

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07145

研究課題名(和文) 新規遺伝子操作系を利用したロタウイルス下痢症発症機序の解明

研究課題名(英文) Reverse genetics approach for mechanism of diarrhea induced by rotavirus infection

研究代表者

金井 祐太 (Kanai, Yuta)

大阪大学・微生物病研究所・講師

研究者番号：80506501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではNSP4遺伝子変異組換えロタウイルスをの Maus における下痢発症能を比較したところ、NSP4のC末端側領域にアミノ酸変異を導入することで下痢発症能が低下することが明らかとなった。また野生型サルロタウイルスSA11株の Maus に対する感染効率が低いことから、SA11を Maus で継代感染することで、Maus への感染能が増加した Maus 馴化サルロタウイルス、SA11m株を得た。また Maus 感染の *in vitro*における感染モデル構築のため、Maus の腸管由来不死化細胞株を樹立した。また、抗生物質を投与した Maus でロタウイルス感染が顕著に抑制されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロタウイルス下痢の理解に寄与するロタウイルスは5歳以下の乳幼児に重篤な下痢症を引き起こし、全世界で毎年20万人前後がロタウイルス感染により亡くなっている。本研究ではロタウイルスNSP4タンパク質の特定のアミノ酸が下痢発症に関与していることを明らかにしたことから、これまでに記録されているロタウイルス臨床株の遺伝子配列を比較することで下痢発症の予測の可能性を示した。さらにサルロタウイルスの Maus 感染モデルの構築したことから、ワクチンや抗ウイルス薬の試験が可能になる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the diarrhea inducing ability of recombinant rotavirus SA11 strain (rSA11) with mutant NSP4 protein. rSA11 mutant which had amino acid mutations in C-terminal region of NSP4 induced less diarrhea in 4-day-old mouse pups. By serial passages of wild-type SA11 strain in mouse for total 10 times, mouse-adapted rotavirus, SA11m strain which showed higher replication in mouse intestine in comparison to wild-type SA11 was obtained. Immortalized cell lines derived from mouse intestinal cells were established. The infections of SA11m in mouse inoculated with antibiotics were inhibited suggesting the involvement of intestinal microbiota to rotavirus infections.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 下痢症 治療

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスは乳幼児に深刻な嘔吐・下痢症を引き起こし、発展途上国を中心に年間約 20 万人の死亡例が報告されている。先進国における死亡例は少ないものの入院治療を必要とする重症例は多く、医療経済の観点から重視されている。ロタウイルスは 11 本の分節型二本鎖 RNA をゲノムに有し、そのゲノム構造の複雑さから、ウイルス遺伝子改変技術の開発が遅れていた。我々は 2017 年にプラスミドにクローン化したロタウイルス由来 cDNA から人工的に組換えウイルスを作出する完全な遺伝子操作系の開発に成功した (Kanai et al., 2017 PNAS. 114:2349-2354.; 特許第 6762070 号)。この技術の開発により、任意の遺伝子変異を持つ組換えロタウイルスの作成が可能になり、ロタウイルス病原性発現機序の解明に応用できると期待されている。

ロタウイルスがコードする NSP4 タンパク質はウイルス性エンテロトキシンとして知られ、NSP4 の単独投与で下痢を引き起こすことから、ロタウイルス特有の激しい下痢発症の主要な原因因子であると考えられている。NSP4 は小胞体膜貫通タンパク質として合成され、小胞体からの Ca^{2+} の流出を促進し細胞質内 Ca^{2+} の濃度を上昇させる。また NSP4 の C 末端側である 112-175 番目のアミノ酸が分泌型 NSP4 として細胞外へ放出されると周囲の非感染細胞へ作用し、Phospholipase-C (PLC) 依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こす。こうした Ca^{2+} 濃度の上昇は Ca^{2+} 依存的な Cl^- の細胞外流出を促進し、それに伴い腸管内への水分の流出が起こることで下痢の発症を引き起こすと考えられている。また、腸管内に存在するクロム親和性細胞が NSP4

