

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09466

研究課題名(和文) アデノウイルス眼感染症発症メカニズムの分子生物学的解析と治療薬剤開発の研究

研究課題名(英文) Molecular biological analysis of pathological mechanism of adenoviral ocular infectious diseases and development of therapeutic measures

研究代表者

内尾 英一 (Uchio, Eiichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：70232840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：国内で大規模な流行性角結膜炎の流行を経年的に生じているアデノウイルス 54型(Ad54)のウイルス学的性質を明らかにするために、他の型のA549細胞におけるウイルス学的検討をin vitroで比較した。細胞変性効果の経時的観察、ウイルスコピー数の測定、細胞内ゲノム増加速度の計算を行った。早期転写因子E1遺伝子の発現量の測定と他の型との間の系統解析を行った。Ad54のウイルス量、増殖速度、E1遺伝子の発現は他の型に比較して遅かった。E1遺伝子系統解析では特にAd8と近縁であった。Ad54の増殖速度はその臨床的特徴との関連が考えられるとともに、ゲノムレベルでの変異によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、環境の変化によって出現し、現在国内で流行を繰り返している新型アデノウイルスのバイオインフォマティクスによる解析が行われ、流行を生じている特に54型について、遺伝子レベルの変異の究明が行われ、その性質が明らかになった。角膜の3D細胞実験モデルによる新型アデノウイルス型と既存の結膜炎を生じない型との間の病原性の経時的な差異が観察され、重症化の機序についての基礎的研究が深められた。そして特異的抗アデノウイルス作用を有する薬剤の作用を新型アデノウイルスに対して拡大し、病態に応じた解析が可能な3D細胞モデルも用いて、現在の流行により適した薬剤の開発を可能にする成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To characterize the virological features of adenovirus type 54 (Ad54) causing nationwide outbreak of severe epidemic keratoconjunctivitis (EKC) in Japan, we comparatively analyzed the viral propagation phenotype of Ad54 and other Ads: type 37 (Ad37), 64 (Ad64), and 5 (Ad5), in A549 cells quantitatively. We compared the growth rate of Ads using copy numbers and cytopathic effect observation during propagation in A549 cell lines. Expressions of mRNA of E1 gene were also calculated and compared. Phylogenetic analysis of E1 gene and E1 open reading frame (ORF), were performed. Increases in viral loads, growth rate and viral propagation were slower for Ad54 than for other Ads. Phylogenetic analysis of the E1 gene putative promoter and ORF revealed Ad54 was the closest to Ad type 8. The propagation of Ad54 in A549 is slow compared with Ad37, Ad64 and Ad5. This slow propagation could have been caused by slow genomic replication resulting from delayed viral entry or E1 transcription initiation.

研究分野：眼科学

キーワード：アデノウイルス ウイルス性結膜炎 早期転写因子 抗ウイルス薬

1. 研究開始当初の背景

(1) アデノウイルスは、流行性角結膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis; EKC) 及び咽頭結膜熱 (pharyngoconjunctival fever) などのウイルス性結膜炎を生じるが、眼科領域以外にも呼吸器系の上気道炎を生じ、特に 7 型は市中および院内感染肺炎の原因ともなり、死亡例もあるため臨床的に重要である。わが国では感染症サーベイランスによって、アデノウイルス結膜炎患者数が毎年 100 万人前後にのぼっている。多数の感染症例を毎年全国で生じていることから、臨床的及び公衆衛生学的にも、対策が必要な疾患であるが、現在までアデノウイルスに対する特異的抗ウイルス治療薬は十分に確立されていない。そこで、本研究ではアデノウイルス治療薬の臨床応用を進めるために、ウイルス薬の抗アデノウイルス作用の解析、アデノウイルス感染動物モデルの確立のための基礎研究、新型アデノウイルスへの増殖抑制作用の検討を行うことを計画した。

