

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300153

研究課題名(和文) マウスノロウイルス主要キャプシド蛋白Pドメインの機能解析と感染阻止効果

研究課題名(英文) Immunological function and infection control analysis of murine norovirus capsid protein P domain

研究代表者

國田 智 (KUNITA, SATOSHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10195472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,700,000円、(間接経費) 4,710,000円

研究成果の概要(和文)： マウスノロウイルス(MNV)の組換えVP1タンパク質を用い、高感度かつ特異性の高いMNV抗体測定法を確立した。MNVはマウスに持続感染して1年以上も感染源となり、その間、常に高い血中抗体価の維持が観察された。VP1タンパク質の構造中で免疫原性に優れた領域を検討した結果、VP1-P2サブドメインが最も強力な抗体誘導能を有していることが明らかになった。しかし、VP1-P2サブドメインに対する血中抗体を誘導するだけでは、マウスへのMNV感染は阻止できず、粘膜局所IgAなどの腸管免疫の必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Antibody measurement methods for murine norovirus (MNV) with high specificity and sensitivity were established using the recombinant VP1 protein of MNV. We found that mice can be persistently infected with MNV. The infected mice served as a source of infection for more than one year, and high blood antibody was maintained. Examination of strongly immunogenic region within VP1 protein revealed that VP1-P2 subdomain has the most potent antibody-induced activity. However, a simple approach to induce systemic antibodies to VP1-P2 subdomain could not prevent MNV infection in mice. It may be necessary to induce intestinal immunity such as mucosal IgA to control MNV infection effectively.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：マウスノロウイルス キャプシドタンパク質 診断 抗体 抗原性 免疫原性 感染阻止

## 1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス (NoV) は世界各地で発生しているヒトのウイルス性下痢症の主たる原因ウイルスであり、ウイルスに起因する食中毒発生事例の 95%以上を占めている。また、NoV は冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスでもある。一般には軽症で経過するが、高齢者や乳幼児においては下痢、嘔吐による脱水等で重症化し死に至ることもある。日本国中で年間 135 万人の発症例があると推計されている。また、NoV はウイルス粒子 10~100 個で感染が成立することに加え、環境中で安定であるため、伝播力が極めて強いという特徴もある。ボランティアによる NoV 感染実験で症状や病理像、免疫応答などが明らかにされており、NoV の初感染例では持続的な防御免疫が成立しない場合があることも報告されている。NoV 感染により抗体産生などの獲得免疫は誘導されており、この防御免疫の欠如の理由は未解明である。最近では reverse genetics による分子生物学的・ウイルス学的解析が可能になったものの、NoV では細胞培養系のウイルス増殖法が確立していないこと、ヒトが唯一の感受性宿主であるために感染動物モデルが存在しないことから、感染機序や増殖様式について不明な点が多い。さらに、有効な治療・予防法に関しても、開発の目処は立っていないのが現状である。ノロウイルスは構造が単純であるため、ウイルスの構造蛋白の合成を阻害するような薬物の開発を想定した場合、その作用点と推測されるウイルスの部位が限られ、有効な抗ウイルス剤を開発することが難しいと考えられる。また、遺伝子型が多いため、全ての遺伝子型に有効な抗ウイルス剤やワクチンの開発には困難が予想される。

2003 年に発見されたマウスノロウイルス (MNV) は、ノロウイルス属の中で培養細胞での増殖系が確立された唯一のウイルスである。さらに、MNV は NoV と同様に消化器系

