

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780294

研究課題名（和文） 日本人による日本脳炎の完全コントロールに向けて

研究課題名（英文） Control of Japanese encephalitis by Japanese Researchers

研究代表者

下島昌幸 (SHIMOJIMA MASAYUKI)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長

研究者番号：10422411

研究成果の概要（和文）：

日本脳炎ウイルス（以下JEV）は人や馬に感染し脳炎を、豚に感染し流産を引き起こす。本研究ではJEVの感染から発症までのウイルス動態を臓器・細胞・分子レベルで具体化することを目的とした。

JEVの増殖が認められないDaudi細胞にC型レクチンDC-SIGN, DC-SIGNR, LSEctin分子を発現させたところ、増殖が認められるようになった。ただしその効果は発現させる分子およびJEVを調製した細胞に依存した。JEVのE蛋白質の分子量は調製した細胞により異なっていたが、明確な糖鎖構造の差異は見いだせなかった。レクチンを介した感染は糖鎖構造を主とするMannanやGlcNAc β 1-2Manにより特異的に阻害された。

これらから次のことが考えられる。JEVは蚊の吸血により皮内に侵入し樹状細胞などにDC-SIGN分子を介して感染する。増殖したウイルスは血流に乗り樹状細胞以外のDC-SIGNRやLSEctinを発現している肝類洞や胎盤の内皮細胞に感染し良く増殖する。感染した細胞で受ける糖鎖修飾が異なるため、次の標的も変わる。胎盤内皮細胞への感染は妊娠豚の流産と関係するかも知れない。中枢神経系に良く感染する傾向を持つ日本脳炎ウイルスを産生する細胞種が体内にあるのかも知れない。

研究成果の概要（英文）：

JEV causes encephalitis in humans and horses and abortion in pregnant pigs. The infection mechanism of JEV was comprehensively studied to clarify JEV dynamics at the levels of organs, cells, and molecular levels.

Expression of DC-SIGN, DC-SIGNR, and LSEctin, separately, made Daudi cells susceptible to JEV infection, while their effects depended on the origins of cell lines used for JEV preparation as well as the molecules expressed. Molecular weights of JEV envelope (E) protein were different among cell lines used, while structural differences of sugar chains on the E protein were unclear. Lectin-mediated infection was specifically inhibited by mannan or GlcNAc β 1-2Man.

These results suggest a model of JEV dynamics in vivo: JEV invades via skin-bites of infected mosquitoes and infects dendritic cells expressing DC-SIGN molecules. JEV produced by dendritic cells enters blood stream and infects other cells such as endothelial cells which express DC-SIGNR and/or LSEctin. Sugar modification of JEV E protein may depend on cell types infected and also affect a next target. Infection of placental endothelial cells may result in abortion of pigs. Cells producing JEV which tends to infect the central neuron system well could exist in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,016,848	4,516,848

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：病原微生物

1. 研究開始当初の背景

日本脳炎ウイルスは人や馬に感染し脳炎を、妊娠した豚に感染し流産や死産を引き起こす。蚊の吸血を介して豚や鳥で増殖しており、東南アジアを中心に日本・韓国・中国・極東ロシア・インド・オーストラリア大陸に分布している。

日本脳炎という疾患は1870年代に日本において初めて認識され、その原因ウイルスである日本脳炎ウイルスはやはり日本人によって初めて分離された。ウイルスの分離後は、より一層の研究が日本で行われ、開発された不活化ワクチンは日本脳炎では唯一WHOの承認を受けている。

ところで、このような日本人による輝かしい研究成果の一方で、日本脳炎の本質すなわち吸血時のウイルスの感染細胞や感染メカニズム、増殖部位、脳への到達経路、脳炎を引き起こすメカニズムについてはあまり解析がなされていない。その理由は早期にワクチン開発がなされたこと、また欧米の先進国には日本脳炎ウイルスが存在せず研究対象にされにくいことなどであろう。しかし日本脳炎の歴史における日本人研究者の位置づけ、そして次のような現状から“日本人による日本脳炎の完全コントロールに向けて”、本質を見直す研究に取り組むべきであると考えた。