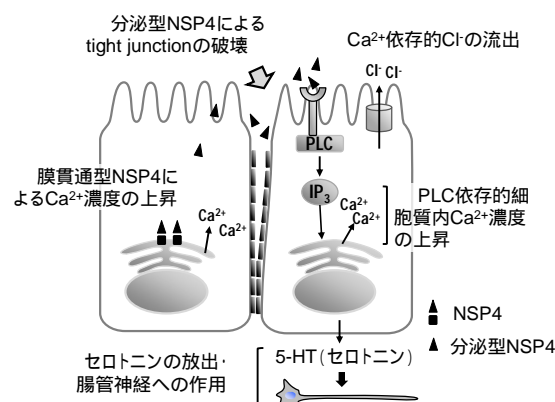


図1 ロタウイルスNSP4による下痢発症機序

えられている。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでの組換えタンパク質を用いた研究から示唆される NSP4 の機能的ドメインに変異を導入した種々の NSP4 組換えロタウイルス株を作製し、下痢発症能に寄与する NSP4 の機能的ドメインの探索を行った。下痢発症能への寄与及び、ロタウイルス複製サイクルにおける必要性と機能を明らかにする。特に NSP4 の腸管毒素 (エンテロトキシン) としての機能はロタウイルスによる下痢症の直接の原因であることが示唆されており、NSP4 に変異を導入した組換えウイルスの性状を精査することで、ロタウイルス病原性発症の分子メカニズムが明らかになると期待される。

3. 研究の方法

1. NSP4 下痢症発症ドメイン変異ウイルスのマウスにおける病原性解析

NSP4 タンパク質に網羅的にアミノ酸点変異や欠失変異を加えた NSP4 変異組換えロタウイルスを作製し培養細胞における増殖能を測定した。培養細胞で増殖能の低下が認められないウイルス株については生後 4 日齢の乳飲みマウスに経口感染し、下痢症発の経時観察を行った。

2. マウス順化サルロタウイルス株の作成

野生型サルロタウイルス SA11 株を近交系マウス (Balb/c、3 週齢、オス) に経口投与し、感染 5 日後の腸管を採取し、組織破砕液を MA104 細胞に加えた。MA104 で増幅したウイルスを再度マウスに投与した。マウスでの継代を計 10 回繰り返し、マウス順化サルロタウイルス、SA11m 株を得た。SA11m 株の遺伝子をプラスミドにクローニングし細胞にトランスフェクションすることで、

に感作されることで神経伝達物質であるセロトニンを分泌し、腸管神経系が刺激されることも下痢の発症に関与すると考えられている (図 1)。これらは組換え NSP4 タンパク質の研究を通して得られた成果であるが、下痢症状が異なる患者から分離されたロタウイルス株を比較した際に、NSP4 のアミノ酸配列と症状に相関が得られないことが多く、実際の感染時における NSP4 と下痢症との関連については決定的な結果が得られていない。一方、NSP4 は細胞内の小胞体の膜上にも局在しウイルス粒子形成過程に必須の機能を持っていることから、ウイルス複製サイクルに必須のウイルスタンパク質であると考

組換えマウス順化サルロタウイルスである rSA11m 株を得た。

3. マウス腸管由来不死化細胞株の樹立

近交系マウス (Balb/c、3 週齢、オス) の小腸、盲腸および大腸を採取し、PBS で内容物を洗浄後、Collagenase および Dispase 処理により細胞の剥離を行った。剥離した細胞を細胞培養プレートに播種し、培養液 (10%FBS、ストレプトマイシン、ペニシリン添加 DMEM) で一晚培養した。培養液中に SV40 largeT 抗原発現レンチウイルスを添加し、37 °C、5%CO₂ の条件下で培養を続けた。培養開始から 2 週間後、細胞のコロニーを単離し、株化クローンとして培養を続けた。得られた細胞株は ICBC (Intestinal cells of Balb/c mice) 細胞株として実験に供した。

4. 抗生物質によるロタウイルス感染抑制

抗生物質 (Penicillin, Kanamycin, Doxycycline, Erythromycin, Sulfamethoxazole, Lomefloxacin) をそれぞれ 1g/L に調整し、近交系マウス (Balb/c、3 週齢、オス) に飲水投与を行った。Erythromycin についてはは経口ゾンデにより 1 頭当たり 100 μ L の経口投与を 24 時間ごとに行なった。抗生物質投与を 2 週間継続後、rSA11m 株を経口投与 (1.0 \times 10⁶ FFU/頭) し、感染 3 日後の腸管内におけるウイルス量を測定した。

