

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380168

研究課題名(和文)ネコレトロウイルスの変異と進化：新たなウイルス出現と病原性発現機構の解析

研究課題名(英文)Evolutionary dynamics of feline retroviruses

研究代表者

西垣 一男(Nishigaki, Kazuo)

山口大学・獣医学部・准教授

研究者番号：20401333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：猫白血病ウイルス(FeLV)の進化的動態について明らかにした。その中でERV-DCという内在性レトロウイルスと組換えを起こしたFeLV-Dを発見した。ERV-DCは家猫のゲノムに存在するレトロウイルスで、自律増殖性を持つことを発見した。ERV-DC10の保有率は約38%であった。Refrex-1と命名した抗レトロウイルス活性を示す分子を発見した。全ての家猫がRefrex-1を保有していることから、Refrex-1は宿主とウイルスの進化的軍拡競争の中で獲得された宿主抵抗遺伝子であり、この分子は生存にとって必須であることが示唆される。家猫における古代レトロウイルス学の分野についても開拓できた。

研究成果の概要(英文)：We found genetic diversity in FeLV env genes. Phylogenetic tree indicated that FeLV samples were separated into three distinct genetic clusters. A novel recombinant virus, termed FeLV-D, was generated by ERV-DC env transduction into FeLV. ERV-DCs are present and hereditary in the domestic cat genome. Two of these ERV-DCs, ERV-DC10 and ERV-DC18 are replication-competent gammaretroviruses. Insertional polymorphism analysis revealed that 38% of domestic cats had ERV-DC10. ERV-DCs behave as donors and/or acceptors in the generation of infectious, recombinant viruses. Furthermore, we discovered a soluble anti-retroviral factor, termed Refrex-1. The host retains Refrex-1 as an anti-retroviral factor which may potentially prevent re-emergence of ERVs and emergence of novel ERV-related viruses in cats. We provide an exciting and unique system in cats to study retrovirus-host coevolution and establish paleovirology in cats.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用獣医学

キーワード：古代ウイルス学 白血病 病原性 遺伝的多様性 レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

猫白血病ウイルス(以下 FeLV)はレトロウイルス科ガンマレトロウイルス属に分類される家猫間で伝播するレトロウイルス感染症である。FeLV に感染すると、リンパ腫、白血病、骨髄異形成症候群、免疫不全および再生不良性貧血など様々な疾患を引き起こし、予後不良である。FeLV は世界中で蔓延しているが、そのウイルスの遺伝的多様性はあまり知られていない。そこで FeLV の日本における疫学調査を行うことによって、ウイルスの遺伝的多様性を明らかにする。また、ウイルスの遺伝的多様性と病原性との関連性、新規ウイルスの出現について明らかにしたいと考える。これらの研究結果から、効果のある FeLV ワクチンのデザインとその感染症の制御に貢献したい。

2. 研究の目的

(1)日本における FeLV 感染症についての疫学調査：日本における FeLV 感染症の実態が、不明であり、どのくらいウイルスが全国に蔓延しているのかを調査する。

(2) FeLV の遺伝的多様性の解析について：ウイルスの遺伝的多様性については、これまで詳細に解析されたことは無く、遺伝子型による分類もなされていない。そこで、ウイルスの遺伝子型を決定し、これらの情報をもとにより効果のあるワクチン開発に繋げる。

(3)新規内在性猫レトロウイルス ERV-DC の性状解析：ERV-DC と命名した猫内在性レトロウイルスの性状を解析すると共に、家猫における内在性レトロウイルスの役割について明らかにする。

(4)新規 FeLV サブグループ D (FeLV-D)の性状解析：FeLV はその受容体の用い方によって分類されることが出来る。本研究の中で明らかになった新規 FeLV-D のウイルス学的性状を明らかにする。

(5)抗レトロウイルス分子 Refrex-1 の発見：FeLV-D の感染実験の経過中に、レトロウイルスの感染を抑制するウイルス感染抵抗性分子の存在を明らかにし、これを Refrex-1 と命名した。Refrex-1 がどのような分子かを同定する。

3. 研究の方法

(1)日本における FeLV 感染症についての疫学調査：日本全国 47 都道府県のそれぞれ位置する動物病院に来院し、最低週に 1 日は外出する猫を調査対象とした。血液を採取したのち、スナップ・FeLV/FIV コンボ(アイデックスラボラトリーズ)を用いて血中 FeLV 抗原の検出を行った。