・ワクチンを用いても身の回りから日本脳炎ウイルスがいなくならない。
・不活化ワクチンはコストが高い。
・治療法や治療薬がない。
・世界的には患者数は増加中。
・弱毒生ワクチンも含めウイルスの動態が分かっておらず、その使用には不安がある。
・人での解析は戦前は比較的行われていたが、近年は殆ど行われていない。
・感染に関わる細胞側の候補分子の解析は限られたものである。

2. 研究の目的

日本脳炎ウイルスの感染メカニズムを包括的に調べ、『感染から発症までのストーリーを臓器、細胞、分子レベルで具体化する』ことを目的とした。

3. 研究の方法

日本脳炎ウイルス:2002年にブタから分離された genotype I 株である JEV/sw/Chiba/88/2002 を用いた。通常は

蚊由来 C6/36 細胞で増殖させたものを用い、力価測定は Vero 細胞におけるプラーク法で行った。

各種培養細胞における日本脳炎ウイルスの増殖:様々な培養細胞を用い、日本脳炎ウイルスの増殖曲線を描く。ウイルスの力価測定は Vero 細胞を用いたプラーク法で行った。

C型レクチンファミリーからの日本脳炎ウイルスの受容体の探索:C型レクチンファミリーの10分子ほどについては既に発現ウイルスベクターとして所持しているため、各分子を細胞株にレンチウイルスベクターを用いて発現させ、ウイルスの結合性や増殖性を調べた。

細胞への JEV の結合評価:抗フラビウイルス抗体 4G2 を用いたフローサイトメトリーで行った。

4. 研究成果

(1) 各種培養細胞における JEV の増殖

JEV を moi 0.02 で各種培養細胞に感染させ、上清中の力価を経時的に測定した。用いた培養細胞は、JEV の調製や分離に良く用いられるサル由来 Vero 細胞と、ヒト由来の 293, HeLa, HT1080, A549, Jurkat Daudi 細胞を用いた。多くの細胞株で JEV の増殖が認められたが、Daudi 細胞では増殖は認められなかった。

(2) C型レクチンファミリーからの JEV の受容体探索

JEV の増殖が認められなかった Daudi 細胞に C 型レクチンである DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin, ASGPR1, ASGPR2, ASGPR2b, CLEC2-1, CLEC4A, CLEC4D, CLEC4E を安定的に発現させ、JEV を感染させた。48 時間後の上清を回収し力価を測定したところ、DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin を発現させた Daudi 細胞では 10^5 pfu/ml 以上の JEV が、また ASGPR1 を発現させた Daudi 細胞では 5.5×10^1 pfu/ml の JEV が認められたが、その他を発現させた場合には JEV は検出されなかった(検出限界は 5×10^0 pfu/ml)。

(3) Daudi 細胞への C 型レクチン分子の発現

C 型レクチン分子を発現することにより JEV の増殖が認められるようになった DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECtin, ASGPR1 発

現 Daudi 細胞のうち、抗体が利用可能である前者 3 についてフローサイトメトリーにより各分子の発現を調べた。いずれの分子も 95%以上の細胞で発現が確認された。

(4) C型レクチン発現 Daudi 細胞での JEV 増殖曲線

DC-SIGN, DC-SIGNR, LSEctin 発現 Daudi 細胞における JEV の増殖を調べた(図 1)。DC-SIGNR 分子の発現により、早期からの顕著な JEV の増殖が認められた。DC-SIGN 分子の場合には、中程度で一過性の増殖が認められた。LSEctin の場合には、効率は悪いものの持続的な JEV の増殖が認められた。

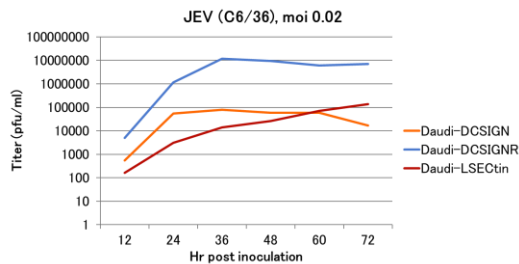
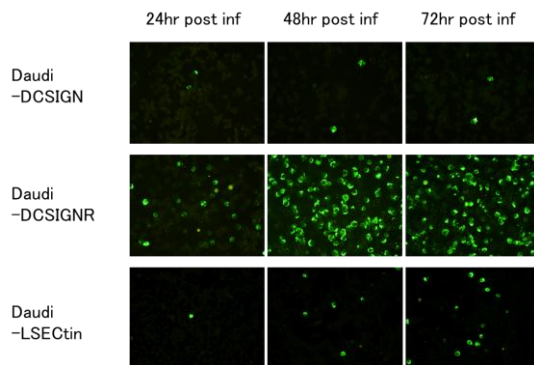


