

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07053

研究課題名（和文）エマージングリスクであるボルナ病ウイルスの制御法確立

研究課題名（英文）Establishment of control methods for Borna disease virus, an emerging risk

研究代表者

牧野 晶子（Makino, Akiko）

京都大学・医生物学研究所・准教授

研究者番号：30571145

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）：本研究は、エマージングリスクであるボルナ病ウイルスによる致死性脳炎の制御法を確立することを目的とし、抗ウイルス化合物の作用機序を解明し、その抗ウイルス作用を評価した。スクリーニングにより11個の候補化合物を同定し、その中で化合物4が最も強い抗ウイルス活性を示した。化合物4はボルナ病ウイルスの細胞内侵入過程に関与し、M遺伝子を標的とすることが示唆された。本研究の成果は、ボルナ病ウイルスの治療薬開発に貢献するものであり、新たな感染症リスクへの備えとなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エマージングリスクであるボルナ病ウイルスによる致死性脳炎を抑制する新規抗ウイルス化合物を発見し、その作用機序を解明した。この成果により、ボルナ病ウイルス感染症の効果的な治療法開発が期待される。社会的には、新たな感染症リスクへの備えとして重要である。学術的には、ウイルスの感染メカニズムの解明に貢献し、今後の研究基盤を強化した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to develop a method for controlling lethal encephalitis caused by Borna disease virus, an emerging risk. To this end, the mechanisms of action of antiviral compounds were elucidated and their antiviral effects were evaluated. Screening identified 11 candidate compounds, among which Compound 4 exhibited the strongest antiviral activity. Compound 4 was suggested to be involved in the intracellular entry process of the Borna disease virus and to target the M gene. The findings of this study contribute to the development of therapeutics for Borna disease virus and provide a foundation for preparedness in the event of potential new infectious disease risks.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エマージングリスク 人獣共通感染症 ボルナ病ウイルス 抗ウイルス化合物

1. 研究開始当初の背景

ボルナ病ウイルスはウマやヒツジの中枢神経に持続感染して脳炎を引き起こす。従来、ボルナ病ウイルスはヒトに病原性を示さないと考えられてきたが、2018年にヒトに致死性の脳炎を起こすことが報告された。ボルナ病ウイルス感染症は、従来リスクが低く見積もられていたが、予測よりも危険性が高く、また環境の変化などによって重大な被害を与えうる存在、すなわちエマージングリスクであると言える。これまでに、ボルナ病ウイルスを標的とする抗ウイルス化合物の同定を目的として、低分子化合物のスクリーニングを行ったところ、11個の候補化合物を得た。しかしスクリーニングにより同定された抗ウイルス化合物はどのようなメカニズムでボルナ病ウイルス増殖を抑制しているのか、また同ウイルスによる致死性脳炎は薬剤で制御可能であるのかは不明であった。

2. 研究の目的

エマージングリスクであるボルナ病ウイルスによる致死性脳炎の制御法の確立を目的として、抗ウイルス化合物の作用機序の解明と脳炎モデルにおける抗ウイルス作用の評価をおこなった。

3. 研究の方法

組換えボルナ病ウイルスから発現する GFP の輝度を指標に、同定した 11 個の抗ウイルス化合物の抗ボルナ病ウイルス活性を評価した。同様に、化合物処理した感染細胞中のウイルス RNA 量をリアルタイム PCR により測定した。ボルナ病ウイルスの増殖環において、10 個の候補化合物がそれぞれどの感染ステップに作用するかを明らかにする。各感染ステップを評価する系として、細胞内侵入を評価するシュードタイプウイルス、膜融合活性を定量するレポーターアッセイ、ウイルスの核内・核外移行シグナルを融合した蛍光タンパク質、RNP による転写・複製活性を評価するミニゲノムアッセイ、粒子放出を定量するウイルス様粒子作製を用いた。抗ウイルス活性を示した化合物について、類縁化合物群を得てその抗ウイルス活性を評価した。

