

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19619

研究課題名（和文）新規ウイルスを対象とするポストメタゲノム研究

研究課題名（英文）Comprehensive approach for isolation and characterization of viruses in wildlife

研究代表者

佐々木 道仁（Michihito, Sasaki）

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・講師

研究者番号：70609403

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：新規ウイルスを対象とした研究はウイルスゲノム塩基配列解析が主流であり、感染性ウイルスの分離を経て、その細胞指向性や宿主域、病原性といった性状解析まで至るものは少ない。本研究では、呼吸器ウイルスや消化管ウイルスの感染を促進する膜貫通型セリンプロテアーゼ遺伝子を恒常発現させた培養細胞を用いて、ザンビアに生息する齧歯類動物マストミスとフルーツコウモリからロタウイルスを分離した。また、インドネシアに生息するフルーツコウモリからは、ネルソンベイオルソレオウイルスと哺乳類オルソレオウイルスを分離した。分離したウイルスのフルゲノム塩基配列を決定するとともに、細胞指向性、病原性などの性状解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者が作出したプロテアーゼ恒常発現細胞を用いて、ザンビアに生息する野生動物からロタウイルス分離に成功し、本細胞がロタウイルスの分離に有用であることが示された。コウモリの糞便から分離したロタウイルスが別種の動物（実験用マウス）に下痢症を引き起こすこと、ヒト小腸上皮細胞に感染、増殖することを明らかにし、ロタウイルスの種間伝播に関して重要な知見が得られた。また、これまで哺乳類オルソレオウイルスが東南アジアで検出されたことはなく、インドネシアに生息するコウモリから哺乳類オルソレオウイルスを分離した本研究は、東南アジアにおける哺乳類オルソレオウイルスの初検出報告となる。

研究成果の概要（英文）：Next-generation sequencing approach enables us to easily detect viral genome sequences in various materials, whereas limited studies have gone beyond isolation of infectious viruses to characterize their virological properties such as cell tropism, host range, and pathogenicity. In this study, we isolated rotaviruses from Mastomys rodents and fruit bats in Zambia by using a newly established cell line overexpressing serine protease genes that promote infection of respiratory and gastrointestinal viruses. We also isolated Nelson Bay orthoreoviruses and mammalian orthoreoviruses from fruit bats in Indonesia. The isolated viruses were characterized by whole genome sequence analysis, growth kinetics analysis in cultured cells and animal experiments.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス分離 分類 ザンビア インドネシア
ロタウイルス オルソレオウイルス 病原性解析 フルゲノム解析 ウイルス遺伝子型

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

サンプル中に含まれるウイルスの検出には、主にウイルスゲノム核酸の検出または感染性を有するウイルス粒子の分離という2種類の手法が採られる。PCR や次世代シーケンサー(NGS) に代表される核酸検出技術の進展と普及に伴い、様々な動植物サンプル、及び環境サンプルから膨大な数のウイルスゲノムが検出されてきた。ウイルスの分類を行う国際組織 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) によって認定されたウイルス種数は、2013 年は 2827 種であったが、2019 年には 6590 種となり、7 年で倍増した。急速に蓄積するウイルスゲノム塩基配列情報により、自然界には、これまで認知されていなかった多様なウイルスが多数存在していることが明らかとなった。これらのウイルスを対象とした研究は、ウイルスゲノム塩基の検出とその配列解析とするものが多く、感染性ウイルスを分離し、その細胞指向性、宿主特異性、病原性といった解析まで至るものは少ない。大きな社会問題となった新型コロナウイルス感染症は SARS-CoV-2 の感染によって引き起こされる。このウイルスと近縁なコロナウイルス RaTG13 のゲノムは、中国、雲南省に生息するコウモリから 2013 年に検出されていた (Cohen J. Science. 2020)。今後も発生することが予想される新興感染症への備えとして、さまざまなサンプルからのウイルス分離と、分離したウイルスの性状解析は、学術上、公衆衛生上の両面から重要である。

