

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380162

研究課題名(和文) レセプター遺伝子導入マウスを利用した抗ウマヘルペスウイルス1型戦略

研究課題名(英文) Generation of transgenic mice expressing equine herpesvirus-1 receptor and its application for antiviral strategies

研究代表者

木村 享史 (KIMURA, TAKASHI)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：90261338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウマ主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI分子はウマヘルペスウイルス1型(EHV-1)レセプターのエントリーレセプターとして機能する。全身諸臓器にウマMHCクラスI遺伝子を発現するトランスジェニックマウス(Tgマウス)を作製し、EHV-1を経鼻感染させた。TgマウスではWTマウスと比較してより重度の肺炎を発症し、また、肺組織中により多数のウイルス感染細胞が認められた。以上の結果から、外来性に導入したウマMHCクラスIがマウスのEHV-1感受性の増強に関与することが示唆された。また、EHV-1の主要標的細胞であるT細胞に特異的にMHCクラスIを発現するTgマウスを作製した。

研究成果の概要(英文)：Equine major histocompatibility complex (MHC) class I act as receptor molecules that play an important role in EHV-1 entry into equine cells. In this study, transgenic (Tg) mice expressing equine MHC class I were generated to explore whether the ubiquitous expression of equine MHC class I rendered mice more susceptible to EHV-1 infection and then developed more severe disease conditions. Tg mice were inoculated intranasally with EHV-1, euthanized, and subjected to pathological analyses. Tg mice developed more severe bronchointerstitial pneumonia than wild-type (WT) littermate mice. The number of virus antigen-positive cells distributed within lung tissues was higher in Tg mice than that in WT mice. These results suggest that exogenous expression of equine MHC class I may increase susceptibility of lung tissues to EHV-1 infection in Tg mouse. Tg mice having equine MHC class I expression in T cells, which are one of the major target of EHV-1, are also generated.

研究分野：農学

キーワード：ヘルペスウイルス ウマ レセプター トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) はウマに呼吸器症状、流産、脳脊髄炎を惹き起こす。その分布は世界的であり、日本国内においても呼吸器病、流産は頻繁に発生している。また近年、欧米諸国で脳脊髄炎の流行が多発している。

(2) EHV-1 感染症の実験的研究にはマウスがモデル動物として使用されてきた。しかしながら、通常、マウスは EHV-1 感染症の病態の一部である鼻肺炎しか再現せず、より有用な感染モデル小動物の開発が望まれている。

(3) 近年、ウマ主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子が EHV-1 のエンベロープ蛋白 gD と相互作用するエントリーレセプターとして機能することが明らかになった。一方で、マウスの MHC クラス I 分子は EHV-1 レセプター機能を示さず、このためマウス細胞は一部を除き EHV-1 に感染しない。しかしながら、ウマ MHC クラス I 遺伝子を外来性に発現させることにより、これらマウス細胞は EHV-1 感受性を獲得する。

2. 研究の目的

EHV-1 レセプター (ウマ MHC クラス I 分子) を EHV-1 標的細胞に強発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製し、新たな EHV-1 感染モデルとして確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ユビキタスな発現を誘導する CAG プロモーターの下流にウマ MHC クラス I 遺伝子を連結した遺伝子発現ユニット CAG-A68-B2M を作製し、マウスへの遺伝子導入を行った。

(2) CAG-A68-B2M ユニットの CAG プロモーター - ウマ MHC クラス I 遺伝子間に loxP-Stop-loxP 配列を挿入した遺伝子発現ユニット CAG-loxP-Stop-loxP-A68-B2M を作製し、マウスへの遺伝子導入を行った。

(3) CAG-A68-B2M ユニットを導入した Tg マウス (A68-B2M マウス) に EHV-1 を感染させ、病態を解析した。

(4) CAG-loxP-Stop-loxP-A68-B2M ユニットを導入した Tg マウス (LSL-A68-B2M マウス) を Lck-Cre マウス (T 細胞特異的に Cre 酵素が発現する) と交配した。これにより作製された Lck/A68-B2M マウス (T 細胞特異的にウマ MHC クラス I が発現する) の T 細胞に EHV-1 を持続感染させた。

4. 研究成果

(1) CAG-A68-B2M ユニットを導入した受精卵移植マウスより得られた 67 匹の産仔をジェノタイプング PCR で解析したところ、12 匹の

ファウンダーが得られた。これらに対し、BALB/c マウスをレシピエント系統としたバッククロスを行った。自然宿主である馬においてウイルス感染が認められる臓器 (肝臓、脾臓、肺、脳) に導入遺伝子産物 (MHC クラス I 蛋白) の発現が確認されたラインは最終的に 1 系統であった。