(2) 私と協力研究者からなる研究グループはこれまで、アデノウイルス治療薬の臨床応用をめざして、いくつかの薬物についてアデノウイルス増殖抑制作用の先行的な基礎研究を行い、それらの治療薬としての可能性を明らかにした。それらは既存の抗ウイルス薬の中で HIV 感染症に用いられる治療薬、C 型肝炎治療薬で用いられるインターフェロン、サイトメガロウイルス感染症の治療に主に用いられるガンシクロビル、アデノウイルスレセプター阻害作用薬の GRGDSP ペプチド、抗菌ペプチドである hCAP-18、および自然免疫関連物質の N-chlorotaurine などであり、これらにアデノウイルス増殖抑制作用がみられることを報告してきた。ただ、アデノウイルスにおいて型によってそれぞれの抗アデノウイルス作用の強さに差がみられることが明らかになり、無効な型も見られた。この感受性の差がアデノウイルス種間のレセプターの差異の原因となっていると考えられるファイバー領域のタンパク質によるかどうかを解析するため、アデノウイルス遺伝子の解析を行う予定とした。近年新型アデノウイルス(52 型以降)が次々と報告され、その中には 54 型や 56 型のように、わが国ですでに流行を繰り返している型もある。

2. 研究の目的

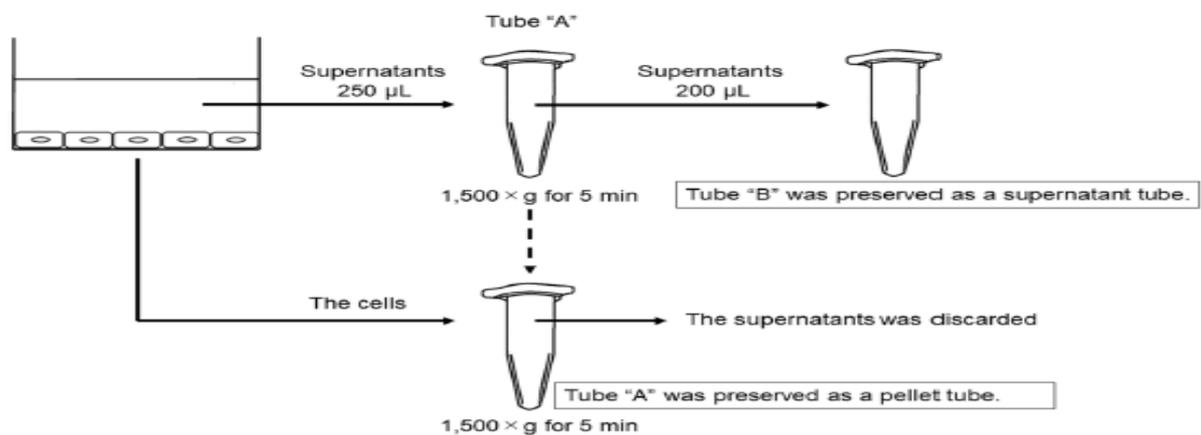
ヒトアデノウイルス(Ad)は全身のさまざまな臓器に感染する DNA ウイルスで、A から G の 7 種に分類され、そのうち D 種が主に流行性結膜炎(EKC)の原因ウイルスとして知られている。世界では D 種に属する 8 型 Ad(Ad8)が主な流行型ではあるが、日本では 54 型 Ad(Ad54)が、過去 4 年間にわたり大流行している。臨床検体を用いた Ad54 の特徴として、ウイルス分離に時間がかかり分離しにくいことが報告されているが、Ad54 のウイルス増殖について詳細に分析した基礎的研究が現在までない。今回われわれは Ad54 の増殖速度を、他の EKC を引き起こす主要な型である 37 型(Ad37)、64 型(Ad64)、コントロールとして 5 型(Ad5)と比較するため、A549 細胞を用いて定量的に分析した。

3. 研究の方法

(1) 感染細胞の観察

細胞変性(CPE)の観察: 1.0×10^5 コピー/ μL を含む合計 $50\mu\text{L}$ のそれぞれのウイルス(Ad5, 37, 54, 64)を、A549 細胞に接種し、7 日間 CPE を観察した。

Ad ウイルスゲノムコピー数(vGCN)の測定: 感染後、6 時間、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 日目(dpi)に上清とペレットに分けウイルスを回収した(図 1)。vGCN ($/\mu\text{L}$)はリアルタイム PCR で測定した。