図 1 : C型レクチン発現 Daudi 細胞における JEV の増殖曲線

(5) C型レクチン発現 Daudi 細胞での JEV の抗原

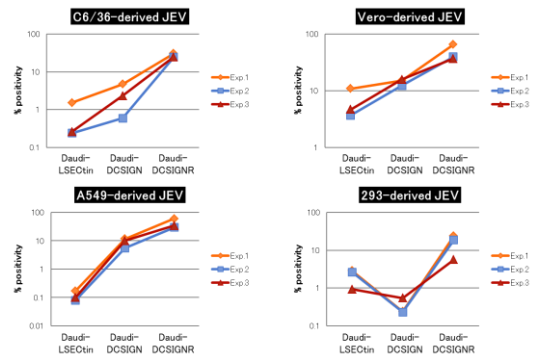
上記 (4) の実験における細胞内 JEV 抗原を間接蛍光抗体法で調べた(図 2)。DC-SIGNR 発現細胞では早期から割合が上昇する JEV 抗原陽性細胞が認められたが、DC-SIGN 発現細胞ではわずかな陽性細胞が見られるものの割合は増加していないように見受けられた。これに対し LSEctin 発現細胞の場合、抗原陽性細胞は早期にはごくわずかであるものの時間経過とともにその割合は増加し続けていた。



(図 2) C型レクチン発現 Daudi 細胞における JEV 抗原

(6) JEV の調製に用いる細胞と C 型レクチンの関連性

(4) および (5) の結果から次のことが考えられた。蚊由来細胞で増殖させた JEV は DC-SIGNR 発現細胞に良く感染し、DC-SIGN や LSEctin 発現細胞にはわずかに感染すること。Daudi 細胞から産生された JEV の DC-SIGNR や LSEctin 発現細胞への感染具合も同様であるが、DC-SIGN 発現細胞へは感染しないこと。このことから、JEV を調製する細胞により C 型レクチンの効果は異なると考えられた。そこで JEV を (これまで通り) 蚊由来の C6/36 細胞、哺乳類由来の Vero 細胞、A549 細胞、293 細胞で調製し、C 型レクチン発現細胞への感染率を比較した。感染は moi 0.02 で行い、感染後 12 時間後にフローサイトメトリーにより感染率を測定した(図 3)。Vero 細胞、A549 細胞で調製した JEV を用いた場合にはこれまでと同様の傾向が認められ、効率は DC-SIGNR > DC-SIGN > LSEctin の順であった。しかし 293 細胞で調製した JEV