(2) CAG-loxP-Stop-loxP-A68-B2M ユニットを導入した受精卵移植マウスより得られた 119 匹の産仔をジェノタイプング PCR で解析したところ、5 匹のファウンダーが得られた。RT-PCR 法による解析で、導入遺伝子由来する mRNA を肝臓、脾臓、肺、脳に発現するラインを 2 つ選別し、BALB/c マウスをレシピエント系統としたバッククロスを行った。

(3) A68-B2M マウスに EHV-1 を経鼻感染させ、病理組織学的解析を行った。その結果、Tg マウス、野生型マウス (WT マウス) とともに肺において気管支間質性肺炎がみられ、Tg マウスでは WT マウスと比較して病変がより重度であった。さらに、Tg マウスでは、WT マウスと比較して肺組織中により多数のウイルス感染細胞が認められた。これらの結果は、外来性に導入したウマ MHC クラス I がマウスの EHV-1 感受性の増強に関与していることを示唆するものである。一方で、Tg マウス、WT マウスともに、肺以外の臓器では病変が認められなかった。

(4) Lck/A68-B2M マウスの全身臓器をウェスタンブロット法で解析したところ、胸腺特異的に MHC クラス I 蛋白の発現が確認された。EHV-1 を持続感染させた T 細胞におけるウイルス遺伝子 (mRNA) の発現は確認されなかった。

以上 4 年間の研究により、EHV-1 レセプター (ウマ MHC クラス I) を導入した Tg マウスが作製され、そのウイルス感受性が明らかとなった。A68-B2M マウスの解析から、ウマ MHC クラス I がマウス体内においてレセプターとして機能し、EHV-1 感受性の増強に関与していることが示唆された (論文作成中)。ウマ MHC クラス I を発現する他臓器 (肝臓、脳など) におけるウイルス感受性に関しては、病変を形成する実験条件をさらに検討中である。自然宿主である馬において EHV-1 は T 細胞に潜伏感染する。従って、Lck/A68-B2M マウスは潜伏感染の病態解析に特に有用なモデル系と考えられる。

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 20 件)

Kobayashi, S., Sasaki, M., Nakao, R., Setiyono, A., Handharyani, E., Orba,

- Y., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Kimura, T., Sawa, H*. 2015. Detection of novel polyomaviruses in fruit bats in Indonesia. *Arch Virol.* 160:1075-82. (査読有)
doi: 10.1007/s00705-015-2349-7
- Anindita, P.D., Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Orba, Y., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H.*, Kimura, T.. 2015. Detection of coronavirus genomes in Moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. *Arch Virol.* 160:1113-8. (査読有)
doi: 10.1007/s00705-015-2342-1.
- Kobayashi, S., Orba, Y., Yamaguchi, H., Takahashi, K., Sasaki, M., Hasebe, R., Kimura, T., Sawa, H. 2014. Autophagy inhibits viral genome replication and gene expression stages in West Nile virus infection. *Virus Res.* 191:83-91. (査読有)
doi:10.1016/j.virusres.2014.07.016.
- Guo, X., Izume, S., Okada, A., Ohya, K., Kimura, T., Fukushi, H. 2014. Full Genome Sequences of Zebra-Borne Equine Herpesvirus Type 1 Isolated from Zebra, Onager and Thomson's Gazelle. *J. Vet. Med. Sci.* 76:1309-12. (査読有)
- Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H., Kimura, T.* 2014. Isolation and characterization of a novel alphaherpesvirus in fruit bats. *J. Virol.* 88:9819-29. (査読有)
doi: 10.1128/JVI.01277-14
- Yamaguchi, H., Kobayashi, S., Maruyama, J., Sasaki, M., Takada, A., Kimura, T., Sawa, H., Orba, Y. 2014. Role of the C-Terminal Region of Vervet Monkey Polyomavirus 1 VP1 in Virion Formation. *J. Vet. Med. Sci.* 76:637-44. (査読有)
- Muleya, W., Sasaki, M., Orba, Y., Ishii, A., Thomas, Y., Nakagawa, E., Ogawa, H., Hang'ombe, B., Namangala, B., Mweene, A., Takada, A., Kimura, T., Sawa, H. 2014. Molecular Epidemiology of Paramyxoviruses in Frugivorous Eidolon helvum Bats in Zambia. *J. Vet. Med. Sci.* 76:611-4. (査読有)
- Sasaki, M., Muleya, W., Ishii, A., Orba, Y., Hang'ombe, B.M., Mweene, A.S., Moonga, L., Thomas, Y., Kimura, T., Sawa, H. 2014. Molecular epidemiology of paramyxoviruses in Zambian wild rodents and shrews. *J. Gen. Virol.* 95(Pt 2):325-30. (査読有)
- doi: 10.1099/vir.0.058404-0
- Makino, Y., Suzuki, T., Hasebe, R., Kimura, T., Maeda, A., Takahashi, H., Sawa, H. 2014. Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in particle transport. *J. Virol. Methods.* 195:250-7. (査読有)
doi: 10.1016/j.jviromet.2013.10.002
- Kobayashi, S., Suzuki, T., Igarashi, M., Orba, Y., Ohtake, N., Nagakawa, K., Niikura, K., Kimura, T., Kasamatsu, H. and Sawa H. 2013. Cysteine residues in the major capsid protein, Vp1, of the JC virus are important for protein stability and oligomer formation. *PLoS One*, 8: e76668. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0076668
- Sasaki, M., Ishii, A., Orba, Y., Thomas, Y., Hang'ombe, B. M., Moonga, L., Mweene, A. S., Ogawa, H., Nakamura, I., Kimura, T. and Sawa, H. 2013. Human parainfluenza virus type 3 in wild primates, Zambia. *Emerg. Infect. Dis.*, 19: 1500-1503. (査読有)
doi: 10.3201/eid1909.121404
- Kimura, T.*, Okumura, M., Kim, E., Sasaki, M., Orba, Y. and Sawa, H. 2013. Characterization of Japanese encephalitis virus infection in an immortalized mesencephalic cell line, CSM14.1. *Microbiol. Immunol.*, 57: 723-31. (査読有)
doi: 10.1111/1348-0421.12085
- Muramatsu, M., Yoshida, R., Miyamoto, H., Tomabeche, D., Kajihara, M., Maruyama, J., Kimura, T., Manzoor, R., Ito, K. and Takada, A. 2013. Heterosubtypic antiviral activity of hemagglutinin-specific antibodies induced by intranasal immunization with inactivated influenza viruses in mice. *PLoS One* 8: e71534. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0071534
- Yamaguchi, H., Kobayashi, S., Ishii, A., Ogawa, H., Nakamura, I., Moonga, L., Hang'ombe, B.M., Mweene, A.S., Thomas, Y., Kimura, T., Sawa, H. and Orba, Y. 2013. Identification of a novel polyomavirus from vervet monkeys in Zambia. *J. Gen. Virol.*, 94:1357-64. (査読有)
doi: 10.1099/vir.0.050740-0
- Muleya, W., Namangala, B., Simuunza, M., Nakao, R., Inoue, N., Kimura, T., Ito, K., Sugimoto, C. and Sawa, H. Population genetic analysis and sub-structuring of *Theileria parva* in the northern and eastern parts of Zambia. *Parasites and Vectors* 5:255,

