

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02364

研究課題名（和文）豚繁殖・呼吸障害症候群ワクチン開発に向けたウイルス増殖性規定要因の解明

研究課題名（英文）investigation of determinants for virus replication toward vaccine development against porcine reproductive and respiratory syndrome

研究代表者

小澤 真 (Ozawa, Makoto)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：50568722

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：各種化合物を用いて細胞周期を同調させた培養細胞にPRRSウイルスを接種し、感染細胞の割合を計測・比較することで、細胞のPRRSウイルスに対する感受性は細胞周期に依存することを明らかにした。また遺伝的背景の異なるPRRSウイルス4株を用いて、各ウイルス株の持続感染細胞株を樹立した。これらの持続感染細胞株は、培養上清中に高力価の感染性ウイルスを産生しながら増殖すること、さらに同種または異種のPRRSウイルス株による重感染に対して細胞変性効果を示すことなく増殖し続けることを確認した。またRNAseq解析により、各持続感染細胞株に共通する特徴的な遺伝子発現パターンを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝的背景の異なるPRRSウイルス4株を用いて樹立した持続感染細胞株が、同種または異種のPRRSウイルス株による重感染に対して抵抗性を示したことから、PRRSウイルスが「細胞レベルの干渉現象」を引き起こす特性を備えている可能性が示された。この特性には、各持続感染細胞株に共通して確認された特徴的な遺伝子発現パターンが関与していると考えられる。その背景にある分子生物学的な仕組みを解明することで、現行のPRRSワクチンの作用機序の解明だけでなく、より効果的な新しいPRRS対策の確立も期待できる。PRRSの制御は国内外の養豚業の悲願であり、本研究成果の社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We synchronized cultured cells at various stages of the cell cycle using different compounds and subsequently inoculated them with the PRRS virus. Measurement and comparison of the proportion of infected cells revealed that the susceptibility of cells to the PRRS virus depends on the cell cycle. Furthermore, we established persistent infection cell lines for each of the four genetically distinct PRRS virus strains. These cell lines were confirmed to continuously proliferate while producing high-titer infectious virus in the culture supernatant, and to continue proliferating without showing cytopathic effects upon superinfection with either homologous or heterologous PRRS virus strains. Additionally, RNAseq analysis revealed characteristic gene expression patterns shared among each persistent infection cell line.

研究分野：ウイルス学、動物衛生学

キーワード：豚繁殖・呼吸障害症候群 ウイルス増殖 持続感染 干渉現象

1. 研究開始当初の背景

豚繁殖・呼吸障害候群 (PRRS) は、PRRS ウイルスによって引き起こされる豚の感染症で、妊娠母豚では流死産や受胎率低下を伴う繁殖障害、子豚では発育不良につながる呼吸器障害が見られる。養豚産業に与える影響は甚大で、世界各国で最も大きな経済的被害をもたらす豚感染症のひとつとして認知されている。多くの農場で弱毒生ワクチンが使用されているが、その効果は限定的で、被害は年々拡大している。

そもそも、PRRS 弱毒生ワクチンの正確な作用機序はわかっていない。PRRS ウイルスの主要な表面糖蛋白質は遺伝的多様性に富み、その防御免疫における中和抗体の役割は限られるが、細胞性免疫の役割・重要性を示す十分な科学的根拠もない。一方多くの農場では、理論上長期の免疫持続が期待できるはずの弱毒生ワクチンを、同一個体に年 4~6 回も繰り返し接種する。また繰り返しワクチン接種した個体では抗ウイルス特異抗体が漸減し、しかも特異抗体が一定の水準以下に減少することが「免疫状態の安定化」の指標とされている。これらの ~ の事象は従来の免疫学の知見とは合致しないが、実際に一定の予防効果が得られることから、養豚業界では広く受け入れられている。そこで申請者は、ウイルス学的な見地から ~ の事象を考察し、当該弱毒生ワクチンの作用機序として下記の仮説を立てた。

1. 免疫学的にナイーブな個体に接種されたワクチン株は、生体内のマクロファージ系細胞に感染するが、その細胞機能に大きな影響は与えることなくウイルス感染状態を維持する。
2. ワクチン株が感染しているマクロファージ系細胞は、何らかの機序によって野外株の重感染を阻止する (いわゆるウイルス干渉現象)。
3. 生体内のマクロファージ系細胞は、その寿命 (ヒトやマウスの場合数ヶ月) が尽きると役割を終える。一方、骨髄からは一定の頻度で産生される新たなマクロファージ系細胞は、ワクチン株に感染していないため、野外株に対しても感受性を示す。また野外株に感染したマクロファージ系細胞は、その機能が著しく損なわれる。
4. 生体内におけるワクチン株非感染マクロファージ系細胞が一定の割合を占める個体が野外株に感染した場合、種々の症状を示す。
5. 年 4~6 回のワクチン接種は、「生体内における一定割合のマクロファージ系細胞をワクチン株が感染・占拠し続ける状態」の維持に貢献し、結果的に一定のワクチン効果を発揮する。

