

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05955

研究課題名(和文)猫コロナウイルス自然感染例を用いた猫伝染性腹膜炎発症のメカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Studies on the mechanism of feline peritonitis onset using cats naturally infected with feline coronavirus

研究代表者

越野 裕子(後藤裕子)(Goto-Koshino, Yuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：80436518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では猫コロナウイルス(FCoV)感染症例より病変部針吸引生検サンプルや胸腹水などを採取し、ウイルスRNAの検出を行うとともに、in vitroにおける細胞株への感染を試みた。しかし、東京大学附属動物医療センター来院症例から採取したサンプル中ウイルス量はいずれも微量であり、感染実験に適したサンプルを得ることができなかった。そこで、猫組織球由来の細胞株2種類とFCoV 79-1146株を用い、ウイルス感染後の細胞の変化をRNA-seqによって検討した。今後、得られた発現変動遺伝子について臨床サンプルにおける発現を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

猫伝染性腹膜炎(FIP)は、猫コロナウイルス(FCoV)の感染によって引き起こされる猫において最も重要な致死性感染性疾患の一つである。近年、抗ウイルス薬によるFIP治療の成功率は80%を超えるとの報告もある一方で、FIP発症の機序については未だ明らかでなく、正確な診断や治療成績の向上のためにはさらなる研究が必要である。

本申請ではFIPウイルスのターゲットに近い由来を持つ組織球由来細胞株を使用して感染実験を実施した。感染によって発現が変動した遺伝子はFIPの病態を反映するものである可能性が考えられ、今後、FIP症例における発現を検討する必要があるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this application, we collected needle aspiration biopsy samples of lesions and pleural/peritoneal effusion samples from feline coronavirus (FCoV) infected cases, detected viral RNA, and attempted to infect cell lines in vitro. However, the amount of virus in the samples collected from cases visiting the Veterinary Medical Center of the University of Tokyo was too small to establish an infection in vitro. Therefore, we used two cell lines derived from feline histiocytes and the FCoV 79-1146 strain to examine the transcriptional change in cells after virus infection. The expression level of these genes will be evaluated in clinical samples for further investigation.

研究分野：獣医内科学

キーワード：猫伝染性腹膜炎ウイルス 組織球

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

猫伝染性腹膜炎 (feline infectious peritonitis, FIP) は、猫において最も重要な致死性感染性疾患の一つである。猫コロナウイルス (Feline coronavirus, FCoV) の感染によって引き起こされる疾患であることは古くから知られていたものの、その病態は未だに明らかになっていない部分が多い。

FCoV に感染した猫はその多くが FIP を発症せず、無症候あるいは軽度～中程度の消化器症状を呈するキャリアーとなる。キャリアー猫から分離された FCoV は一般的に猫腸コロナウイルス (Feline enteric coronavirus, FECV) と呼称される。一方、FCoV 感染猫の一部は致死性の FIP を発症するが、これらの猫から分離された FCoV は猫伝染性腹膜炎ウイルス (Feline infectious peritonitis virus, FIPV) と呼称される。両者は非常に類似しており、FECV が突然変異を起こすことによって FIPV に変化すると考えられてきたものの、両ウイルスの決定的な違いは明らかではない。一方で FIPV 分離株を SPF 猫に実験的に感染させても必ずしも FIP を発症するわけではないことから、宿主側の要因も FIP 発症に関与していることが示唆される。

これまで行われてきた FIP 発症のメカニズムに関する研究は、ウイルス株を用いた猫に対する感染実験と、自然感染例を用いたウイルスゲノム配列解析の両面から進められてきた。FIP 発症に関わる宿主側・ウイルス側双方の因子に関する解明が試みられているものの、十分とは言えない。

2. 研究の目的

FCoV の研究において、細胞指向性や細胞障害性などのウイルス学的アプローチは培養細胞株とそれに適応したウイルス株を用いて行われることが多く、自然感染例に関する研究はウイルスゲノムの塩基配列解析が中心となっている。