(2) FeLV の遺伝的多様性の解析について：全国の疫学調査によって判明した FeLV 陽性家猫について、それら血液から DNA の抽出を行い、FeLV の env 遺伝子に相当する領域についてウイルス特異的なプライマーを設定し、PCR 法によって増幅した。得られたウイルス断片をクローニングし、塩基配列の決定を行

った。得られた塩基配列は、Simplot software (version 3.5.1)を用いて組換え体解析を行い、また系統樹作成においては、ML 法と NJ 法によって解析を行った。

(3)新規内在性猫レトロウイルス ERV-DC の性状解析：家猫のゲノム中に新規のクラスとして存在する猫の内在性レトロウイルス、ERV-DC と命名したウイルスを、PCR 法、プラークハイブリダイゼーション法によって単離する。ウイルスの感染性、自律増殖性について、哺乳類培養細胞に導入することによって、確認する。ウイルス粒子は透過型電子顕微鏡によってその存在と形態を明らかにする。家猫における ERV-DC の組込み多型を PCR 法によって行う。

(4)新規 FeLV サブグループ D (FeLV-D)の性状解析：胸腺型リンパ腫症例からウイルスの分離を HEK293T 細胞から行う。またその症例における FeLV の組み込み部位を Gene Walk システムを用いて、同定し、PCR 法によって FeLV-D の全長を単離する。

(5)抗レトロウイルス分子 Refrex-1 の発見：Refrax-1 の分子の同定に関して、培養細胞中に存在することから、蛋白の精製、性状解析ならびに発現クローニング法を試みることによって、分子を同定する。

4. 研究成果

(1) 47 都道府県で合計 1770 頭の猫が調査対象となった。その結果 FeLV の陽性率は 12.2%(216/1770)を示し、このうち FeLV 単独感染は 8.1%、FeLV および FIV の混合感染は 4.1%を示した。各都道府県別(図 1)の FeLV 陽性率について、九州地方では感染率 20%を超える場合が多く、高知、和歌山、千葉および富山でも感染率が 20%を超えている。寒い地域では感染率が低い傾向にある。年齢別での FeLV 陽性率は、0-0.5 歳齢の猫では 5.9%、0.5-1 歳齢で 4.8%、1 歳齢で 17.5%、2 歳齢で 21.6%とピークを示し、3 歳および 4 歳齢で 18.3%、5 歳齢で 14.3%、6 歳齢で 13.3%、7 歳齢で 11.5%と加齢とともに減少傾向を示した(図 2)。FIV 感染症においては 3 歳齢でその陽性率がピークとなり維持傾向を示した。FeLV の単独感染猫の場合では、その陽性率のピークは 2 歳であり、FIV との混合感染の場合ではそのピークは 3~6 歳である。これらの観察から FeLV と FIV の感染時期が異なることが示され、また、FeLV の感染時期は単独感染の場合と混合感染の場合で、感染時期が異なり、FeLV の(単独)感染は出生後、2 歳齢までの早い時期に感染が成立しており、その後成猫を中心に FIV との混合感染によって FeLV が伝播していると推定される。FeLV の陽性率が 2 歳以降で急激に減少していることから、FeLV 感染猫は死亡していることが予想され、予後不良の感染症であることが明らかとなった。