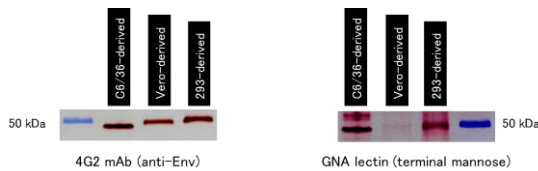


を用いた場合には、LSEctin と DC-SIGN 分子の効果は逆転していた。

(図 3) JEV 調製細胞と C 型レクチンの関連

(7) JEV の E 蛋白質の糖鎖修飾

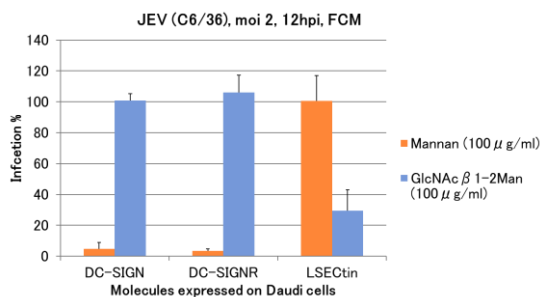
C 型レクチンは糖鎖を認識する分子であるとされる。(6) の結果は JEV のエンベロープ蛋白質である E 蛋白質が受ける糖鎖修飾が調製した細胞により異なることを示唆していた。そこで C6/36 細胞、Vero 細胞、293 細胞で調製した JEV を PEG 濃縮し、ウェスタンブロットにて分子量およびレクチン結合能、糖分解酵素への反応性を調べた。E 蛋白質の分子量は 3 細胞種で異なっていた(図 4)。末端の糖鎖を認識する GNA レクチンはいずれの細胞で調製した JEV にも結合を示した(図 5)。糖分解酵素 Endo H でわずかに分子量が減少すること、PNGaseF でさらに小さい分子量になることはいずれの細胞で調製した JEV でも同様であった。



(図4、左) JEV E 蛋白質の分子量
(図5、右) GNA レクチンとの反応性

(8) C型レクチン発現細胞への感染に対する糖の効果

C型レクチンを介した JEV の感染に糖が関わるか調べるため、high mannose 構造よりなる mannan および 2 糖よりなる GlcNAc β 1-2Man の存在下での感染実験を行った (図6)。DC-SIGN、DC-SIGNR 発現細胞への感染は mannan により、LSEctin 発現細胞への感染は GlcNAc β 1-2Man により特異的に阻害された。



(図6) C型レクチン発現細胞への感染における糖の影響

以上のことは次のことを示している。C型レクチンの3分子 DC-SIGN, DC-SIGNR, LSEctin は JEV の E 蛋白質上の糖鎖を特異的に認識して JEV の細胞への感染を高める。DC-SIGN は樹状細胞やマクロファージに、DC-SIGNR はリンパ節・肝類洞・胎盤の内皮細胞に、LSEctin はリンパ節・肝類洞の内皮細胞に発現しており、これらの細胞は C 型レクチンを発現しているが故に JEV の感染を受けやすくなっている。3分子の中では DC-SIGNR が最も効果が強く、DC-SIGN の効果は JEV が産生された細胞に依存する。

このことから、JEV の生体内の動態として次のようなストーリーが描ける。JEV は蚊の吸血により人や馬の皮内に侵入した後、樹状細胞などに DC-SIGN 分子を介して感染する。樹状細胞で増殖したウイルスは血流に乗るなどして樹状細胞以外の細胞に感染していく。DC-SIGNR や LSEctin を発現している肝類洞や胎盤の内皮細胞に感染していき、良く増殖する。感染した細胞で E 蛋白質が受ける糖鎖修飾が変わるに伴い次の標的も変えて JEV は体内で広まっていくのかもしれない。胎盤内皮細胞

への感染は妊娠豚の流産と関係するかも知れない。中枢神経系に良く感染する傾向を持つ JEV を産生する細胞種が体内にあって、そのために JEV は中枢神経に感染していき病態を示すのかもしれない。そのような細胞群を同定することが脳炎を発症するメカニズムの解明や阻止に役立つはずである。

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 15 件)

1. Shimoda H, Mahmoud HY, Noguchi K, Terada Y, Takasaki T, Shimojima M, Maeda K. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Japanese Encephalitis Virus. *J Vet Med Sci*. 2013 Mar 22. [Epub ahead of print]
2. Umeki S, Suzuki R, Ema Y, Shimojima M, Nishimura Y, Okuda M, Mizuno T. Anti-adhesive property of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) due to steric hindrance effect. *J Cell Biochem*. 2012 Jun; 114(6):1271-85.
3. Noguchi K, Shimoda H, Terada Y, Shimojima M, Kohyama K, Inoshima Y, Maeda K. Isolation of a novel herpesvirus from a Pacific white-sided dolphin. *Arch Virol*. 2013 Mar; 158(3):695-9.
4. Shimoda H, Inthong N, Noguchi K, Terada Y, Nagao Y, Shimojima M, Takasaki T, Rerkamnuaychoke W, Maeda K. Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs. *J Virol Methods*. 2013 Jan;187(1):85-9.
5. Terada Y, Shiozaki Y, Shimoda H, Mahmoud HY, Noguchi K, Nagao Y, Shimojima M, Iwata H, Mizuno T, Okuda M, Morimoto M, Hayashi T, Tanaka Y, Mochizuki M, Maeda K. Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5'-terminal region of the spike gene retains its virulence for cats. *J Gen Virol*. 2012 Sep;93(Pt 9):1930-4.
6. Shimojima M, Kawaoka Y. Cell surface molecules involved in infection mediated by lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein. *J Vet Med Sci* 74(10): 1363-1366, 2012