本申請では自然感染症例からのウイルス分離とその *in vitro* 解析を目的とし、抗体依存性感染増強を利用した臨床例からのウイルス分離を試みる。臨床検体と症例に関する情報を同時に得ることにより、臨床情報、ウイルスの塩基配列、細胞指向性と細胞障害性を一貫して比較検証しようとする研究計画である。

3. 研究の方法

FIP 臨床症例の収集

東京大学附属動物医療センターに来院した症例を対象とし、FIP が疑われる症例からの臨床サンプルとともに、臨床データの収集を行う。

FCoV の検出およびウイルスゲノム解析

病変サンプルにおけるウイルス RNA の検出は、FCoV 7b 遺伝子および MN 遺伝子に設計されたプライマー/蛍光プローブを用いた RT-qPCR によって行うものとする。ウイルスが検出されたサンプルについては S タンパク質遺伝子変異の有無についてサンガーシーケンス解析を行う。

猫組織球系細胞株に対するウイルス感染実験

FIPV 感染の標的細胞はマクロファージ/単球系細胞である。本研究ではこれらの細胞と類似した由来を持つ組織球系細胞株 2 種類 (AS-FPH01, FHS-1) を使い、*in vitro* 感染系を構築する。感染ウイルスとしてはまず、確立されたウイルス株である 79-1146 株 FIPV を用いるものとする。

FIPV 感染細胞における遺伝子発現解析

FIPV 接種した猫組織球系細胞株において、mRNA 発現量の変化を RNA-seq により解析する。発現量の変化が認められた発現変動遺伝子 (DEG) については、ウイルス接種後の発現量について RT-qPCR で経時的变化を検証するものとする。

4. 研究成果

FIP 臨床例からのウイルス分離

東京大学附属動物医療センターに来院症例のうち、FIP が疑われる症例を対象に FCoV RNA の検出を行った。80 例の病変部サンプルについて RT-PCR を行ったところ、12 例において FCoV RNA が検出された。検出例におけるリアルタイム PCR の Ct 値は概ね 30 以上であり、FIP の病変部におけるウイルス量は少ないことが示唆された。12 例のうち S タンパク質遺伝子変異は 9 例において認められ、1 例は変異を有していなかった。解析できなかった症例が 1 例、犬コロナウイルス由来 S タンパク質遺伝子を有する II 型 FCoV が 1 例で検出された。

本研究において収集された臨床検体は微量な病変部針吸引サンプルがほとんどであり、RNA 検出と *in vitro* ウイルス分離の両方に用いることは量的に不可能であった。末梢血の採取が可

能であった症例については血漿中ウイルス RNA の検出も同時に試みたが、RT-PCR で血漿における RNA 検出が可能であった症例はなく、ウイルス分離に用いることはできなかった。

過去の報告からは、若齢猫に多く認められる浸出型 FIP において胸腹水中に比較的高いウイルス量が検出されることが示唆されている。臨床例からのウイルス分離を試みる場合には浸出型 FIP 症例の方が適していると言えるが、本研究で対象とした症例はほとんど胸腹水を伴わない非浸出型 FIP 症例であった。浸出型 FIP が比較的多く集まる一次診療施設等の協力を仰ぐことにより、ウイルス分離に適した検体を収集する工夫が必要であるものと考えられた。

猫組織遊系細胞株におけるウイルス感染実験

猫組織球系細胞株 AS-FPH01 および FHS-1 に対して 79-1146 株 FIPV を接種し、感染後 0, 1, 3, 5 日目の上清中ウイルス RNA を定量した (図 1)。いずれの細胞株においてもウイルス RNA 量は感染 1 日後に増加し、FIPV 感染が示唆された。AS-FPH01 においては感染 3 日後以降も上清中ウイルス RNA 量の増加が確認されたが、FHS-1 においては感染 3 日後以降の増加はほとんど認められなかった。

さらに感染 3 日後の細胞について、細胞免疫化学によるウイルスタンパク質の検出を行った。少数の AS-FPH01 においてウイルスタンパク質が検出された一方 (図 2)、FHS-1 においてはウイルスタンパク質は検出されなかった。これらの結果から、AS-FPH01、FHS-1 いずれの細胞株においても 79-1146 株 FCoV の感染は成立するものの、感染効率は FHS-1 において低いと考えられた。