4. 研究成果

組換えボルナ病ウイルスが持続感染している Vero 細胞に最終濃度 10 μ M で化合物を添加し、5 日間培養した。5 日目に細胞を固定して、GFP の輝度を指標に ArrayScan でスクリーニングを行った。その結果、12640 種類のオリジナル化合物ライブラリから 11 種類の候補化合物を得た (図 1, 2)。

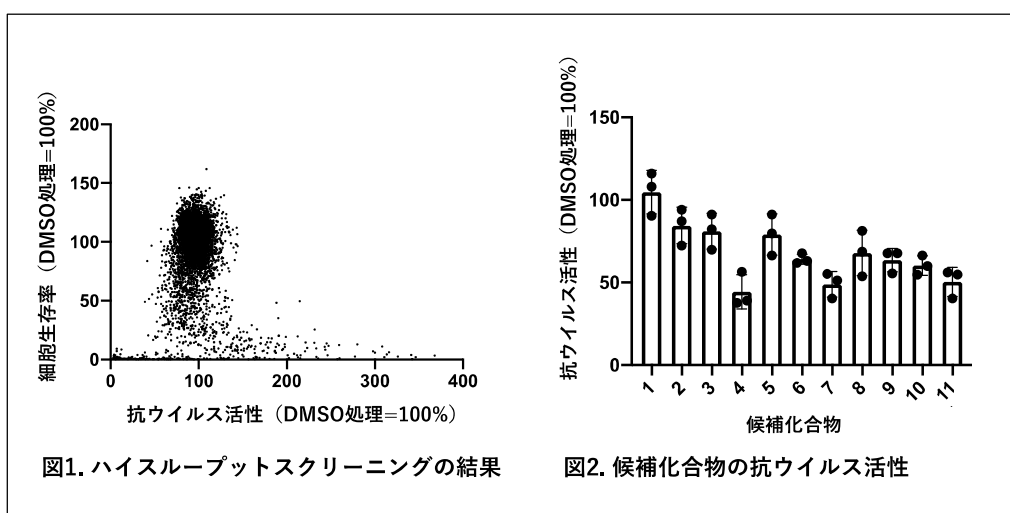


図1. ハイスクリーンスクリーニングの結果

図2. 候補化合物の抗ウイルス活性

11 個の化合物の中から最も強い抗ウイルス活性を示した化合物 4 について詳細に解析を進めた。化合物 4 の IC₅₀ は 7.5 μ M であり、20 μ M から細胞毒性を示したため、10 μ M でその後の解析を行った。同化合物がウイルスのポリメラーゼ活性に与える影響を評価するため、ミニゲノムアッセイを行ったところ、既知の抗ボルナ病ウイルス化合物であるファビピラビルはポリメ

ラーゼ活性を抑制したのに対して、化合物 4 は DMSO 処理と同程度であった。

化合物で処理した細胞にウイルスを感染させ、感染効率を測定することで宿主細胞が抗ウイルス状態になっているかを検討したところ、ウイルスの感染効率に影響はなかった。ウイルス溶液を化合物と反応させた後に限外ろ過をすることで化合物を取り除き、化合物によるウイルス不活化作用を検討したが、同化合物はウイルスを不活化しなかった。ウイルスを細胞に吸着させる 1 時間の間に化合物処理を行いその後取り除いたところ、感染効率は減少した。一方、ウイルス吸着後の細胞に化合物を 1 時間処理し、その後取り除いたところ、感染効率は減少しなかった。これらのことから化合物 4 は細胞内侵入過程に関与することが示唆された。

ハイスループットスクリーニングにおいては、GFP を発現する組換えボルナ病ウイルスが感染した細胞に化合物を添加し、5 日目の GFP 輝度を指標として抗ウイルス活性を評価した。そのため、化合物 4 は細胞内侵入以降に作用すると当初は予測されたが、化合物 4 はミニゲノムアッセイでは効果を示さず、吸着時に阻害作用を示した。