この仮説の立証には、PRRS ウイルス感染における「細胞レベルの干渉現象」の証明が不可欠で、実験条件下では一時的に全ての培養細胞に PRRS ウイルスを感染させる必要がある。そこで予備実験として、1 細胞当たり 10 個の感染性 PRRS ウイルス (多重感染度 [MOI] = 10) に相当するワクチン株を培養細胞へ接種した。寒天含有培地を重層して培養し抗 PRRS ウイルス抗体を用いてウイルス感染細胞を可視化したところ、予想に反して一部の細胞のみがウイルスに感染していた。一方、寒天含有培地の代わりに液体培地を用いて同様の実験を実施すると、ほぼ全ての細胞がウイルスに感染した。この結果は、一定時間内では細胞集団の一部のみがウイルス感受性を示すことを意味し、細胞の PRRS ウイルス感受性が細胞周期に依存することを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、PRRS ウイルスの分子生物学的な基礎研究に取り組み、ウイルス学的な特性に関する新たな知見を得ることで、より効果的な PRRS 対策を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PRRS ウイルスに高い感受性を示すサル腎臓由来 MA104 細胞の培地へ、細胞周期を同調させる化合物 (表 1) を添加して 24 時間培養した (同調培養)。通常培地へと置換した後、非同調培養条件下で MOI = 0.5 となるように調整した PRRS ワクチン株 Ingelvac PRRS MLV を接種して、さらに 24 時間培養した。培養細胞をホルマリンで固定し、抗 PRRS ウイルス N タンパク質抗体を用いて免疫染色を行った。

表 1. 細胞周期の同調に使用した化合物

番号	化合物名	細胞への作用
No. 1	Aphidicolin	S 期で停止
No. 2	Camptothecin	G2/M 期で停止
No. 3	Colcemid	細胞分裂を阻害
No. 4	5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylben	G1/S 期で停止
No. 5	Emetine, Dihydrochloride	蛋白質合成を抑制
No. 6	Etoposide	G2 期で停止
No. 7	5-Fluorouracil	G2 期で停止
No. 8	KN-93	G1 期で停止
No. 9	Okadaic Acid, Prorocentrum sp.	蛋白質リン酸化を抑制
No. 10	Vinblastine Sulfate	G2/M 期で停止

(2) PRRS ウイルスの生体内標的細胞・豚肺胞マクロファージに由来する不死化細胞株 PAM-T43 細胞へ、遺伝的背景の異なる PRRS ウイルス 4 株 (表 2) をそれぞれ接種した。接種したウイルス株の種類に依らず、大多数の細胞が細胞変性効果を示しながら死滅した中、ごく少数の PAM-T43 細胞が生残して増殖し続けたことから、それぞれ培養・継代を続けた。各生残細胞株の培養上清を検体として、(i)リアルタイム PCR 法によりウイルス遺伝子を検出・測定し、また(ii)感染性ウイルスの有無も確認した。さらに(iii)各生残細胞株に対して、同種ならびに異種ウイルス株を重感染させ、その後の経過を観察した。

ウイルス株名	遺伝的分類	特性など
Ingelvac PRRS MLV	クラスターII	B 社ワクチン株
Fostera PRRSV	クラスターI	Z 社ワクチン株
KU-PYH-9/15	クラスターIII	野外株
KU-27-156K	クラスターIV	野外株

(3) PRRS ウイルス 4 株 (表 2) の接種後も生残して増殖し続けた PAM-T43 細胞 4 株から RNA を抽出して RNAseq 解析を行い、各細胞内における宿主遺伝子の発現パターンを調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞の PRRS ウイルス感染に対する感受性に細胞周期が与える影響を検証するため、種々の化合物 (表 1) で同調培養した MA104 細胞へ PRRS ウイルスを接種し、抗 PRRS ウイルス N タンパク質抗体を用いた免疫染色によりウイルス感染細胞を可視化した (図 1)。