4. 研究成果

我々は、ロタウイルス遺伝子改変技術を駆使することで、NSP4 に任意の変異を加えた組換えロタウイルスを多数作製した (図 2)。一部の 변異株 (L5S, K59E, del10-21) では増殖能が大幅に低下していることから、NSP4 がウイルス増殖に重要な機能を持つことが確認された。これらの NSP4 変異ウイルスの下痢発症能を、生後 1 週間以内の乳飲みマウスを利用したロタウイルス下痢発症モデルを用いて比較した (図 3A)。培養細胞において増殖能に変化がなかった NSP4 変異体 (図 3B) を生後 4 日齢のマウスに経口投与したところ、一部の NSP4 変異ウイルスで下痢発症能の低下が認められた (図 3C)。このような下痢発症能が低下した変異ロタウイルスはロタウイルスの病原性発現機構の解明に寄与するだけでなく、弱毒ワクチン株の開発にも応用が期待される。また (細菌や寄生虫を含む) 腸管病原体の中には、激しい下痢を起こすものと、無症候のものが見られるが、下痢発症能低下ロタウイルスの動物個体間感染能などを検証することで、病原体にとっての下痢発症の意義についても解析が可能になる。当該のアミノ酸変異体について引き続き確認実験を行っている。

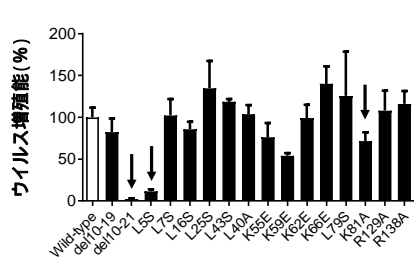


図2 NSP4変異ロタウイルスの増殖能。一部のウイルス株 (矢印) において増殖能の低下が認められた

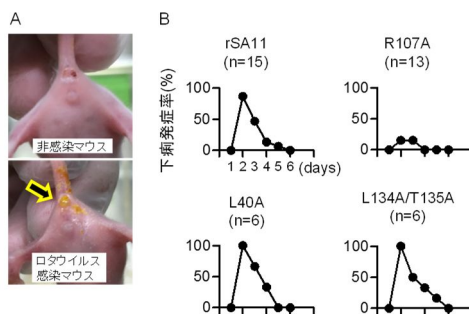


図3 下痢発症能が低下したNSP4変異ロタウイルスの作成 (A)生後1週間以内の乳飲みマウスにロタウイルスを経口投与することで下痢 (矢印) を発症する。(B)野生型ロタウイルス (rSA11株) は、ほぼ全てのマウスに下痢を惹起するのに対し、NSP4 R107A 変異ロタウイルスの下痢発症能は低下した。

実験に用いたサルロタウイルス SA11 株は、マウスに経口投与することで下痢を惹起するが、マウスでの増殖効率は低いとされている。そこでより安定的なロタウイルスのマウス感染モデル構築の為、サルロタウイルス SA11 株のマウス順化株の作成を試みた。SA11 株感染マウスの腸管から得られたウイルスを、さらにマウスで感染し継代を 10 回繰り返すことで SA11m 株を得た。さらに SA11m 株のウイルス遺伝子をクローニングし、遺伝子操作系により組換えマウス順化サルロタウイルス、rSA11m 株を作成した。rSA11m 株の成マウス (3 週齢) に対する感染実験を行ったところ、野生型 rSA11 株と比較し、rSA11m 株の感染性が増加した結果が得られた (図 4)。マウスへの感染性に寄与するウイルス遺伝子解析のため、SA11m 株の全遺伝子配列の解析を行ったところ、VP1、VP3、NSP3 および VP7 遺伝子に各 1 か所のアミノ酸変異が認められた。VP1 と VP3 は複合体を形成し、RNA dependent RNA polymerase として、ロタウイルスの二本鎖 RNA ゲノムから一本鎖 RNA の転写を行う。NSP3 は宿主タン

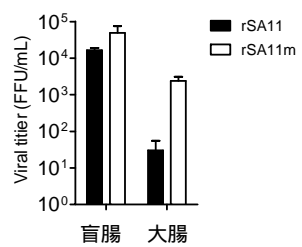


図4 マウス順化ロタウイルス rSA11m株のマウスにおける増殖能は野生型ロタウイルスrSA11株と比較し増加した。

パク質の翻訳関連因子である eIF4G に結合し、ウイルスタンパク質の翻訳活性を促進する機能を持つ。またウイルス粒子表面に位置するカプシドタンパク質である VP7 は細胞表面のインテグリンと相互作用し、ウイルス粒子の細胞内侵入に寄与する。現在、これらの遺伝子変異とマウス順化との関係を調べているが、それぞれのウイルスタンパク質が宿主因子と相互作用することから、アミノ酸が変異することでマウスの細胞内因子との相互作用が強くなったことが一つの仮説として考えられた。