ウイルス力価測定: A549 細胞を含む 96 ウェルに各型の 3 倍連続希釈ウイルス液を 100 μ L 接種し, 7 日間 CPE を観察した。50%組織培養感染量(TCID₅₀)を Spearman-Kärber's 法で求めた。

(2) ウイルス増殖速度の解析

増殖速度(growth rate)の計算: ウイルスの増殖速度を比較するために, 増殖速度を Ad の細胞内ゲノム増加速度(ウイルスが培養上清に排出されるまでの A549 細胞内でのゲノム複製速度)と定義した。ウイルスが上清に放出される直前の時を決定し, 接種後 6 時間でのペレット中のウイルス量との間に直線を引いた(具体的には, Ad5, 37, 64 については 6 時間, 2 dpi, Ad54 の場合は 6 時間, 3 dpi の 2 点間で直線を引いた。成長率は直線の傾き(成長率= log ウイルス量/ 時間)から計算した。統計的分析は, Tukey-Kramer 検定(N=3)を使用し, p 値 < 0.05 を統計学的有意とみなした。

(3) 初期転写因子の遺伝子解析

感染細胞あたりの初期転写因子 E1 遺伝子の発現レベルの測定: E1 遺伝子の mRNA 量を調べるために, 感染後 1, 2, 3 日においてペレットから抽出したウイルス DNA から cDNA を合成した。cDNA に含まれる各型の E1 の mRNA をリアルタイム PCR で測定した。また同時にそれぞれにペレット中に含まれる細胞数を RNase P 遺伝子を用いて測定した。細胞あたりの E1 遺伝子の発現レベルは, 式 $2^{-Ct} / \text{細胞数}$ から計算した。各実験条件を 3 つのウェルで分析し, 3 回繰り返した。統計的分析は Tukey-Kramer 検定(N=3)を使用し, p 値 < 0.05 を統計学的有意とみなした。E1 遺伝子のプロモーターと E1 オープンリーディングフレーム(ORF)を含む領域の系統解析: 増殖速度と直接的に関係する E1 領域と, その上流の推定 E1 プロモーター領域につて, Genbank から入手した Ad5 (AY339865.1), Ad37 (AB448775.1), Ad54 (AB333801.2), Ad64 (JQ326307.1), Ad8 (AB448767.1), Ad type 56 (Ad56: HM770721.2) について系統的に比較した。

4. 研究の成果

(1) CPE

図 2 は, Ad による CPE を示す。Ad5,37,および 64 に感染した A549 細胞は, 3 dpi で拡大し, 丸みを帯び明るく撮影された。4 dpi で, ウェルプレートの底(矢印)が観察できるほどに凝集した。A549 感染細胞は 4dpi で膨張

