

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21780274

研究課題名 (和文) サルにおけるデングウイルス感染症モデルの開発

研究課題名 (英文) Development of a nonhuman primate model for dengue virus infection

研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI TAKESHI)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：90324847

研究成果の概要 (和文)：デングウイルス (DV) のサル病態モデルの開発を目指して、アカゲザルにおける DV 2 型、4 型の増殖能について検討した。その結果、DV 接種ザルではデング熱・出血熱様症状は観察されなかったが、感染 2~3 日後で血中に約 4×10^3 コピーのウイルス RNA が検出された。DV 標的細胞であるサル単球由来マクロファージ (MDM) に感染させたところ、DV はアカゲザル由来 MDM と比較して、ボンネットモンキー由来 MDM で効率よく複製することが示された。これらの結果から、ボンネットモンキーは DV 病態モデルの開発に有用であることが示唆された。

より効率の高いリバースジェネティクス (RG) 系の開発を目的とし、DV と同属のダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) でウイルスゲノム全長 cDNA を直接細胞内に導入することにより、組換えウイルスを作出できる plasmid-based RG 系の開発を行った。さらに、TBEV フルゲノム cDNA を重複領域を含むように複数の断片に分割したフラグメントを細胞に同時に導入することでも (相同組換え RG 系)、組換えウイルスの作出に成功した。DV においても効率が低いながら同様の系の開発に成功し、この系の確立はサルにおいて高病原性を示す組換えウイルス作出のため、極めて有用なツールと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：To develop a nonhuman primate model for dengue virus (DV) infection, rhesus monkeys were inoculated with DV types 1 and 2. The DV types 1 and 2 induced viremia with duration from 2 to 3 days and a mean peak titer of 4×10^3 RNA copies/ml but infected monkeys showed no sign of dengue diseases even after inoculation of high virus doses. DV type 2 effectively replicates in MDM cells derived from bonnet monkeys compared to those derived from rhesus monkeys. These results suggest that bonnet monkey may be a useful model to study dengue disease.

To improve a reverse genetics for tick-borne encephalitis virus (TBEV) which belongs to the same member of the *Flavivirus* genus as DV, we have constructed a plasmid-based infectious clone encoding full-length TBEV cDNA under control of the minimum cytomegalovirus promoter. Transfection of cells with the plasmid resulted in the production of infectious TBEV at high levels. Furthermore, we have developed homologous recombination-based reverse genetics for TBEV and DV. The reverse genetics approaches described here can be exploited for studies of DV replication and pathogenesis as powerful tools.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			

年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：デングウイルス、サルモデル

1. 研究開始当初の背景

デングウイルス (DV) は、蚊媒介性ウイルスであり、ヒトに感染すると典型的な症状として、熱性疾患であるデング熱あるいは致命的疾患であるデング出血熱を引き起こす。DV の病態機序の解明、予防・治療法の確立を行う上で疾患モデルの開発は重要な研究課題である。しかし、DV 感染症の有用な動物モデルの開発は遅れている。これまで、デング熱・出血熱発症モデルの開発の試みは、マウスを用いた研究が数多くなされている。DV 感受性細胞を移植した免疫不全マウスやインターフェロン (IFN) α/β 、IFN γ レセプターのノックアウトマウス等が開発されている。しかし、これらのマウスモデルでは、DV の増殖性が低いこと、ヒトのデング熱・出血熱で認められる病態を忠実に反映していないことから、より有用な病態モデルの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究課題は、リバーシジェネティクス (RG) 系を駆使することにより、人工的に改変したサル強毒組換え DV を作出し、サルにおけるデング熱・出血熱発症モデルの開発を目的とする。

3. 研究の方法

DV におけるサル病態モデルの開発のため、アカゲザル2頭に DV 2型、4型を各 3×10^7 PFU 静脈内接種した。接種後 14 日まで採血し、血中のウイルス RNA および血小板の量を測定した。サル初代細胞における DV 複製能を検討するため、サル血液由来末梢血単核球または単球由来マクロファージ (MDM) を調整し、感染実験を行った。ウイルス価はブランク法にて決定した。フラビウイルスにおける効率の高い RG 系の開発を行うため、全

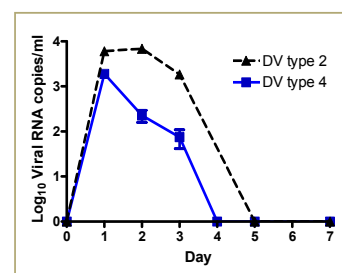
長ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) cDNA をサイトメガロプロモーターと polyA シグナル配列の間に挿入したプラスミドを作製した。作製したプラスミドを培養細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、産生された組換えウイルス量はブランク法にて決定した。宿主の相同組換え機構を利用した新規 TBEV および DV の RG 系の確立は重複領域 (約 100bp) を持つ分割した全長ウイルス cDNA フラグメントを培養細胞に同時にトランスフェクションすることで行った。

