Ariko, Kawasaki Junna, Ngo Ha, Makundi Isaac, Muto Yutaro, Khan Arshad H., Smith Desmond J., Nishigaki Kazuo	4. 巻 -
2. 論文標題 The reduced folate carrier: an entry receptor for a novel feline leukemia virus variant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00269-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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 三宅在子、武藤裕太郎、Ha Ngo、西垣一男
2. 発表標題 新たなサブグループに分類されるFeLVの感染性クローンの構築と性状解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ariko Miyake, Junna Kawasaki, Desmond J Smith, Kazuo Nishigaki
2. 発表標題 Isolation of an infectious FeLV subgroup E provirus and discovery of its viral receptor
3. 学会等名 The 30th International Workshop on Retroviral Pathogenesis (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	木村 透 (Kimura Tohru) (80419027)	山口大学・共同獣医学部・教授 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------