7. Nagao Y, Nishio Y, Shiomoda H, Tamaru S, Shimojima M, Goto M, Une Y, Sato A, Ikebe Y, Maeda K. An outbreak of canine distemper virus in tigers (*Panthera tigris*): Possible transmission from wild animals to zoo animals. *J Vet Med Sci* 74(6): 699-705, 2012
8. Shimojima M, Ströher U, Ebihara H, Feldmann H, Kawaoka Y. Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry. *J Virol* 86(4):2067-2078, 2012
9. Kameo Y, Nagao Y, Nishio Y, Shimoda H, Nakano H, Suzuki K, Une Y, Sato H, Shimojima M, Maeda K. Epizootic canine distemper virus infection among wild mammals. *Vet Microbiol* 154(3-4):222-229, 2012
10. Iwasa A, Halfmann P, Noda T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Watanabe S, Shimojima M, Watanabe T, Kawaoka Y. Contribution of Sec61 α to the life cycle of Ebola virus. *J Infect Dis* 204:S919-S926, 2011
11. Iwasa A, Shimojima M, Kawaoka Y. sGP serves as a structural protein in Ebola virus infection. *J Infect Dis* 204:S897-S903, 2011
12. Mahmoud HY, Suzuki K, Tsuji T, Yokoyama M, Shimojima M, Maeda K. Pseudorabies virus infection in wild boars in Japan. *J Vet Med Sci* 73(11):1535-1537, 2011
13. Shimoda H, Tamaru S, Morimoto M, Hayashi T, Shimojima M, Maeda K. Experimental infection of Japanese encephalitis virus in dogs. *J Vet Med Sci* 73(9):1241-1242, 2011
14. Shimojima M, Nagao Y, Shimoda H, Tamaru S, Yamanaka T, Matsumura T, Kondo T, Maeda K. Full genome sequence and virulence analyses of the recent equine isolate of Japanese encephalitis virus. *J Vet Med Sci* 73(6):813-816, 2011
15. Ishikawa M, Baba K, Shimojima M, Okada M, Shojima T, Miura T, Miyazawa T. Adaptation of feline immunodeficiency virus subtype B strain TM2 to a feline astrocyte cell line (G355-5 cells). *Vet Microbiol* 149(3-4):307-315, 2011

[学会発表] (計 23 件)

1. 下島昌幸、竹之内惇、下田宙、木村

- 菜穂、前田健：日本脳炎ウイルス感染へのC型レクチン3分子の異なる関与、第60回日本ウイルス学会総会、2012年11月
2. 野口慧多、下田宙、寺田豊、長尾裕美子、下島昌幸、香山薫、猪島康雄、前田健：イルカ由来新規ヘルペスウイルスの分離、第60回日本ウイルス学会総会、2012年11月
3. 前田健、秋山今日子、西尾陽平、吉田翔太、中嶋朋美、久保正仁、森本将弘、林俊春、佐藤宏、長尾裕美子、下島昌幸：イヌジステンパーウイルス新規遺伝子型の発見、第60回日本ウイルス学会総会、2012年11月
4. 下田宙、木村菜穂、野口慧多、寺田豊、長尾裕美子、高橋慧、高崎智彦、近藤高志、下島昌幸、前田健：日本脳炎ウイルス遺伝子型1に対する単クローナル抗体の性状解析とその応用、第60回日本ウイルス学会総会、2012年11月
5. 寺田豊、下田宙、野口慧多、長尾裕美子、Hassan Youssef、望月雅美、水野拓也、下島昌幸、前田健：スパイク遺伝子5'末端領域の欠損を有する猫伝染性腹膜炎ウイルスの野外での証明、第60回日本ウイルス学会総会、2012年11月
6. 長尾裕美子、佐藤梓、秋山今日子、鈴木絢子、下島昌幸、池辺祐介、前田健：動物園動物におけるイヌジステンパーウイルスの感染状況調査と予防の試み、第154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012年9月
7. 秋山今日子、西尾陽平、田丸精治、長尾裕美子、下田宙、酒井宏治、永田典代、森川茂、下島昌幸、前田健：自然宿主を用いた犬ジステンパーウイルス感染実験系の構築、第154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012年9月
8. 野口慧多、下田宙、寺田豊、長尾裕美子、下島昌幸、香山薫、猪島康雄、前田健：カマイルカから分離された新規アルファヘルペスウイルス、第154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012年9月
9. 下島昌幸、竹之内惇、下田宙、木村菜穂、前田健：日本脳炎ウイルスの感染へのC型レクチン3分子の異なる効果、第154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012年9月
10. 下田宙、高橋慧、高崎智彦、近藤高志、下島昌幸、前田健：日本脳炎ウイルス遺伝子型1に対する単クローナル抗体の作製と性状解析、第