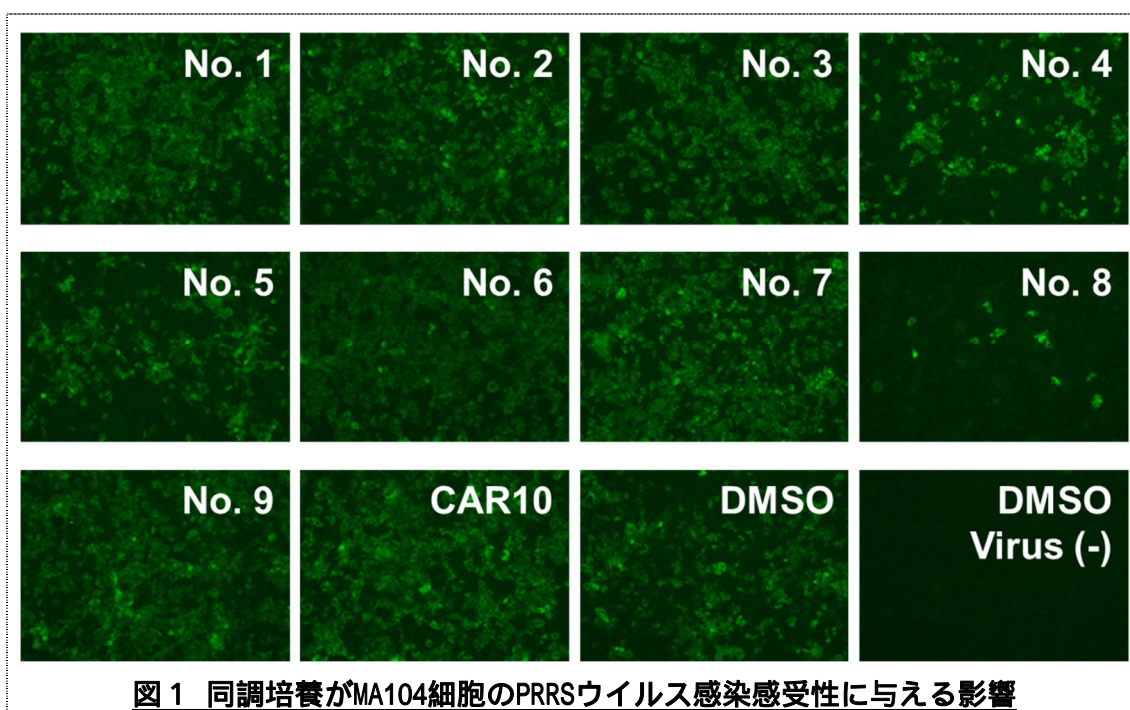


図 1 同調培養がMA104細胞のPRRSウイルス感染感受性に与える影響

各化合物の溶媒である DMSO を作用させた非同調培養条件下では、およそ 50%の細胞で抗体陽性反応が確認され、同様の染色パターンが多くの同調培養細胞でも見られた。その一方で、細胞周期を G1/S 期で停止させる 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylben (No. 4) ならびに G1 期で停止させる KN-93 (No. 8) を作用させ細胞では、抗体陽性細胞の数が明らかに少なかった。これらの結果から、細胞の PRRS ウイルスに対する感受性は細胞周期に依存し、特に G1 期の細胞は感受性が大きく低下することが明らかとなった。

(2) 遺伝的背景の異なる PRRS ウイルス 4 株 (表 2) を接種した PAM-T43 細胞のうち、ごく少数の細胞が生残して増殖し続けたことから、これら細胞株の性状解析を行った。3 回継代後の各生残細胞株の培養上清は、(i)極めて多くの PRRS ウイルス遺伝子 (Ct 値で 13.34 ~ 15.69) を含み、(ii)MA104 細胞や PAM-T43 細胞へ接種すると明瞭な細胞変性効果を示した。これらの結果から、各生残細胞株は PRRS ウイルスの持続感染細胞であることが示された。さらに、(iii)各持続感染細胞株に対して、持続感染しているウイルスと同種ならびに異種ウイルス株を重感染させ、その後の経過を観察したところ、いずれの組み合わせでも細胞変性効果は見られず、細胞は増殖し続けた。これらの結果は、本研究で樹立した PRRS ウイルス持続感染細胞が、新たな PRRS ウイルス感染に対して抵抗性を示し、「細胞レベルの干渉現象」が起きていることを示唆する。

(3) 樹立した PRRS ウイルス持続感染細胞 4 株の宿主遺伝子発現パターンを明らかにするため、各細胞株から RNA を抽出して RNAseq 解析を行った(図 2)。特定のカスケード反応等に関する遺伝子群で、各持続感染細胞株に共通して発現量が増減しているものは見いだされなかった。その一方で、個々の遺伝子レベルでは、各持続感染細胞株に共通して発現量が増加または減少しているものがいくつか同定された。これらの遺伝子発現パターンは、持続感染細胞株が示した PRRS ウイルス感染に対する抵抗性への関与が疑われることから、今後、その背景にある分子生物学的な仕組みの解明を進める。