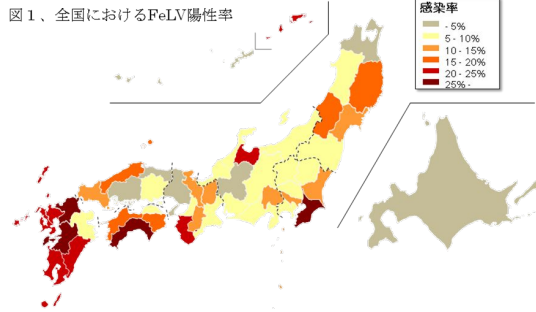


図1、全国におけるFeLV陽性率

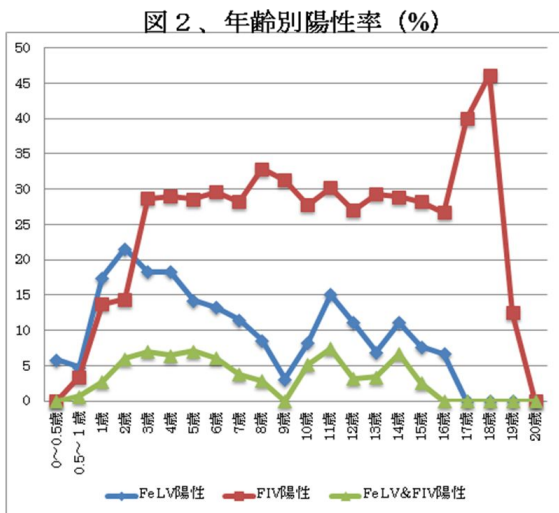
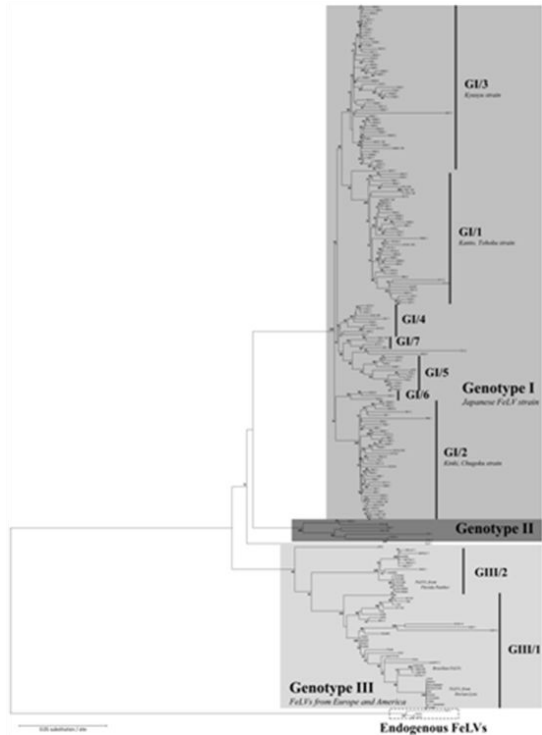


図2、年齢別陽性率 (%)

(2) FeLV の遺伝的多様性の解析について： FeLV env 遺伝子には、遺伝子の変異、挿入および欠損が見られた。ウイルスの分子系統樹を作成したところ、FeLV の遺伝子型は大きく分けて3つの遺伝子型 I, II および III に分類できることが判明した。日本で蔓延しているものは遺伝子型 I および II で、欧米や他国で蔓延している FeLV は遺伝子型 III である。遺伝子型 I はさらに7つのクレードに分類できることが判明した(図3)。また組換え体解析から、猫内在性 FeLV との組換え体が単離され、さまざまな FeLV env 遺伝子領域で内在性 FeLV 由来の塩基配列が認められ、組換え現象による FeLV の多様性が生じていることが判明した。

(3) 新規内在性猫レトロウイルス ERV-DC の性状解析：家猫には内在性 FeLV を含めて、様々な ERV が猫染色体 DNA に存在する。その中で、FeLV と同じガンマレトロウイルスに属する ERV を筆者らは発見し、ERV-DC (Endogenous GammaRetroviruses in Domestic Cats) と命名した。ERV-DC はメンデルの法則に従って遺伝しており、日本の家猫においては7-17 個程度存在している。これら ERV-DC の組み込み多型を日本の家猫で調べてみると、全ての猫が保有しているものや、内在化が現在進行中のものがあることが分かる(図4)。約37% (92/244) の家猫が C1 染色体に ERV-DC10 を持つが、ERV-DC10 は感染性のある自律増殖性ウイルスとしての能力を保持して存在することが判明した(図5)。猫染色体 D4 に存在する ERV-DC18 はおそらく ERV-DC10 の感染に

図3 FeLVの分子系統樹



よって、1 家系の家猫にのみ存在し維持されている。ERV-DC が家猫に侵入した時期は280 万年前~現在と推定されるが、ERV-DC10 および-DC18 は極めて最近、家猫に侵入したと言える。家猫系統 (Felis) 以外の猫科動物には存在しない。このウイルスは内在性ウイルスであり、その相同の外來性 ERV-DC が存在するのかは現在不明である。