ロタウイルス研究では、ウイルスの効率的な増殖の為サル腎由来の MA104 細胞が広く用いられているが、ロタウイルス感染実験の比較では、マウス腸管での感染性と性質が異なること示唆されている。そこで、より自然なロタウイルス感染モデルの構築のため、マウスの腸管（回腸および盲腸）由来の初代培養細胞に SV40 ウイルスの large T 抗原を導入することで、マウス腸管由来不死化細胞株、ICBc (Intestinal Cells of Balb/c) 細胞を樹立した。マウス

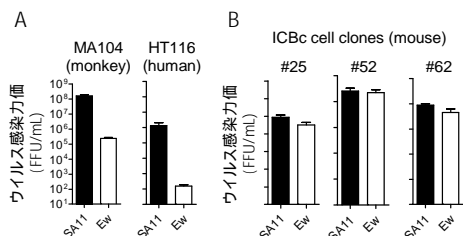


図5 近交系マウス (Balb/c) 腸管由来不死化細胞株 (ICBc細胞) の樹立。マウスロタウイルスEw株の増殖効率は、(A)ヒト・サル由来細胞株においてサルロタウイルスSA11株より顕著に低下するが、(B)ICBc細胞においてはSA11と同程度の増殖能を示した。

ロタウイルス Ew 株はマウス腸管で効率よく増殖するが、サルやヒト由来の培養細胞ではサルロタウイルス SA11 株に比べ増殖能が著しく低いことが知られている (図 5A)。しかし、ICBc 細胞株においては Ew 株は効率的に増殖することから (図 5B)、マウス由来細胞の性質を保持していると考えられた。今後は ICBc 細胞における糖鎖受容体の発現や、前述のマウス順化ロタウイルス株の感染実験を行い、ICBc 細胞の有用性について検討を行う。

ここまでは、ロタウイルスの複製および病原性に関するウイルス遺伝子を調べるため、遺伝子組換えロタウイルスを用いた実験を行ってきた。一方で、ウイルス遺伝子や宿主遺伝子に起因しない、ウイルス感染時の症状の個人差があることが知られている。腸内細菌叢は個人の生理や免疫学的性質に影響を与え、ウイルス感染にも影響することが知られている。ロタウイルス感染に関する腸内細菌叢の影響を明らかにするため、抗生物質カクテル (ペニシリン、ストレプトマイシン、アンピシリン、カナマイシン) を飲水投与したマウスにロタウイルス

表1. 実験に使用した抗生物質

抗生物質	系統	作用機序
ペニシリン	ラクタム系	細胞壁合成阻害
カナマイシン	アミノグリコシド系	蛋白質合成阻害
ドキシサイクリン	テトラサイクリン系	蛋白質合成阻害
エリスロマイシン	マクロライド系	蛋白質合成阻害
スルファメトキサゾール	サルファ剤	葉酸合成阻害
ロメフロキサシン	ニューキノロン系	DNA合成阻害

(SA11 株) を経口感染したところ、腸管組織におけるロタウイルス感染が顕著に抑制された。

次に、作用機序の異なる以下の抗生物質 (表 1) を個別に投与したマウスに対しロタウイルス感染を行った。感染 72 時間後の盲腸組織からのウイルス検出を試みたところ、無処置群ではウイルス感染を行った 5 頭全ての盲腸組織から 100mg 当たり平均 1.1×10^5 FFU のウイルスが検出されたのに対し、ペニシリン投与群では感染性ウイルスは全く検出されなかった (図 6A)。またロメフロキサシン投与マウスでは、5 頭中 2 頭からはウイルスが検出されず、ウイルス量が低下する傾向がみられた。カナマイシン投与マウスでは 5 頭中 1 頭からはウイルスが検出されなかったが、残る 4 頭からは無処置群より高いウイルス量が検出された。その他の抗生物質投与群では、無処置群と同程度のウイルスが検出された。またこれらのマウスの剖検時における盲腸重量を測定したところ、ペニシリン

投与マウスにおいて盲腸重量が顕著に増加していた。次いでカナマイシン投与群においても若干の盲腸重量の増加が確認されたが、他の抗生物質投与群においては盲腸重量の変化は認められなかった (図 6B)。

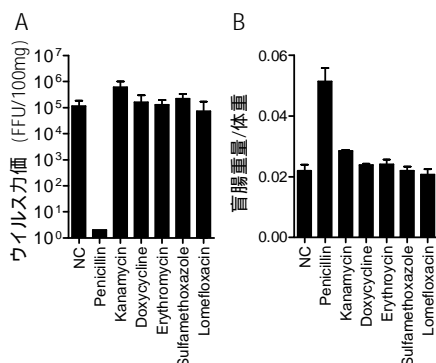


図6 作用機序の異なる抗生物質を2週間飲水投与したマウスにロタウイルスを経口感染し、72時間後の腸管組織における(A)ウイルス量と(B)盲腸重量を調べた。NCは通常の飲水飼育したマウス。