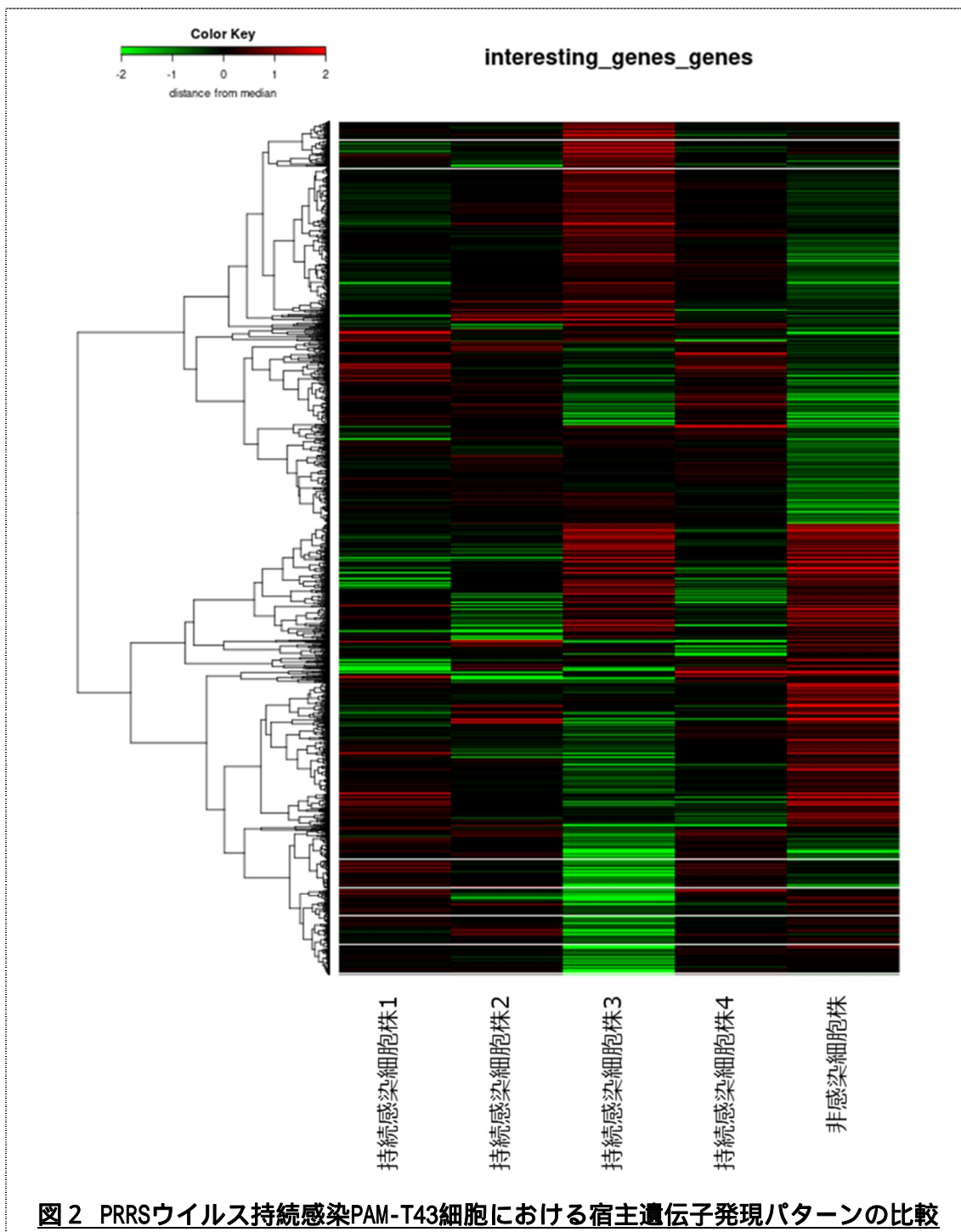


図 2 PRRSウイルス持続感染PAM-T43細胞における宿主遺伝子発現パターンの比較

本研究で得られた知見は、PRRS ワクチンの作用機序の解明だけでなく、より効果的な新しい PRRS 対策の確立への貢献も期待できる。PRRS の制御は国内外の養豚業界の悲願であり、本研究成果の社会的意義は大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------