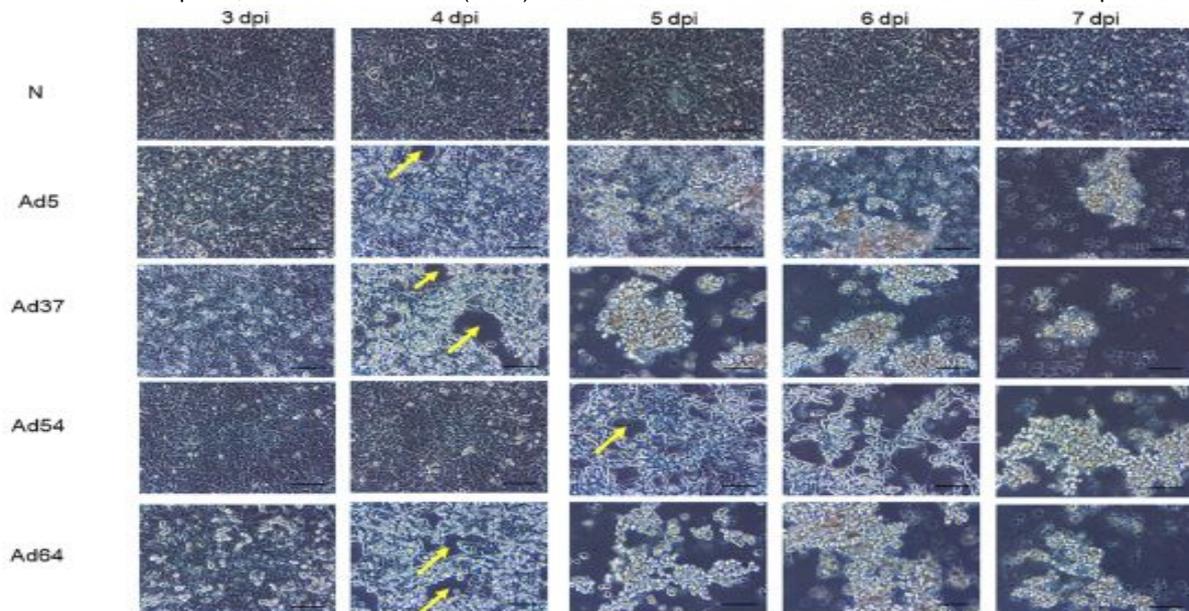


図 2. ウイルス型による細胞変性効果の比較
dpi: days per infection

し始め, 5 dpi で明確な CPE が確認された。Ad5,37,および 64 に感染した細胞は, ウェルプレートの底が観察されてから 24 時間以内にすべて培養液中に浮遊したが, Ad54 ではすべての細胞が培養液に浮遊するまで 48 時間かかった。他の型と比較して Ad54 は CPE の確認により多くの時間を要した。

(2) vGCN と TCID₅₀ の型別比較

Ad5,37,および 64 では, 1 dpi でペレットの vGCN が約 100 倍に増加した。これら 3 つの型では vGCN は 3 dpi 以内に最大である 10,000 倍に達した(図 3a)。Ad5,37,および 64 は, 2 dpi で培養上清にウイルス排出が認められた(図 3b)。Ad54 では, 2 dpi で, 接種した vGCN の 100 倍になり, 6 dpi で 10,000 倍に達した。上清へのウイルス排出は 3 dpi で観察された。他の型と比較して, Ad54 はペレットと上清の両方でウイルス増加に要する時間が長かった。TCID₅₀ は, Ad54 で最も低かった。