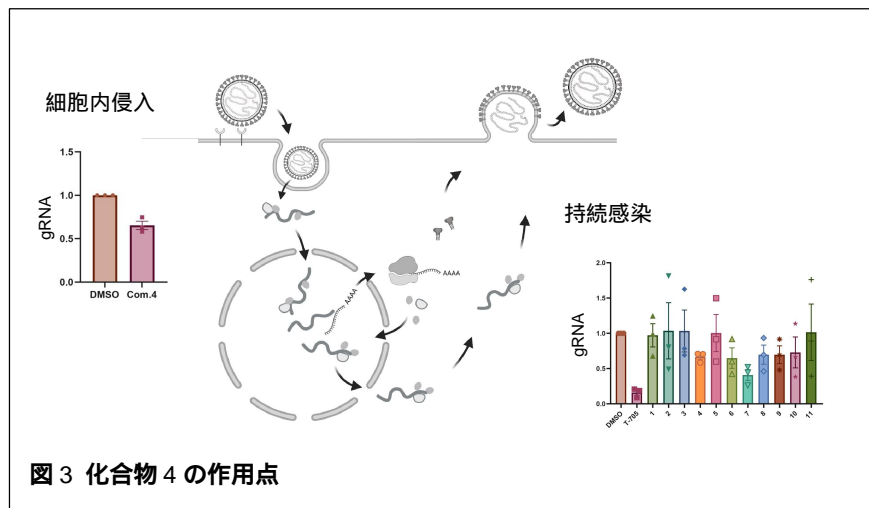


図 3 化合物 4 の作用点

吸着と細胞内での転写複製の両方に関わりうるウイルス因子として M 遺伝子が考えられたため、M 遺伝子と G 遺伝子を欠損した組換えボルナ病ウイルスと G 遺伝子を欠損したボルナ病ウイルスがそれぞれ感染した細胞を作製して、化合物 4 を反応させた。その結果、G 遺伝子欠損ウイルスに対してのみ化合物 4 は抑制作用を示した。これらの結果から、化合物 4 はボルナ病ウイルスの M 遺伝子を標的としていることが示唆された。

化合物 4 の類縁化合物 80 種類について、一次スクリーニングと同様に組換えボルナ病ウイルス持続感染細胞を用いて抗ウイルス活性を評価したところ、化合物 4 より高い抑制作用を示す化合物はなかった。

