

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790444

研究課題名（和文）

デングウイルス感染者個体内擬似種とその細胞嗜好性の解析

研究課題名（英文）

Analysis of dengue virus quasispecies and their cell tropism.

研究代表者

黒須 剛（ KUROSU TAKESHI ）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70432432

研究成果の概要（和文）：デングウイルス（DENV）は遺伝的な差異を持つ雑多なウイルス集団として存在する。本研究ではこの点に着目し、ウイルスの解析を質的な面から見直すため、新たな観点と手法による分子生物学的な解析を目的とした。DENV感染症は二回目の感染により重症化し易い。一回目にDENVに感染した患者及び二回目に感染した患者から分離した2型DENV遺伝子配列の多様性を比較したところ、前者ではウイルスの多様性が高く、後者では低いことが明らかになった。この観察は、二次感染では効果的にウイルスが選択されている可能性を示唆する。さらに効果的なウイルス遺伝子と性状の解析方法を開発し、DENVの多様性が動的に移り変わっていくことを観察した。

研究成果の概要（英文）：Dengue virus (DENV) is known to exist as various virus population, so-called quasispecies. In this study, we focused on the DENV quasispecies to take a new approach to analyze DENV. DENV easily cause severe illness when patients are secondary infected with DENV. We analyzed the sequences of DENV derived from primary and secondary infection, and then found that the DENV from primary infections carried broad range of variation in DENV genomes, contrary DENV from secondary infection were homogenous. This suggests that DENV from secondary infection effectively selected in secondary infections. Furthermore, we developed an effective protocol for the analysis of DENV quasispecies and observed the virus population was switch to one population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：デングウイルス、フラビウイルス、ウイルス疑似種、感染症、熱帯病

## 1. 研究開始当初の背景

（1）デングウイルス研究では病原性の高いウイルスまたは病原性に関与する遺伝子は同定されていない。デング熱・出血熱は宿所の過剰な生体防御反応が原因と考えられて

いたため、ウイルス研究は診断目的以外には過小評価されてきた。しかし見逃されている部分があり、①一つは異なる型のウイルスの違いの評価であり、②もう一つはウイルスの（疑似種）quasispeciesである。過去の疫学

的観察から、血清型の異なるウイルスは異なる性状を保持していると考えられる。今までその点が不明だったのは、デングウイルスが多様な細胞嗜好性を持つ、quasispeciesのある集団として蚊-ヒト間を伝播していった点を見逃しているからである。この結果、多様性を示すウイルス集団のうち、マウス脳または蚊のC6/36細胞に適合した選択されたウイルスのみを解析していたことが問題と考えられる。本研究は、実際にどれだけ多様なウイルスが個々の感染者に存在するか実態を明らかにし、効果的な解析方法を開発することを目的とした。

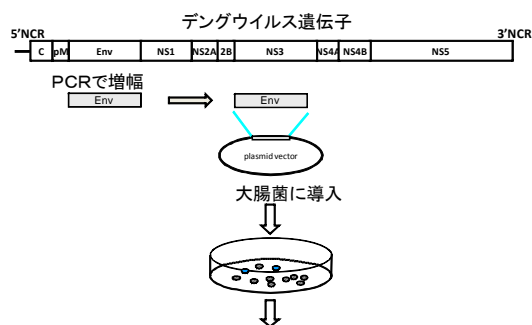
## 2. 研究の目的

- (1) デングウイルスの感染者個体内での疑似種を、ウイルス遺伝子を解析することにより明らかにする。
- (2) 効果的なウイルス疑似種の解析方法を開発し、それを用いた解析をする。

## 3. 研究の方法

### (1) 患者由来ウイルスの遺伝子配列解析

タイ国でデングウイルスに感染した患者由来のウイルスの遺伝子を解析した。患者ペア血清をIgG及びIgM capture ELISA方により、一次感染と二次感染とを区別した。分離ウイルスからRNAを抽出し、RT-PCR法によりエンベロープ遺伝子をプラスミドベクターにクローニングした(図1)。一人の患者から10~17個の遺伝子配列を決定した。得られた配列はMEGA4を用いて遺伝子の多様性を解析した。



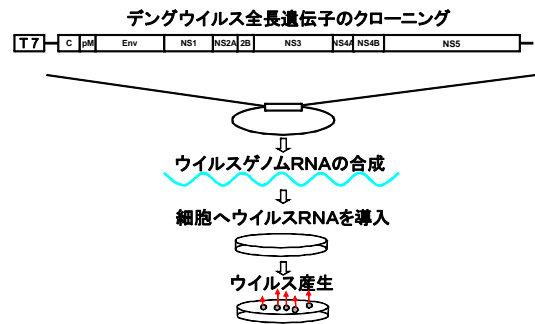
(図1 エンベロープ遺伝子クローニング)