を標的とする病原体であり、ごく少量の 1~100 CFU のウイルスで糞口感染が成立する。MNV の粒子構造や遺伝子構造も NoV と類似しており、1 種類の主要構造タンパク質 VP1 が 180 分子会合してカプシドを形成し、その内部に 1 分子のゲノム RNA と数分子の VP2 タンパク質が含まれている。ゲノム RNA は NoV で全長約 7.6kb、MNV で約 7.4kb であり、共に 3 つの ORF が存在している。ORF1 は NTPase、protease、polymerase などの非構造タンパク質をコードし、ORF2 と ORF3 は構造タンパク質 VP1 と VP2 をそれぞれコードしている。ノロウイルス属は Genogroup (GG) ~ に大別され、このうちヒトの NoV は GG と GG に属し、マウスの MNV は GG に分類される。ウイルス増殖系の確立されていない NoV の研究では、バキュロウイルス発現系を用いたウイルス様中空粒子 (virus-like particles, VLPs) の作製により、抗原性や粒子構造の解析が急速に進展した。NoV の VP1 は 3 つのドメインで構成され、N 末端の N ドメインと中央部の Shell (S) ドメインは VLP の粒子内部に埋まっており、C 末端の protruding (P) ドメインが VLP の表面に突出していることが X 線構造解析の結果などから明らかになっている。P ドメインはさらに P1、P2 の 2 つのサブドメインで構成されており、P1 サブドメインは P ドメインの両端にコードされ遺伝子型や血清型間で配列の共通性が高い。一方、P2 サブドメインは P ドメイン中央部にコードされ配列の多様性が高頻度にみられる。NoV の P2 サブドメインには、中和抗体の認識領域や弱毒変異株のミューテーションサイトが同定されており、VLP が細胞に接着する時のレセプターとして機能する血液型糖鎖抗原との結合にも P2 サブドメインが関与することが報告されている。MNV の VP1 も NoV と同様なドメインから構築されており、中和エプーブや弱毒化変異が P2 サブドメイン上に同定されている。

このように MNV と NoV は共通性の高い生物学的特徴と分子生物学的特徴を有している。そのため、MNV は細胞内や動物個体内でのノロウイルスの生物学的な機能解析や診断・予防法の開発を行う上での貴重なモデルとして注目されている。しかし、MNV 構造タンパク質と感染性、病原性との関係は明確になっていないのが現状である。また、感染動物モデルとして利用する上で基礎となる MNV に関する実験動物学的知見、すなわち MNV の感染性、病原性、ウイルス体内動態、宿主であるマウスの感受性、免疫応答については詳細な検討が行われていない。したがって、マウスの MNV 感染をヒトの NoV 感染のモデルとして利用するにあたっては、実験動物学的な基盤知見の整理、さらにノロウイルス感染症の治療・予防法開発のためのマウスを用いた戦略の実証が不可欠な課題である。

## 2. 研究の目的

マウスノロウイルス (MNV) はヒトのノロウイルス (NoV) と同様、消化器系を標的組織とするウイルスであり、ゲノムや構造タンパク質の構成は両ウイルス間で共通性が高い。しかし、MNV を NoV 感染のモデル系として利用するには、MNV の感染・増殖機構や MNV に対する免疫応答について詳細な解明が求められる。本研究課題は、このような現状からの発展を求め、マウス個体内での MNV 感受性、ウイルス動態、病原性、免疫応答について宿主要因との関連に基づいて解析するものである。さらに、MNV の主要構造タンパク質 VP1 についてレセプター結合や中和抗体の結合に重要と予想される P ドメインに着目して機能解析するとともに、組換え抗原を用いた感染阻止やワクチネーションによる感染予防の有効性を評価することを最終目標とする。

## 3. 研究の方法

MNV のマウス実験感染系を NoV 感染のモデルとして利用する上で不可欠な基盤的手技

や知見の整備、ならびにノロウイルスの感染や防御に関わる分子機構を解明し、予防・治療法開発に応用することを目的に、以下の4段階に分けて研究を実施した。

- 1) MNV 感染検出系の構築、およびその検出精度のバリデーション
- 2) MNV 感染実験モデル系の構築とマウス個体内での MNV の動態および免疫応答の特性解析
- 3) MNV の主要キャプシドタンパク質である VP1、およびその重要な構成ドメインである P ドメイン、P2 ドメインの抗原性解析
- 4) MNV 感染実験マウスモデルにおける VP1 および P、P2 各ドメインの免疫誘導能ならびに感染阻止効果の解析評価