インフルエンザウイルス科、パラミクソウイルス科に属する呼吸器ウイルスは、感染性を獲得するために、ウイルス粒子の外殻タンパクの切断、活性化を必要とする(プロテアーゼ依存性ウイルス)。これらプロテアーゼ依存性ウイルスの増殖には、プロテアーゼである Trypsin を含む無血清培地がよく用いられる。一方で、宿主の膜貫通型セリンプロテアーゼの一種である TMPRSS2 が、Trypsin 非存在化の培養条件においても、各種呼吸器ウイルスの外殻タンパクを開裂し効率的なウイルス感染を支持することが報告された (Bottcher E. *et al.* J. Virol. 2006 他)。また、TMPRSS2 を恒常発現させた Vero 細胞は、SARS-CoV-2 に高感受性を示し、ヒト臨床検体からの SARS-CoV-2 分離に用いられる (Matsuyama S. *et al.* PNAS. 2020)。さらに、研究代表者は、消化管ウイルスの1種であるロタウイルスと宿主プロテアーゼの相互作用に関して研究を行い、TMPRSS2 及び同じ subfamily に分類される TMPRSS11D が、ロタウイルスの外殻タンパク質を切断し細胞への感染を促進すること、および TMPRSS2 と TMPRSS11D を同時に強制発現させた MA104 細胞 (MA104-T2T11D 細胞) がロタウイルスに高感受性を示すことを見出した (Sasaki M. *et al.* J. Virol. 2021)。

2. 研究の目的

上述した様に、TMPRSS2 や TMPRSS11D のような宿主の膜貫通型セリンプロテアーゼを強制発現させた細胞は、プロテアーゼ依存性ウイルスに高感受性を示し、ウイルス分離に有用と考えられる。そこで本研究では、TMPRSS2 や TMPRSS11D を強制発現させた複数の培養細胞を用いて、研究代表者らが保有する野生動物の組織や糞便サンプルから感染性ウイルスの分離を行い、分離に成功したウイルスの基本性状の解明を目的とした。

3. 研究の方法

プロテアーゼ依存性ウイルスの感染を促進させる TMPRSS2 や TMPRSS11D を強制発現させた複数の培養細胞を準備した。共同研究者の協力のもとザンビア共和国またはインドネシア共和国の現地で採集されたコウモリや齧歯類動物の組織、糞便の懸濁液を複数の培養細胞へ接種し、数日間の培養を経たのち、新しい細胞へ盲継代した。全てのウイルス分離実験は、研究代表者が所属する北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所内の高度封じ込め BSL-3 施設内で実施した。顕微鏡下での細胞変性効果 CPE の観察、または培養上清から抽出した核酸を用いた NGS 解析を実施し、動物由来サンプルからのウイルス分離の成否を判定した。

分離したウイルスを対象として、1) NGS によるフルゲノム解析、2) ゲノム塩基配列に基づく進化系統解析、3) 細胞における増殖性、4) 実験動物に対する病原性、5) 動物組織や血清を用いたウイルスゲノム陽性または抗体陽性個体の検索などの解析を実施した。

4. 研究成果

下記に記載した3種のウイルスについて分離に成功し、その性状解析を実施した。

1) ロタウイルス

ロタウイルスは、ヒトを含む様々な動物に感染し下痢症を引き起こす。ロタウイルスに高感受性を示す MA104-T2T11D 細胞を用いて、ザンビアにて採集したフルーツコウモリの腸内容物および齧歯類動物であるマストミスの腸内容物から、4株のロタウイルスを分離することに成功し