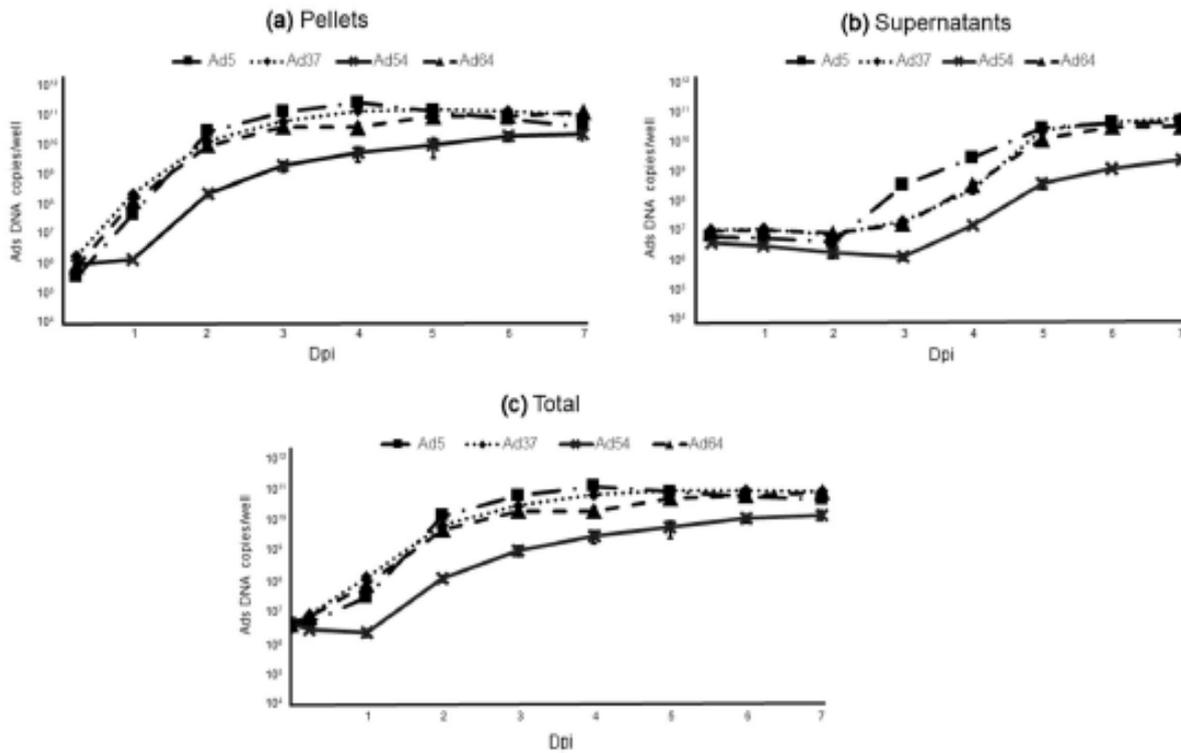


図 3. アデノウイルス DNA コピー数の型別の時間経過
Pellets; 沈渣, supernatants; 上清中の量をそれぞれ示す。

(3) 増殖速度の比較

細胞内の vGCN 増加は Ad5,37,64 では 2 dpi, Ad54 では 3 dpi に生じていた(図 3b)。増殖速度は表 1 に示す。Ad54 は他の型と比べ増殖速度が有意に遅かった。

Ad5	Ad37	Ad54	Ad64
0.11*	0.09*	0.05	0.09*

Ad human mastadenovirus
 *Significant differences ($p < 0.05$) between Ad54 and all the other Ads by one-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer post hoc test

表 1. アデノウイルス型別の増殖速度の比較

(4) 遺伝子発現の確認(図 4)

Ad54 E1 遺伝子の相対的発現レベルは, 1 dpi で他の型に感染した細胞よりも有意に低く, 2 dpi および 3 dpi で徐々に増加した。

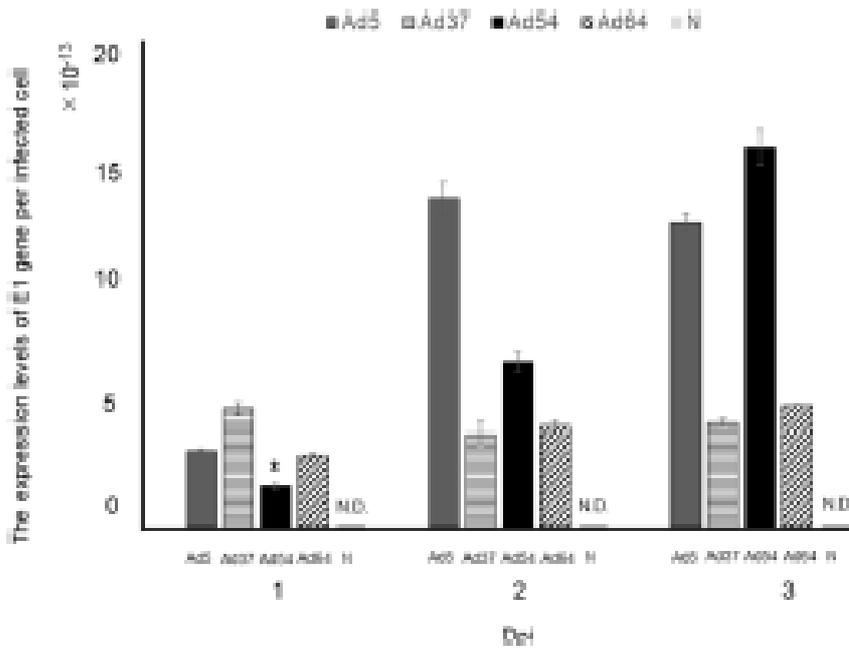


図 4. 初期転写因子 E1 遺伝子発現量の型別の時間経過比較

(5) E1 遺伝子, 推定プロモーターと ORF の系統発生分析

Ad37 と 64 の E1 遺伝子と推定プロモーター領域 ORF の DNA 配列は, 系統学的に最も近かった。Ad54 は Ad8 に最も近かった。系統発生的に Ad5 は Ad54 から最も遠かった(図 5a, b)。