## 4. 研究成果

- (1) MNV 感染検出系の構築、およびその検出精度のバリデーション

我々が分離した MNV - UT 株から pGEX ベクター大腸菌発現系を用いて GST 融合組換え VP1 抗原を作製し、酵素抗体 (ELISA) 法および蛍光マイクロビーズ (MFI) 法による抗体測定系を構築した。これら抗体検査の特異性は、(公財) 実験動物中央研究所で分離した MNV-JI10 株の感染細胞 RAW264.7 を用いた間接蛍光抗体 (IFA) 法で検証した。MNV の PCR 検査は、盲腸または糞便 RNA を検体とし、RNA polymerase 遺伝子の 466-base を標的とする nested RT-PCR 法により行った。MNV 陽性 8 施設のマウス 148 匹を用いた解析の結果、各検査法の検出感度は、PCR が 87%、IFA が 90%、ELISA が 88%、MFI が 91% とほぼ同レベルであった。一方、MNV 陰性 29 施設のマウス 162 匹を用いて評価した特異性は、PCR と IFA が 100%、ELISA が 96%、MFI が 90% であり、MFI は感度が高く、ELISA は特異性に優れていた (図 1)。以上の結果、組換え VP1 抗原を用いた ELISA や MFI でスクリーニングし、IFA で確認する MNV 血清検査法の実用性が示された。

表1 MNV自然感染および非感染マウスにおけるPCR法と各種抗体検査法の検出感度・特異性の評価

		陽性個体数			
		RT-PCR	rVP1- MFI	rVP1- ELISA	IFA
MNV陽性 8施設	RT-PCR 陽性マウス (n=80)	60	55	53	53
	RT-PCR 陰性マウス (n=88)	0	8	8	9
	検出感度	87% (60/69)	91% (63/69)	88% (61/69)	90% (62/69)
MNV陰性 29施設	RT-PCR 陰性マウス (n=162)	0	17	7	0
	特異性	100% (162/162)	90% (145/162)	96% (155/162)	100% (162/162)

(2) MNV 感染実験モデル系の構築とマウス個体での MNV の動態および免疫応答の特性解析

MNV 未感染 BALB/c マウスを RT-PCR 陽性 MNV 自然感染マウスと同居させ、12 か月後まで定期的に血清と糞便を採取した。血清サンプルについては MFI で MNV 抗体を測定し、糞便サンプルからは RT-PCR で MNV RNA の検出を実施したところ、同居1週目から1年後まで80%以上の個体で RT-PCR 法で糞便中に MNV が検出された。一方、MFI 法による抗体検査では同居 3 週目から抗体陽性例が検出され始め、12 週後に陽性率が 100%に達し、12 か月後も全個体が抗体陽性を示した(表2)。また、抗体価は 9 か月後まで上昇し続け(100 倍希釈血清で平均 MFI 値が約 10,000)、12 か月後に低下傾向がみられたものの、高い抗体価を維持し続けた。したがって、MNV 感染マウスでは、糞便中へのウイルス排出が1年以上続いて長期に感染源となり、その間も高い血中抗体価が維持されることが明らかとなった。

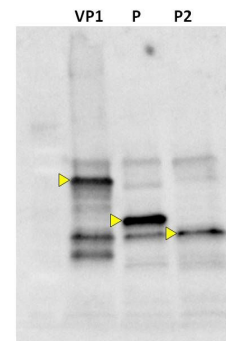
表2 MNV同居感染マウスでのMFI法とRT-PCR法によるウイルス検出の比較

		Post contact infection									
		0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	8w	12w	
Exp. 1 (n=11)	MFI	0/11	0/11	0/11	2/11	3/11	7/11	10/11	10/11	11/11	
	RT-PCR	0/11	10/11	11/11	11/11	11/11	11/11	8/11	9/11	11/11	
		Post contact infection									
		1M	2M	3M	5M	7M	9M	12M			
Exp. 2 (n=36)	MFI	38%	91%	100%	100%	100%	100%	100%			
	RT-PCR	81%	80%	75%	88%	82%	69%	80%			

(3) MNV の主要キャプシドタンパク質 VP1、および P ドメイン、P2 ドメインの抗原性解析  
His-tag 化した VP1-full component、