た。このうちコウモリ由来ロタウイルス 16-06 株と、マストミス由来ロタウイルス MpR12 株について、詳細な解析を実施した。ロタウイルスのゲノムは 11 分節の 2 本鎖 RNA から成り、国際組織 Rotavirus Classification Working Group (RCWG) により全 11 分節の塩基配列 (フルゲノム) に基づく遺伝子型分類法が整備されている。我々によるフルゲノム解析の結果、16-06 株は、非典型的な遺伝子型に分類されるケニアのコウモリ由来株と高い配列類似性を示した。一方、MpR12 株は既知のロタウイルスと遠縁であり、全分節が既存の遺伝子型分類に当てはまらず、RCWG より新規遺伝子型の発見として認定された。ロタウイルス株が細胞への感染に利用する細胞表面糖鎖の利用能を調べた結果、16-06 株の細胞侵入はシアル酸依存性であった一方、MpR12 株はシアル酸非依存性であった。また、16-06 株と MpR12 株を乳飲みマウス接種し、その病原性を調べたところ、16-06 株および MpR12 株は乳飲みマウスに感染し、下痢症を惹き起こした。16-06 株と MpR12 株のヒト消化管への感染性を検討することを目的として、カルチャーインサート上で培養可能なヒト小腸上皮細胞 3D 培養モデルを用いた感染実験を実施した。16-06 株、MpR12 株ともに、ヒト小腸上皮細胞への感染 (図) ウイルス増殖が認められた。

我々は既知のロタウイルスとゲノム塩基配列が大きく異なり、古典的遺伝子型に分類されない新規遺伝子型のロタウイルスの分離に成功した。また、分離したロタウイルスは異種動物間で伝播し得ることが示され、新規遺伝子型ロタウイルスの基本性状および自然界における伝播様式について知見を得た (Kishimoto *et al.* J.Virol. 2023. 掲載誌の Editor 's Pick に選出)。

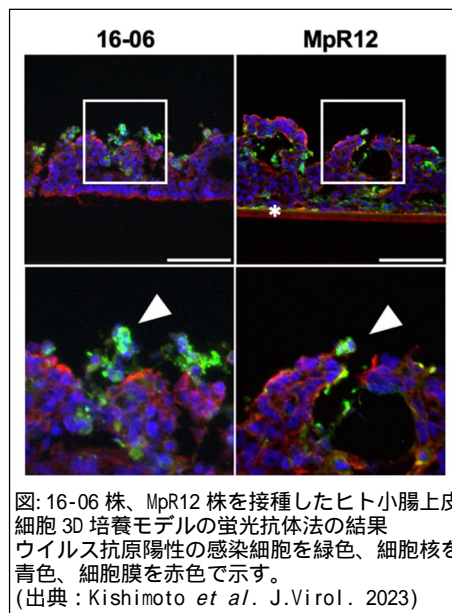


図: 16-06 株、MpR12 株を接種したヒト小腸上皮細胞 3D 培養モデルの蛍光抗体法の結果
ウイルス抗原陽性の感染細胞を緑色、細胞核を青色、細胞膜を赤色で示す。
(出典: Kishimoto *et al.* J.Virol. 2023)

2) ネルソンベイオルソレオウイルス

ネルソンベイオルソレオウイルス (NBV) は、ヒトに呼吸器感染症を引き起こす人獣共通感染症原因ウイルスである。インドネシア共和国にて採集したフルーツコウモリの糞便を Vero-TMPRSS2 細胞へ接種し、5 株の NBV を分離した。分離した NBV の病原性を、実験用マウスを用いた感染実験により解析した。NBV を接種したマウスでは、感染後 1 日目から肺内でのウイルス増殖と炎症性サイトカインの発現上昇が認められた。病理学的解析では、感染後 3 日目から肺炎の所見が認められ、感染後 5 日目より重篤であった。感染後 6 日目までにウイルス接種群の 63% が人道的エンドポイントに到達し、高い病原性が観察された。コウモリから採集した血清を用いた抗体調査により、133 例中 119 例 (89%) のコウモリから分離した NBV に対する中和抗体を検出した。本研究により、病原性を有する NBV の感染が、インドネシア広域に生息するフルーツコウモリに生じていることが明らかとなった (Intaruck *et al.* Virology. 2022)。