### (2) 新規のウイルス分離・解析方法の開発

ウイルス解析のために何度もウイルスを継代すると、培養中にウイルス遺伝子に変異が誘導されることが多い。しかし、臨床サンプルからのデングウイルス分離には、解析のために増殖する必要がある。この点を改良するため以下の方法を用いた。

- ① PCRを用いてウイルス遺伝子全長を増殖し、感染性プラスミドクローンを作成した。感染性プラスミドクローンからウ

イルスを産生し、そのウイルス性状を解析した(図2)。



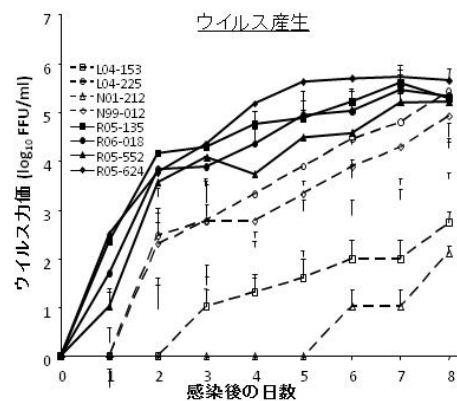
(図2 ウイルス全長遺伝子のクローニングとウイルス産生)

- ② デングウイルス産生を亢進する宿主・ウイルス因子を探索するため、これらを発現した培養細胞でのウイルス増殖を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) デングウイルス感染者個体内疑似種の性状・遺伝子配列解析

デングウイルス感染者個体内疑似種の遺伝・系統学的解析のために、一次感染、二次感染それぞれの感染者血清からEnv領域の遺伝子配列解析を行った。その結果、2型デングウイルスでは一次感染者由来のウイルス遺伝子より広い多様性が観察された。二次感染者由来ウイルス遺伝子の低い多様性は、中和能のない抗体による選択(抗体依存性感染増強)が起こったためと考えられた。さらにウイルスの増殖性(図3)及びプラーク形成の解析から、ウイルス集団は完全な選択や淘汰を起こすのではなく、多様性を保持した集団としてヒトと蚊の間で流行しており、ウイルス疑似種集団のスイッチが起こっていると推測された。これらの観察は、2型デングウイルスが容易には一次感染で症状を起こさず、二次感染でより重篤な感染を起こす臨床像と関連があると考えられた(論文投稿中)。

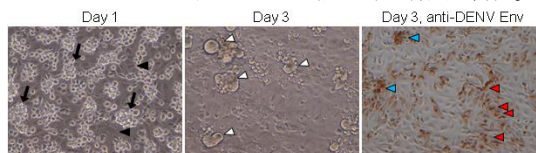


(図3 破線で示されている一次感染由来のウイルスは増殖が悪い。)

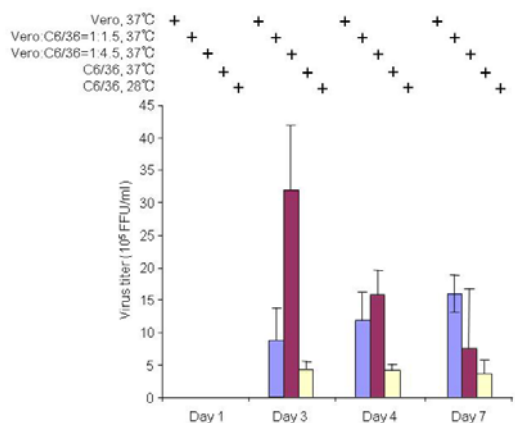
### (3) 新規のウイルス分離・解析方法の開発

①デングウイルスは、特に臨床分離株の場合培養細胞での増殖性が悪く、何度も継代を繰り返さなければ使用に十分な力価を得られなかった。従来方法では、継代によりウイルス遺伝子に変異が誘導される可能性が高く、多様性解析には大きな障害であった。この点を解決するため、継代を経ないウイルス遺伝子を直接RT-PCRで増幅し、デングウイルス感染性クローンを作成した。感染性クローンから従来方法でウイルス回収を行うと、低回収量のため、やはり何代かの継代が不可欠であった。この点を飛躍的に改良し、蚊由来細胞とVero細胞を共培養(図4)することで、トランスフェクション後3日で高力価のウイルス粒子を回収することが可能になった(図5)。以前はこの過程に継代が必要で、2週間から3週間必要であった。時間的な短縮をはかれ、しかも継代によるウイルス遺伝子への変異の誘導の可能性も改善された。