FCoV 感染細胞における遺伝子発現解析

比較的高い感染効率が得られた AS-FPH01 を用いて、ウイルス接種 3 日後および非接種細胞について RNA-seq を行ったところ、1918 個の DEG が抽出された。これらの DEG についてエンリッチメント解析を実施した結果、NF- κ B 経路に関連する遺伝子が発現変動遺伝子に集中していることが見出された。同経路の標的遺伝子である *TNIP3*, *INHBA*, *ICAM1*, *SDC4*, *IL1B*, *SAAI* の 6 遺伝子について RT-qPCR により発現量の検証を行ったところ、*INHBA* および *SAAI* の発現量が FIPV 接種後 1 日目以降に、*ICAM1* の発現量が接種後 3 日目以降に有意に上昇していた (図 3)。

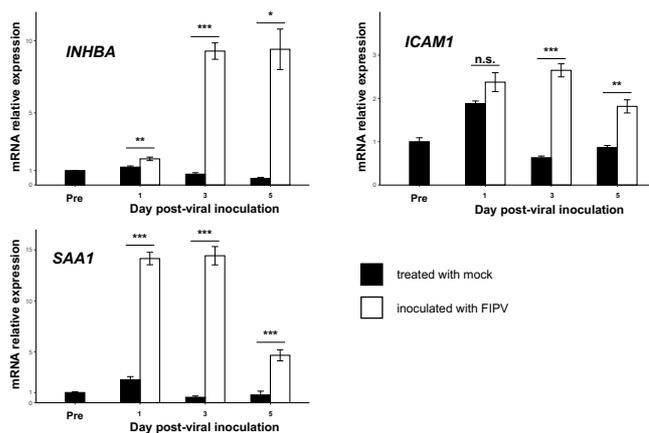
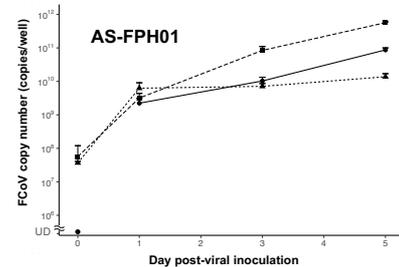


図 3 RT-qPCR で定量した *INHBA*, *ICAM1*, *SAAI* 遺伝子の発現量。ウイルス接種前の発現量に対する相対値をして記載。

を再解析したところ、FIPV 実験感染猫の腹腔内マクロファージにおいても同様に NF- κ B 経路の活性化に関連する遺伝子の発現上昇が確認された。FIPV 接種 AS-FPH01 において mRNA の発現量が増加した *INHBA*, *ICAM1* および *SAAI* はいずれも NF- κ B 経路の活性化により発現の増加する遺伝子群である。*INHBA* はアクチビン A を構成するインヒビン β A をコードする遺伝子であり、アクチビン A はマクロファージを抗炎症型 (M2) から炎症誘発型 (M1) に分極化させることが報告

(A)



(B)

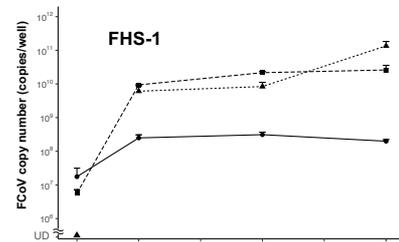


図 1 FIPV 接種後の (A) AS-FPH01 および (B) FHS-1 培養上清中ウイルスコピー数。感染実験は 3 回繰り返され、各線はそれぞれの検証の結果を示している。UD: 検出限界以下