4. 研究成果

(1) サルにおけるウイルス増殖能の検討

DV のサル病態モデルの開発を目指して、アカゲザル 2 頭に DV 2 型、4 型を静脈内接種した。感染 2~3 日後で血中に約 3×10^3 コピーのウイルス RNA が検出されたが、デング熱・出血熱様症状は観察されなかった。サル馴化 DV を作出するため、MDM に感染させたところ、DV はアカゲザル由来 MDM と比較して、

ボンネットモンキー由来 MDM で効率よく複製することが示



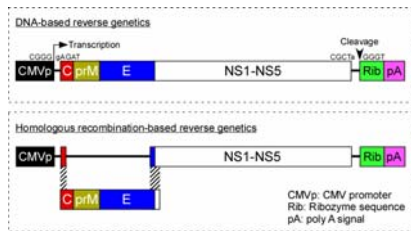
された。この結果から、ボンネットモンキーも DV 病態モデルの開発に有用であることが示唆された。

(2) 新規 RG 系の開発

フラビウイルスの一般的な RG 系は合成したウイルス RNA を細胞内に導入することで組換えウイルスの作出を行っている。本研究では、より効率の高い RG 系の開発を目的と

し、DV と同属の TBEV でウイルスゲノム全長 cDNA を直接細胞内に導入することにより、組換えウイルスを作出できる plasmid-based RG 系の開発を行った。さらに、

TBEV
フルゲ
ノム
cDNA
を重複
領域
(100b



p 前後) を含むように複数の断片に分割したフラグメントを細胞に同時に導入することでも (相同組換え RG 系)、組換えウイルスの作出に成功した。DV においても効率が低いながら同様の系の開発に成功した。

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4件)

- 1) Ooms, L.S., T. Kobayashi, M.Ikizler, J. D. Chappell, and T. S. Dermody. (2010) A post-entry step of the mammalian orthoreovirus replication cycle is a determinant of cell tropism. *J. Biol. Chem.* 285: 41604-41613.
- 2) Kobayashi, T., L. S. Ooms, M.Ikizler, J. D. Chappell, and T. S. Dermody. (2010) An Improved Reverse Genetics System for Mammalian Orthoreoviruses. *Virology.* 398: 194-200.
- 3) Kobayashi, T., L. S. Ooms, J. D. Chappell, and T. S. Dermody. (2009) Identification of Functional Domains in Reovirus Replication Proteins muNS and mu2. *J. Virol.* 83: 2892-2906.
- 4) Zurney, J., T. Kobayashi, G. H. Holm, T. S. Dermody, and B. Sherry. (2009) The Reovirus mu2 Protein Inhibits Interferon Signaling Through a Novel Mechanism Involving Nuclear Accumulation of Interferon Regulatory Factor-9. *J. Virol.* 83: 2178-2187.

[学会発表] (計8件)

- 1) 中村仁美、大附寛幸、松田健太、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル指向性ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第24回日本エイズ学会学術集会、2010年11月24-26日、東京 (口頭発表)
- 2) 藤田泰久、大附寛幸、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術によるCCR5指向性clade C HIV-1株のenv領域を持ったSHIVの作製、第24回日本エイズ学会学術集会、2010年11月24-26日、東京 (口頭発表)
- 3) 大附寛幸、藤田泰久、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術によるR5指向性 clade C env を持つサル指向性 HIV-1 の創出、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日-9日、徳島 (口頭発表)
- 4) 仲宗根咲子、松山めぐみ、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：マクロファージにおける霊長類レンチウイルス出芽様式の超微形態学的解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島 (ポスター発表)
- 5) 堀池麻里子、松山めぐみ、安井美加、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：多剤併用療法実施下のサルエイズモデルにおけるリンパ節内でのウイルス新規感染の可能性、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島 (口頭発表)
- 6) Laura S. Ooms, Takeshi Kobayashi, Terence S. Dermody, and James D. Chappell. "Identification of Reovirus Cell-tropism Determinants in Replication Protein mu2" American Society for Virology 28th Annual meeting, Vancouver, BC, Canada July 11-15, 2009 (oral presentation)
- 7) Shane D. Trask, Zenobia F. Taraporewala, Takeshi Kobayashi, Andrew J. Rolle, Terence S. Dermody, and John T. Patton.

“Strategies to Develop Recombinant Rotavirus” American Society for Virology 28th Annual meeting, Vancouver, BC, Canada July 11-15, 2009 (poster presentation)

- 8) 小林剛：分節 2 本鎖RNA ウイルスにおける遺伝子操作系の確立、ウイルス学会湯河原キャンプ、2009 年 6 月 29-30 日、湯河原（招待講演）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI TAKESHI)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：90324847

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：