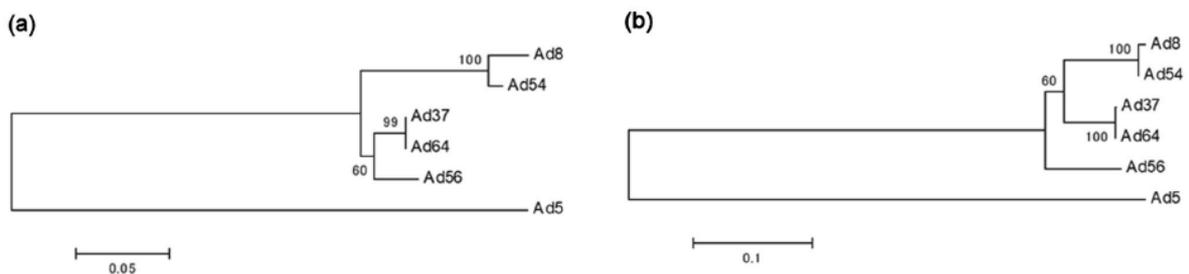


図 5. E1 遺伝子の系統解析
上流域 (a) と推定プロモーター領域 (ORF) (b) の結果を示す。

(6) 結論

A549 細胞での Ad54 の増殖速度は, Ad37, Ad64, および Ad5 と比較して遅かった。増殖速度の遅延は, ウィルスの侵入あるいは E1 転写開始の遅延が原因でゲノム複製が遅れた可能性がある。Ad54 の増殖速度が遅いことは罹病期間を延長させる可能性があり, Ad54 によって引き起こされる EKC には, さらなる注意が必要である。

< 引用文献 >

1. Tsukahara-Kawamura T, Hanaoka N, Konagaya M, Uchio E, Fujimoto T. Characteristic of slow growth in cell culture of adenovirus type 54 causing nationwide outbreak epidemic keratoconjunctivitis in Japan. *Jpn J Ophthalmol* 64: 2020, 312-320
2. Uemura T, Migita H, Ueno T, Tsukahara-Kawamura T, Saeki Y, Fujimoto T, Uchio E. Clinical and virological analysis of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 54 in a regional ophthalmic clinic in Kyushu, Japan. *Clin Ophthalmol* 12: 2018, 511-517

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shoji J, Ohashi Y, Fukushima A, Miyazaki D, Uchio E, Takamura E, Fujishima H, Namba K, Kumagai N, Ebihara N, Okamoto S	4. 巻 44
2. 論文標題 Topical tacrolimus for chronic allergic conjunctival disease with and without atopic dermatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Eye Res	6. 最初と最後の頁 796-805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02713683.2019.1600197.	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 Uchio E, Saeki Y, Tsukahara-Kawamura T, Kadonosono K, Ozaki H	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical outcome after air-assisted manual deep anterior lamellar keratoplasty for fungal keratitis poorly responsive to medical treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Ophthalmol 13	6. 最初と最後の頁 1913-1919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/OPHTH.S211099.	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 -
1. 著者名 Miyazaki D, Fukagawa K, Fukushima A, Fujishima H, Uchio E, Ebihara N, Shoji J, Takamura E, Namba K, Ohashi Y, Okamoto S, Satake Y, Ohtsu H, Shimizu Y, Inoue Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Air pollution significantly associated with severe ocular allergic inflammatory diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54841-4.	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 -
1. 著者名 Yamana Y, Fukuda K, Ko R, Uchio E	4. 巻 39
2. 論文標題 Local allergic conjunctivitis: a phenotype of allergic conjunctivitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 2539-2544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10792-019-01101-z.	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 Matsuura K, Terasaka Y, Uchio E, Saeki Y, Fujimoto T, Hanaoka N, Miyazaki D, Inoue Y	4. 巻 19
2. 論文標題 Human adenoviral type 54 keratoconjunctivitis accompanied by stellate keratitis and keratic precipitates: two cases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmol 19, 72019	6. 最初と最後の頁 72019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-018-1025-6.	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 -

1. 著者名 Okamura KShimokawa A, Takahashi R, Saeki Y, Ozaki H, Uchio	4. 巻 14
2. 論文標題 Finite element analysis of air gun impact on post-keratoplasty eyeE	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 179-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OPHTH.S236825.	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 -