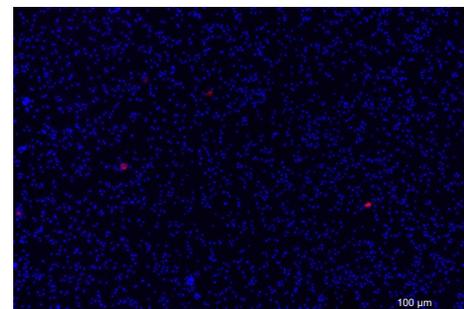


図 2 FIPV 接種 3 日後の AS-FPH01 における FIPV N タンパク質 (赤) の発現。青: DAPI による核染色。

これらの結果から、FIPV 接種に伴う細胞内での NF- κ B 経路の活性化が示唆された。これまで、FIP の病態に NF- κ B 経路が関与する可能性に言及した報告はないが、NF- κ B 経路の活性化は炎症惹起、特に FIP 発症猫において上昇が報告されている TNF- α , IL-1 β および GM-CSF 等の発現に関連することが知られている。FIPV 実験感染猫を用いた過去の公開データを

されている。*ICAMI*は接着分子 *ICAM1* をコードする遺伝子であり、FIP 病変周囲において局地的な同タンパクの発現増加が認められることが明らかになっている。*SAA1* は急性相タンパク質として知られる *SAA* をコードする遺伝子であり、FIP 猫では *SAA* が高値になることが知られる。また、*SAA* は *Toll* 様受容体 4 や *AGE* 特異的受容体を介して *NF- κ B* 経路の活性化に寄与することも知られている。これらの結果から、FIPV 接種組織球系細胞において *NF- κ B* 経路が活性化していることが示唆され、FIP 発症猫においても同様の変化が予想された。本研究成果は学会で発表を行い、高い評価を得ている。今後は臨床検体を用いてこれらの遺伝子発現量の変化について検証する必要があるものと考えている。

組織球系細胞株を用いた猫コロナウイルス感染に伴う発現変動遺伝子の解析：並木裕人、盆子原誠、ジェームズ・K・チェンバーズ、内田和幸、高野友美、富安博隆、後藤裕子、日本獣医内科学アカデミー (2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito G, Goto-Koshino Y, Kuroda Y, Eunsil P, Maeda K, Soma T, Momoi Y	4. 巻 83
2. 論文標題 Seroprevalence of antibodies against severe acute respiratory coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in household dogs in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1722-1725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0338	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 Ii Tatsuhito, Chambers James K., Nakashima Ko, Goto-Koshino Yuko, Mizuno Takuya, Uchida Kazuyuki	4. 巻 59
2. 論文標題 Intraepithelial cytotoxic lymphocytes are associated with a poor prognosis in feline intestinal T-cell lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 931 ~ 939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03009858221120010	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 Ii Tatsuhito, CHAMBERS James K, NAKASHIMA Ko, GOTO-KOSHINO Yuko, UCHIDA Kazuyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Application of automated machine learning for histological evaluation of feline endoscopic samples	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 160 ~ 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.23-0299	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 Ii Tatsuhito, CHAMBERS James K, NAKASHIMA Ko, GOTO-KOSHINO Yuko, UCHIDA Kazuyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Intraepithelial lymphocytes are associated with epithelial injury in feline intestinal T-cell lymphoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 101 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.23-0339	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 Ito Genta, Tabata Shoichi, Matsuu Aya, Hatai Hitoshi, Goto-Koshino Yuko, Kuramoto Tomohide, Doi Sakiko, Momoi Yasuyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Detection of feline morbillivirus in cats with symptoms of acute febrile infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Research Communications	6. 最初と最後の頁 569 ~ 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11259-023-10214-x	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 SAKAMOTO Haruka, ITO Genta, GOTO-KOSHINO Yuko, SAKAMOTO Megumi, NISHIMURA Ryohei, MOMOI Yasuyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Detection of domestic cat hepadnavirus by next-generation sequencing and epidemiological survey in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 642 ~ 646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0439	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤源太
2. 発表標題 犬および猫におけるSARS-CoV-2の感染状況に関する検討
3. 学会等名 日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 並木裕人、盆子原誠、ジェームズ・K・チェンバース、内田和幸、高野友美、富安博隆、後藤裕子
2. 発表標題 組織球系細胞株を用いた猫コロナウイルス感染に伴う発現変動遺伝子の解析
3. 学会等名 日本獣医内科学アカデミー
4. 発表年 2024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
研究 分担 者	大野 耕一 (OHNO KOICHI) (90294660)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員 (12601)	令和4年度に削除

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
---------	---------