図4、日本の家猫におけるERV-DCの組み込み多型

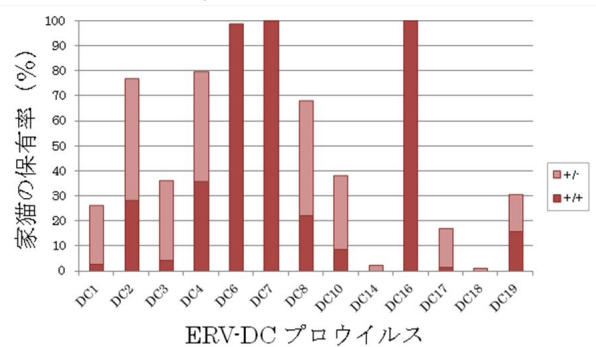
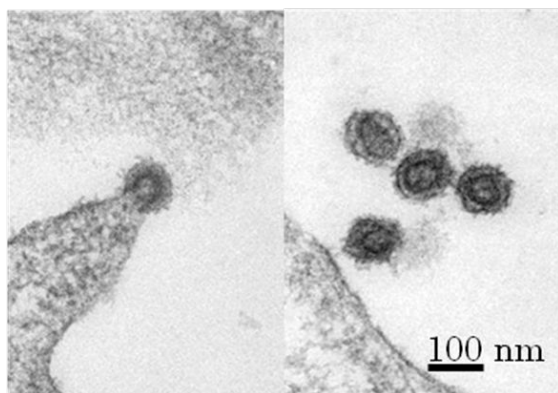
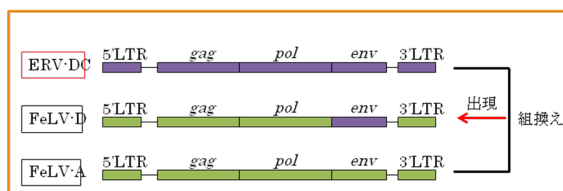


図5、ERV-DC10のウイルス像



(4)新規 FeLV サブグループ D (FeLV-D)の性状解析：FeLV-A と ERV-DC が組換えを起こし、新たな宿主域を保持したウイルスを発見し FeLV-D と命名した。図6に示すように、FeLV-D は FeLV-A と ERV-DC が env 遺伝子において組換えを起こし、ERV-DC の env 遺伝子を持った FeLV の構造を示す。ウイルス干渉実験の結果、FeLV-D は既知の FeLV の受容体を用いておらず、新たなウイルス干渉群であることを同定できた。

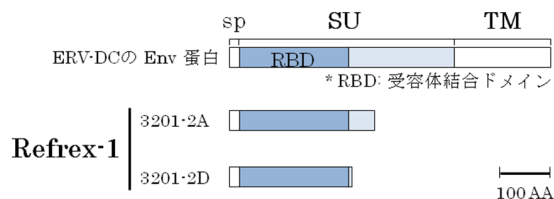
図6、組換えウイルスの出現



ウイルスの塩基配列の相同な部分は同じ色で示す。

(5)抗レトロウイルス分子 Refrex-1 の発見：Refrex-1 の性状解析の結果、FeLV-D や ERV-DC の感染に関して、それら受容体のステップで感染阻止が生じていることが判明したため、ERV-DC の何らかのウイルス断片が関与すると想定し、猫の培養細胞において発現している ERV-DC を単離した。単離された分子について、感染抑制能の有無を検討したところ、ERV-DC7 および ERV-DC16 の遺伝子座によってコードされる、欠損型 Env タンパク質が Refrex-1 であることが判明した(図7)。Refrex-1 は分泌性のタンパク質であり、家猫の全てが保持しており、この分子の保持と家猫の生存について何らかの進化的軍拡競争が有ったものと思われる。

図7、Refrex-1の構造



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 10件)

Watanabe S, Ito J, Baba T, Hiratsuka T, Kuse K, Ochi H, Anai Y, Hisasue M, Tsujimoto H, Nishigaki K, Notch2 transduction by feline leukemia virus in a naturally infected cat, J Vet Med Sci. 査読有、76(4)、2014、553-557.

Ito J, Watanabe S, Hiratsuka T, Kuse K, Odahara Y, Ochi H, Kawamura M, Nishigaki K. Refrex-1, a soluble restriction factor against feline endogenous and exogenous retroviruses. J Virol. 査読有、87(22)、2013、

12029-12040. doi:
10.1128/JVI.01267-13.

Watanabe S, Kawamura M, Odahara Y, Anai Y, Ochi H, Nakagawa S, Endo Y, Tsujimoto H, Nishigaki K. Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene. PLoS One. 査読有、8(4) 2013、e61009. doi:
10.1371/journal.pone.0061009.