投与マウスにおいて盲腸重量が顕著に増加していた。次いでカナマイシン投与群においても若干の盲腸重量の増加が確認されたが、他の抗生物質投与群においては盲腸重量の変化は認められなかった (図 6B)。各抗生物質の効果を調べるために、それぞれの抗生物質を投与したマウス糞便より、腸内細菌の代表種である Altered Schaedler Flora (ASF) と呼ばれる細菌 8 種類のマウス糞便内の増減を定量的 PCR で検査した。図 7 には *Bacteroides* sp. (ASF519) および *Firmicutes* sp. (ASF500) の結果を示したが、これら 2 種の細菌は抗生物質の種類により様々な程度に抑制されていることが分かった。これらの結果から、ペニシリンやロメフロキサシンにより、特定の細菌種の増殖が変動することでロタウイルス感染が抑制され、カナマイシン処理では、腸内細菌叢が改変す

ことでロタウイルス感染が亢進される可能性が示唆された。

さらに、腸内細菌とロタウイルス感染との関連を明確にするために、無菌マウスに対する感染実験を行った。サルロタウイルス SA11 株を無菌マウスに経口投与したところ、抗生物質投与マウスと同様にロタウイルス感染が抑制された。次に無菌マウスに正常マウスの糞便懸濁液を経口投与し、腸内細菌叢を再構築したマウスにロタウイルス経口感染を行ったところ、正常マウスと同等の感染性が確認された。

本研究では、我々が開発したロタウイルス人工合成技術（遺伝子操作系）を用いて下痢発症能が低下したロタウイルスの作成に成功した。またマウス順化ロタウイルス株や、マウス由来細胞株を樹立することでより効率的なロタウイルス実験系の構築を試みた。最後に抗生物質投与マウスを用いることで、腸内細菌叢とロタウイルス感染の解明を試みた。これらの研究は、ロタウイルス感染や病原性に関与するウイルス側および宿主側の因子の解明を行うものであり、両者を同時に扱うことで包括的なロタウイルス下痢発症メカニズムについての研究が展開できると考えている。

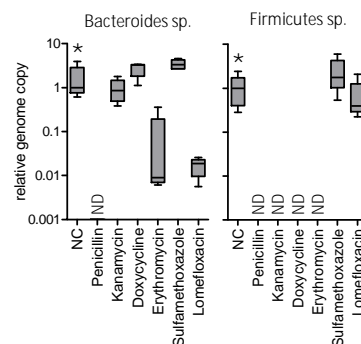


図7 抗生物質を投与したマウス糞便中の細菌の検出。16リボソームDNAのコピー数を基準値(*)に対する相対値で示した。NCは通常の飲水飼育による陰性コントロール。NDは検出限界以下。

両者を同時に扱うことで包括的なロタウイルス下痢発症メカニズムについての研究が展開できると考えている。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanai Y, Kawagishi T, Nouda R, Onishi M, Pannacha P, Nurdin JA, Nomura K, Matsuura Y, Kobayashi T.	4. 巻 93
2. 論文標題 Development of Stable Rotavirus Reporter Expression Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01774-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01774-18.	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 -

1. 著者名 Kanai Y, Onishi M, Kawagishi T, Pannacha P, Nurdin JA, Nouda R, Yamasaki M, Lusiany T, Khamrin P, Okitsu S, Hayakawa S, Ebina H, Ushijima H, Kobayashi T.	4. 巻 95
2. 論文標題 Reverse Genetics Approach for Developing Rotavirus Vaccine Candidates Carrying VP4 and VP7 Genes Cloned from Clinical Isolates of Human Rotavirus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01374-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01374-20	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

1. 著者名 Pannacha Pimfhun, Kanai Yuta, Kawagishi Takahiro, Nouda Ryotaro, Nurdin Jeffery A., Yamasaki Moeko, Nomura Keiichiro, Lusiany Tina, Kobayashi Takeshi	4. 巻 534
2. 論文標題 Generation of recombinant rotaviruses encoding a split NanoLuc peptide tag	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 740 ~ 746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.007	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kanai Y
2. 発表標題 Reverse genetics approach for the development of rotavirus vaccine and viral vector
3. 学会等名 広東省胸部疾病学会医学検試專業委員會2020 年会及胸部疾病検診診斷技術新進展學習班（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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		
タイ	Chiang Mai University		