VP1-P ドメイン、VP1-P2 サブドメインを組換えタンパク質として pET ベクターを用いた大腸菌発現系で作製し、MNV 実験感染マウス血清の各組換え抗原に対する反応性を immunoblot 法で解析した。その結果、VP1-full component 抗原および P ドメインとの反応性が強く、P2 サブドメインとの反応性は他の組換え抗原よりも弱いことが明らかになった(図1)。

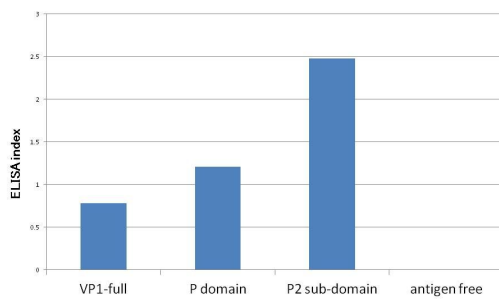
図1 組換えMNV抗原のimmunoblot解析



(4) MNV 感染実験マウスモデルにおける VP1 および P、P2 各ドメインの免疫誘導能ならびに感染阻止効果の解析評価

P ドメインおよび P2 サブドメインの抗原性が上記 immunoblot 解析での反応性に反映されていない可能性も予想されるため、His-tag 化した VP1-full component、VP1-P ドメイン、VP1-P2 サブドメインを ICR マウスに免疫し、各組換えタンパク質の免疫原性を解析した。免疫は 40 μg の各抗原を Freund's incomplete adjuvant との乳剤とし、皮下接種を 3 回繰り返した。免疫後のマウスから採取した血清中抗体の MNV に対する反応性を、細胞培養系で増殖・精製した MNV-JI10 株を抗原とする ELISA 法で測定した。その結果、P2 サブドメイン免疫群が最も高い抗 MNV 抗体価を示し、次いで P ドメイン免疫群、VP1-full component 免疫群の順であった(図2)。以上の実験成績より、P2 サブドメインが最も強力な抗 MNV 抗体誘導能を有することが明らかになった。

図2 MNV 組換え抗原の免疫原性



続いて、MNV-UT 株由来の VP1、P、P2 の各組換えタンパク質を用いて ICR マウスに抗体誘導し、MNV-J10 株に対する感染阻止効果を検討した。両株の VP1 タンパク質は 97% のアミノ酸一致率であり、MNV 分離株間では比較的一致率の高い関係にあるが、高力価の抗 MNV 抗体を産生した P2 サブドメイン免疫群で MNV 感染後のウイルス検出時期が遅延する傾向がみられたものの、非免疫対照群と比較して有意な感染率低減効果は認められなかった。組換え抗原に対して誘導された抗体は MNV に対する中和活性を有することが確認されていることから、MNV に対する感染防御免疫を獲得するには消化管での高力価の IgA 産生が必要である可能性が高い。今後、IgA 産生を強力に誘導するための免疫方法の改良等を加え、VP2 免疫療法の有効性をさらに検討する計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kunita S, Kato K, Ishida M, Hagiwara K, Kameda S, Ishida T, Takakura A, Goto K, Sugiyama F, Yagami K、Simultaneous detection of antibodies to mouse hepatitis virus recombinant structural proteins by a microsphere-based multiplex fluorescence immunoassay.、Clin Vaccine Immunol.、査読有、Vol.18、No.5、2011、758-766 .

〔学会発表〕(計 2 件)

國田智，加藤花名子，亀田周子，石田智子，林元展人，高倉彰，杉山文博，八神

健一、マウスノロウイルスの抗体検査と PCR 検査の比較評価、第 58 回日本実験動物学会総会、2011 年 5 月 26 日、東京。

國田智，加藤花名子，亀田周子，石田智子，林元展人，高倉彰，杉山文博，八神健一、マウスノロウイルスの各種抗体検査および PCR 検査の感度と特異性、第 60 回日本実験動物学会総会、2013 年 5 月 15 日、つくば。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

國田 智 (KUNITA, Satoshi)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10195472

(2) 研究分担者

八神 健一 (YAGAMI, Ken-ichi)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：40166476