1. 著者名 Migita H, Ueno T, Tsukahara-Kawamura T, Saeki Y, Hanaoka N, Fujimoto T, Uchio E	4. 巻 257
2. 論文標題 Evaluation of adenovirus amplified detection of immunochromatographic test using tears including conjunctival exudate in patients with adenoviral keratoconjunctivitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 815-820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-019-04281-7	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 Fujimoto T, Hanaoka N, Konagaya M, Kobayashi M, Nakagawa H, Hatano H, Tsukahara-Kawamura T, Uchio E, Kaneko H	4. 巻 81
2. 論文標題 Evaluation of a silver-amplified immunochromatography kit for adenoviral conjunctivitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Virol	6. 最初と最後の頁 1030-1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25404	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 Uemura T, Migita H, Ueno T, Tsukahara-Kawamura T, Saeki Y, Fujimoto T, Uchio E	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical and virological analysis of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 54 in a regional ophthalmic clinic in Kyushu, Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 511-517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OPHTH.S148264	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 -

1. 著者名 Tsukahara-Kawamura T, Fujimoto T, Gonzalez G, Hanaoka N, Konagaya M, Arashiro T, Saeki Y, Uchio E	4. 巻 71
2. 論文標題 Epidemic of adenovirus types 8 and 54 at Fukuoka University Hospital	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 322-324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2017.349	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 -

1. 著者名 Kadonosono K, Yamane S, Inoue M, Yamakawa T, Uchio E	4. 巻 8
2. 論文標題 Intra-retinal arterial cannulation using a microneedle for central retinal artery occlusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19747-7	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Ko R, Uchio E
2. 発表標題 Effects of aerosol particulate matter on a reconstructed human cornea
3. 学会等名 89th ARVO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada K, Ko R, Saeki Y, Uchio E
2. 発表標題 Analysis of relationship between exacerbation of vernal keratoconjunctivitis and atmospheric PM 2.5 concentration
3. 学会等名 89th ARVO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamura K, Oshio T, Uchio E
2. 発表標題 Treatment outcome of acanthamoeba keratitis in the last decade
3. 学会等名 89th ARVO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto M, Mimura T, Mizota A, Fukagawa K, Uchio E, Ko R, Fujishima H
2. 発表標題 Usefulness of eyewash solution on allergic conjunctivitis
3. 学会等名 89th ARVO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内尾英一
2. 発表標題 前眼部炎症疾患の診断と治療
3. 学会等名 第36回九州視機能研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saeki Y, Ueno T, Migita H, Kawamura T, Uchio E
2. 発表標題 Evaluation of adenovirus amplified detection kit using tears including conjunctival exudate
3. 学会等名 88th ARVO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mishima A, Saeki Y, Uchio E
2. 発表標題 Long-term prognosis of vernal keratoconjunctivitis
3. 学会等名 88th ARVO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ko R, Hayashi M, Tanaka M, Uchio E
2. 発表標題 Effects of Asian dust particles in a reconstructed cultured human corneal epithelial model
3. 学会等名 88th ARVO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松浦一貴, 井上幸次, 宮崎大, 内尾英一, 佐伯有祐, 寺坂祐樹, 藤本嗣人, 花岡希
2. 発表標題 アデノウイルス54型結膜炎に伴う豚脂様角膜後面沈着物および星芒状角膜炎
3. 学会等名 第55回日本眼感染症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内尾英一
2. 発表標題 眼科外来・病棟の感染症対策
3. 学会等名 第55回日本眼感染症学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 内尾英一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 1066
3. 書名 Pocket Drugs2019	

1. 著者名 内尾英一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 244
3. 書名 アレルギー診療重要基礎知識40・医学の歩みBook, トータルアプローチ	

1. 著者名 内尾英一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 1568
3. 書名 私の治療 2019-20年度版	

1. 著者名 内尾英一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 401
3. 書名 現代の眼科学, 改訂第13版	

1. 著者名 内尾英一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 407
3. 書名 標準眼科学, 第14版	

1. 著者名 内尾英一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 1066
3. 書名 Pocket Drugs 2018	

〔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
---------	---------