本研究では、エマージングリスクであるボルナ病ウイルスの増殖を抑制する新規低分子化合物を同定した。同定した化合物はボルナ病ウイルスの細胞内侵入と感染の維持の両方に抑制作用を示し、M 遺伝子を標的としていることが明らかとなった。新規化合物の類縁体により強い抑制作用を示す化合物はなかった。本研究で同定した化合物はボルナ病ウイルスの治療薬のリード化合物となり治療法開発に貢献する。同ウイルス感染症の制御方法に関する知見が蓄積されたことで、発生しうる新たなリスクへの備えとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamazaki Hiroshi, Yamamoto Norio, Sonoyama Toru, Maruoka Hayato, Nasu Seiko, Makino Akiko, Tomonaga Keizo, Shigenoto Norifumi, Ohge Hiroki, Fujiwara Keizo, Shinohara Shogo, Takeno Sachio, Omori Koichi, Naito Yasushi	4. 巻 50
2. 論文標題 A multicenter study to investigate the positive rate of SARS-CoV-2 in middle ear and mastoid specimens from otologic surgery patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 285 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2022.07.007	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 Murata Kozue, Makino Akiko, Tomonaga Keizo, Masumoto Hidetoshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Predicted risk of heart failure pandemic due to persistent SARS-CoV-2 infection using a three-dimensional cardiac model	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108641-108641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108641	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 Komorizono Ryo, Fujino Kan, Kessler Susanne, Runge Solveig, Kanda Takehiro, Horie Masayuki, Makino Akiko, Rubbenstroth Dennis, Tomonaga Keizo	4. 巻 97
2. 論文標題 Reverse genetics of parrot bornavirus 4 reveals a unique splicing of the glycoprotein gene that affects viral propagation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0050923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00509-23	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 Sunagawa Junya, Komorizono Ryo, Park Hyeongki, Hart William S., Thompson Robin N., Makino Akiko, Tomonaga Keizo, Iwami Shingo, Yamaguchi Ryo	4. 巻 19
2. 論文標題 Contact-number-driven virus evolution: A multi-level modeling framework for the evolution of acute or persistent RNA virus infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1011173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pcbi.1011173	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 Minamiyama Sumio, Sakai Madoka, Yamaguchi Yuko, Kusui Makiko, Wada Hideki, Hikiami Ryota, Tamaki Yoshitaka, Asada-Utsugi Megumi, Shodai Akemi, Makino Akiko, Fujiwara Noriko, Ayaki Takashi, Maki Takakuni, Warita Hitoshi, Aoki Masashi, Tomonaga Keizo, Takahashi Ryosuke, Urushitani Makoto	4. 巻 28
2. 論文標題 Efficacy of oligodendrocyte precursor cells as delivery vehicles for single-chain variable fragment to misfolded SOD1 in ALS rat model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 312 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2023.01.008	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 Kanda Takehiro, Sakai Madoka, Makino Akiko, Tomonaga Keizo	4. 巻 103
2. 論文標題 Exogenous expression of both matrix protein and glycoprotein facilitates infectious viral particle production of Borna disease virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 285-291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001767	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 Yanai Mako, Sakai Madoka, Komorizono Ryo, Makino Akiko, Tomonaga Keizo	4. 巻 66
2. 論文標題 Stability of Borna disease virus based episomal vector under physical and chemical stimulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 24-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12946	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 Garcia Bea Clarise B., Horie Masayuki, Kojima Shohei, Makino Akiko, Tomonaga Keizo	4. 巻 65
2. 論文標題 BUD23TRMT112 interacts with the L protein of Borna disease virus and mediates the chromosomal tethering of viral ribonucleoproteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 492-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12934	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 Fujino Kan, Horie Masayuki, Kojima Shohei, Shimizu Sae, Nabekura Aya, Kobayashi Hiroko, Makino Akiko, Honda Tomoyuki, Tomonaga Keizo	4. 巻 95
2. 論文標題 A Human Endogenous Bornavirus-Like Nucleoprotein Encodes a Mitochondrial Protein Associated with Cell Viability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0203020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02030-20	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9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Madoka Sakai, Kosuke Yusa, Keizo Tomonaga, Akiko Makino.
2. 発表標題 Involvement of TRIM28/33 in SARS-CoV-2 replication.
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miina Kaneko, Madoka Sakai, Yukiko Okuno, Shinsuke Inuki, Keizo Tomonaga, Akiko Makino.
2. 発表標題 Identification of a small compound that inhibits Borna disease virus 1 in vitro.
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Madoka Sakai, Kosuke Yusa, Keizo Tomonaga, Akiko Makino.
2. 発表標題 CRISPR/CAS9 SCREENING FOR HOST FACTORS INVOLVED IN SARS-COV-2 INFECTION.
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akiko Makino, Kan Fujino, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Pathogenicity of variegated squirrel bornavirus.
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野晶子
2. 発表標題 Host cellular machinery for SARS-CoV-2 infection
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井まどか、遊佐宏介、朝長啓造、牧野晶子
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 システムを用いた重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2感染に関わる宿主因子の同定
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田雄大、小森園亮、牧野晶子、朝長啓造
2. 発表標題 ボルナ病ウイルスXタンパク質がウイルス感染サイクルに与える影響の解明
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiro Kanda, Madoka Sakai, Akiko Makino, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Additional expression of matrix protein and glycoprotein facilitates infectious virus production of Bornavirus 1
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Komorizono, Junna Kawasaki, Akiko Makino, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Selection and characterization of persistent infectious variants of SARS-CoV-2 .
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021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

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