3) 哺乳類オルソレオウイルス

インドネシア共和国で採集し、2) でネルソンベイオルソレオウイルスを分離したコウモリとは別のコウモリ個体から採集した糞便サンプルを Vero-TMPRSS2 hACE2 細胞へ接種し、3 株の哺乳類オルソレオウイルス (MRV) を分離した。このうち、MRV12-52 と命名した 1 株について、実験用マウスを用いた感染実験を行い、その病原性を解析した。MRV の病原性は低いとする従来の研究結果とは異なり、分離した MRV12-52 を接種したマウスは重篤な肺炎症状を呈し、ウイルス接種群の 75% が著しい体重減少を伴う人道的エンドポイントに到達した。肺組織の病理解析では、広範な肺胞上皮細胞へのウイルス感染とともに、マクロファージを主体とする炎症細胞浸潤が観察された。本研究は東南アジアにおける MRV の初検出報告となる (論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kishimoto Mai, Kajihara Masahiro, Tabata Koshiro, Itakura Yukari, Sasaki Michihito, et al.	4. 巻 97
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Distinct Rotavirus A in Bat and Rodent Hosts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01455-22	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 該当する

1. 著者名 Intaruck Kittiya, Itakura Yukari, Kishimoto Mai, Chambaro Herman M., Setiyono Agus, Handharyani Ekowati, Uemura Kentaro, Harima Hayato, Taniguchi Satoshi, Saijo Masayuki, Kimura Takashi, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Sasaki Michihito	4. 巻 575
2. 論文標題 Isolation and characterization of an orthoreovirus from Indonesian fruit bats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 10～19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2022.08.003	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Yukari Itakura, Mai Kishimoto, Herman Moses Chambaro, Takashi Kimura, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki.
2. 発表標題 Characterization and seroprevalence of a new Nelson Bay orthoreovirus isolated from Indonesian fruit bats
3. 学会等名 The 10th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Yukari Itakura, Mai Kishimoto, Herman Moses Chambaro, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Kentaro Uemura, Hayato Harima, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki.
2. 発表標題 Characterization and serological study of Nelson Bay orthoreovirus isolated from Indonesian fruit bats
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 岸本 麻衣、梶原 将大、高田 礼人、伊藤 直人、大場 靖子、澤 洋文、佐々木 道仁
2. 発表標題 ウイルス分離先行型スクリーニングにより分離された野生動物由来ロタウイルスAの性状解析
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 Kittiya Intaruck, Yukari Itakura, Mai Kishimoto, Herman Moses Chambaro, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Takashi Kimura, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki.
2. 発表標題 Virological and serological characterization of a new Nelson Bay Orthoreovirus isolated from wild fruit bats in Indonesia
3. 学会等名 One Health Lecture Series: Interdisciplinary Approach Reinforces Sustainable Development Goals (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本麻衣、梶原将大、高田礼人、大園誠也、鈴木忠樹、伊藤直人、大場靖子、澤洋文、佐々木道仁
2. 発表標題 ザンビアのエジプトルーセットオオコウモリおよびマストミスから分離されたロタウイルスAの性状解析
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Mai Kishimoto, Yukari Itakurai, Koshiro Tabata, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki
2. 発表標題 Isolation and characterization of Mammalian Orthoreovirus from Pteropus vampyrus bats in Indonesia
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kittiya Intaruck, Koshiro Tabata, Yukari Itakura, Nijiho Kawaguchi, Mai Kishimoto, Agus Setiyono, Ekowati Handharyani, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Michihito Sasaki
2. 発表標題 Isolation and characterization of Mammalian Orthoreovirus from Pteropus vampyrus bats in Indonesia
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
研究協力者	澤 洋文 (Sawa Hirofumi)		

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			
インドネシア	ボゴール農業大学			
ザンビア	ザンビア大学			
アイルランド	アイルランド国立大学ダブリン校			