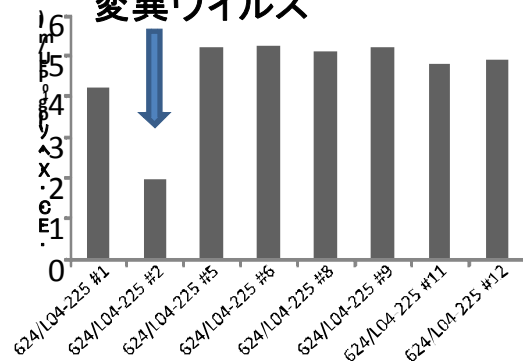
この方法を用いて臨床分離株について解析し、従来方法では同定困難であった変異ウイルスを同定した。さらに実際に培養細胞中で変異が誘導され、ウイルス集団がスイッチしていくことを証明した(図6)(報告済)。



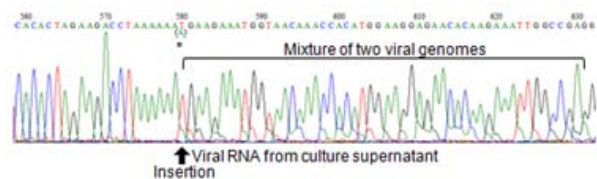
(図4 共培養したVero細胞とC6/36細胞にデングウイルスが感染。矢印黒: C6/36細胞、矢頭黒: Vero細胞、矢頭白: ウイルス感染による細胞変性効果、矢頭緑と赤: 特異的抗体で染色されたC6/36細胞とVero細胞にそれぞれに感染したデングウイルス。)



### 変異ウイルス



(図5 感染後3日目に高いウイルス産生)



(図6 2種類のウイルス集団が存在。2種類のウイルス遺伝子が確認された。)

②培養細胞によるウイルス分離効率を高めるために、デングウイルス、日本脳炎ウイルスタンパク質及び種々の宿主因子を発現した細胞でのデングウイルス産生について検討した。その結果、日本脳炎ウイルスの一部タンパク質がデングウイルス産生効率を高めることを観察した(論文投稿準備中)。

### (まとめ)

本研究により一次感染と二次感染に由来するウイルスの多様性が異なることを明らかにし、感染性ウイルスクローンを用いた高効率の解析方法も開発した。このことから以下のような仮説が考察される。

ウイルス成分を発現した細胞を用いた分離法の開発は、日本脳炎由来タンパクの発現によりデングウイルス産生が上昇することを確認した。この系の応用による今後の解析に期待できる。

### 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3件)

- ① Kurosu T. Quasispecies of dengue virus. Tropical Medicine and Health, Japanese

Society of Tropical Medicine. in press  
(2011) 査読無

- ② Masrinoul P., Diata MO., Pambudi S., Limkittikul K., Ikuta K. and Kurosu T. Highly conserved region 141-168 of the NS1 protein is a newly identified common epitope region of dengue virus. Jpn J Infect Dis. 64. 109-115 (2011) 査読有
- ③ Kurosu T., Khamlert C, Phanthawiboon S, Ikuta K and Anantapreecha S. Highly Efficient Rescue of Dengue Virus Using a Co-culture System with Mosquito/Mammalian Cells. Biochem Biophys Res Commun. 394. 398-404 (2010) 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① Kurosu T. Possible effect of quasispecies to strategy against dengue virus. Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, 2010年12月3日 Bangkok, Thailand
- ② Kurosu T. Infection of mouse cells with dengue virus and Japanese encephalitis virus. Asia-Africa Research Forum 2010, 2010年11月12日 Hanoi, Viet Nam
- ③ 黒須 剛、Chidchanok Khamlert、Supranee Phanthawiboon、青枝大貴、大畑敬一、Juan F Arias、中村祥子、Surapee Anantapreecha、石井 健、生田和良 マウスにおけるデングウイルス及び日本脳炎ウイルス感染機序 日本ウイルス学会大 58 回学術集会 2010年11月7日 徳島
- ④ 黒須 剛、Chidchanok Khamlert、Supranee Phanthawiboon、生田和良、Surapee Anantapreecha タイに流行するデングウイルスの多様性 日本ウイルス学会大 58 回学術集会 2009年10月26日 東京
- ⑤ 黒須 剛、Chidchanok Khamlert、Supranee Phanthawiboon、生田和良、Surapee Anantapreec タイに流行する2型デングウイルスの多様性 第50回日本熱帯医学会大会 総会 2009年12月22日 沖縄

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒須 剛 (KUROSU TAKESHI)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：70432432

### (2) 研究協力者

Surapee Anantapreecha  
National Institute of Health, Department  
of Medical Sciences, Thailand