- 154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012年9月
11. 木村菜穂、下田宙、高崎智彦、近藤高志、下島昌幸、前田健：日本脳炎ウイルスの*in vitro*での増殖性の比較、第154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012年9月
 12. 原由香、寺田豊、鈴木和男、沖田幸祐、下島昌幸、沖田極、前田健：イノシシにおけるE型肝炎ウイルス感染状況調査、第154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012年9月
 13. 寺田豊、下田宙、野口慧多、長尾裕美子、Hassan Youssef、望月雅美、水野拓也、下島昌幸、前田健：野外におけるスパイク遺伝子5'末端領域欠損猫伝染性腹膜炎ウイルスの存在、第154回日本獣医学会学術集会、岩手、2012年9月
 14. 下島昌幸、下田宙、木村菜穂、前田健、C型レクチンと日本脳炎ウイルス、第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011
 15. 下田宙、田丸精治、下島昌幸、前田健、日本脳炎ウイルスのイヌに対する感染実験：イヌは日本脳炎の安全かつ有用な調査対象、第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011
 16. 高杉真綾、安藤清彦、辻村行司、松村富夫、近藤高志、下島昌幸、前田健、馬鼻肺炎ウイルス型別診断法の更なる改良、第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011
 17. 西尾陽平、長尾裕美子、塩崎雄登、高杉真綾、松井信貴、渡部孝、鈴木和男、光田昌史、下島昌幸、前田健、イヌジステンパーウイルス流行地（和歌山、高知）のその後、第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011
 18. 松井信貴、塩崎雄登、野口慧多、寺田豊、下島昌幸、望月雅美、前田健、II型猫コロナウイルスの出現機序、第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011
 19. 塩崎雄登、寺田豊、松井信貴、野口慧多、下田宙、下島昌幸、水野拓也、望月雅美、宝達勉、前田健、抗体によるI型猫コロナウイルスのFcレセプター発現細胞への感染実験、第152回日本獣医学会学術集会、大阪、2011
 20. K Sakai, Y Nishio, N Nagata, Y Ami, K Komase, M Shimojima, K Maeda, M Takeda, M Saijo, S Morikawa. Characterization of canine distemper virus isolated from

cynomolgus monkeys during 2008 epizootic in Japan. XV International Congress of Virology、札幌、2011

21. H Shimoda, S Tamaru, M Shimojima, K Maeda. Dogs are good sentinels for Japanese encephalitis virus infection in rural/residential areas. XV International Congress of Virology、札幌、2011
22. M Shimojima, Y Shiozaki, N Shiba, H Shimoda, T Mizuno, T Hohdatsu, K Maeda. Rapid infection of feline infectious peritonitis virus to Fc receptor-expressing cells by addition of antibody. XV International Congress of Virology、札幌、2011
23. K Maeda, Na Matsui, Y Shiozaki, M Mochizuki, M Shimojima. Genetic evidence of type II feline coronavirus emerged by recombination between type I feline coronavirus and canine coronavirus in individual cats. XV International Congress of Virology、札幌、2011

〔図書〕（計1件）

1. 下島昌幸、補体、獣医微生物学（第3版、文永堂出版）327-329、2011

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下島 昌幸 (SHIMOJIMA MASAYUKI)
国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長
研究者番号：10422411

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：