Sasaki H, Ichikawa Y, Sakata Y, Endo Y, Nishigaki K, Matsumoto K, Inokuma H. Molecular survey of Rickettsia, Ehrlichia, and Anaplasma infection of domestic cats in Japan. Ticks Tick Borne Dis. 査読有、3(5-6)、2012、308-311. doi:
10.1016/j.ttbdis.2012.10.028.

Anai Y, Ochi H, Watanabe S, Nakagawa S, Kawamura M, Gojobori T, Nishigaki K. Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. J Virol. 査読有、86(16)、2012、8634-8644. doi:
10.1128/JVI.00280-12.

Umehara D, Kawamura M, Odahara Y, Watanabe S, Hanson C, Ruscetti S, Nishigaki K. Role of N-terminal sequences of the tyrosine kinase sf-Stk in transformation of rodent fibroblasts by variants of Friend spleen focus-forming virus. Int J Cancer. 査読有、131(5)、2012、1083-1094. doi: 10.1002/ijc.27330.

Mochizuki H, Takahashi M, Nishigaki K, Ide T, Goto-Koshino Y, Watanabe S, Sato H, Sato M, Kotera Y, Fujino Y, Ohno K, Uchida K, Tsujimoto H. Establishment of a novel feline leukemia virus (FeLV)-negative B-cell cell line from a cat with B-cell lymphoma. Vet Immunol Immunopathol. 査読有、140(3-4)、2011、307-311. doi:
10.1016/j.vetimm.2010.12.010.

Tanahara M, Miyamoto S, Nishio T, Yoshii Y, Sakuma M, Sakata Y, Nishigaki K, Tsujimoto H, Setoguchi A, Endo Y. An epidemiological survey of feline hemoplasma infection in Japan. J Vet Med Sci. 査読有、72(12)、2010、1575-1581.

Umehara D, Watanabe S, Ochi H, Anai Y, Ahmed N, Kannagi M, Hanson C, Ruscetti S, Nishigaki K. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in

friend spleen focus-forming virus-induced erythroid disease. J Virol. 査読有、84(15)、2010、7675-7682. doi: 10.1128/JVI.00488-10.

Nakamura Y, Nakamura Y, Ura A, Hirata M, Sakuma M, Sakata Y, Nishigaki K, Tsujimoto H, Setoguchi A, Endo Y. An updated nation-wide epidemiological survey of feline immunodeficiency virus (FIV) infection in Japan. J Vet Med Sci. 査読有、72(8)、2010、1051-1056. Erratum in: J Vet Med Sci. 2010 Nov;72(11):following 1530.

〔学会発表〕(計 17 件)

渡部伸也、リンパ腫発症猫に見られた猫白血病ウイルスによる Notch2 遺伝子の transduction、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 - 9 月 22 日、岐阜大学(岐阜市)。

河村麻紀、猫白血病ウイルスによる c-akt1 の transduction と v-Akt の機能解析、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 - 9 月 22 日、岐阜大学(岐阜市)。

伊東潤平、猫レトロウイルスに対する可溶性の感染抑制因子 Refrex-1 の発見。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 - 9 月 22 日、岐阜大学(岐阜市)。

久世恭平、対馬におけるイエネコの FeLV 調査: ツシマヤマネコのマネージメント、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 - 9 月 22 日、岐阜大学(岐阜市)。

穴井友加里、家猫のゲノムに存在する感染性と自律増殖性を示す ERV-DC(endogenous retrovirus in domestic cats)の同定、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 - 9 月 16 日、岩手大学(盛岡市)。

渡部伸也、猫白血病ウイルス env 遺伝子の多様性と遺伝子型による分類、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 - 9 月 16 日、岩手大学(盛岡市)。

渡部伸也、新規サブグループを示す猫白血病ウイルス(FeLV-D)の発見、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 - 9 月 16 日、岩手大学(盛岡市)。

河村麻紀、猫白血病ウイルスの gag 遺伝子における組み換え現象、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 - 9 月 16 日、岩手大学(盛岡市)。

五島渉、鯨類・鰭脚類における内在性レトロウイルスの遺伝的多様性、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 - 9 月 16 日、岩手大学(盛岡市)。

〔図書〕(計 1 件)

西垣一男、アニマルメディア社、フェリス、2013、8 ページ

〔その他〕

ホームページ

<http://www.vet.agr.yamaguchi-u.ac.jp/lab/02infectious.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西垣 一男 (NISHIGAKI Kazuo)

山口大学共同獣医学部・准教授

研究者番号:20401333

(2)研究分担者

辻本 元 (TSUJIMOTO Hajime)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号:60163804