2012. (査読有)
doi: 10.1186/1756-3305-5-255
Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Sawa, H., Nakamura, I. and Kimura, T.* Molecular detection of a novel paramyxovirus in fruit bats from Indonesia. *Virology J.* 9:240, 2012. (査読有)
doi: 10.1186/1743-422X-9-240
Suzuki, T., Semba, S., Sunden, Y., Orba, Y., Kobayashi, S., Nagashima, K., Kimura, T., Hasegawa, H. and Sawa, H. Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiol. Immunol.*, 56:639-646, 2012. (査読有)
doi:
10.1111/j.1348-0421.2012.00484.x
Muto, N.A., Sunden, Y., Hattori, T., Fujikura, D., Nakayama, Y., Miyazaki, T., Maruyama, M., Kimura, T. and Sawa, H. Pathological examination of lung tissues in influenza A virus-infected mice. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65:383-91, 2012. (査読有)
doi: 10.7883/yoken.65.383
Kobayashi, S., Orba, Y., Yamaguchi, H., Kimura, T. and Sawa, H. Accumulation of ubiquitinated proteins is related to West Nile virus-induced neuronal apoptosis. *Neuropathology* 32:398-405, 2012. (査読有)
doi:
10.1111/j.1440-1789.2011.01275.x
Muto, N.A., Yoshida, R., Suzuki, T., Kobayashi, S., Ozaki, H., Fujikura, D., Manzoor, R., Muramatsu, M., Takada, A., Kimura, T. and Sawa, H. Inhibitory effects of an M2-specific monoclonal antibody on different strains of influenza A virus. *Jpn. J. Vet. Res.* 60:71-83, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

福井 佑基、青島 圭佑、小林 篤史、木村 享史 . イヌ血管肉腫における Notch シグナルの役割の解析、第 3 回日本獣医病理学専門家協会学術集会、2015 年 03 月 30 日、三鷹市公会堂 (東京都)
港 江利奈、青島 圭佑、小林 篤史、木村 享史 . ウマヘルペスウイルス 1 型 レセプター遺伝子導入マウスの作製、第 10 回北海道獣医病理三大学セミナー、2015 年 08 月 29 日、合宿の宿ひまわり (北海道夕張市)
佐々木 道仁、Setiyono Agus、Handharyani Ekowati、中村 一郎、澤洋文、木村 享史 . インドネシア共和国に生息するオオコウモリから分離した新規ヘルペスウイルスの性状解析、第

156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 09 月 21 日、岐阜大学 (岐阜県)
小林 進太郎、大場 靖子、山口 宏樹、佐々木 道仁、長谷部 理絵、木村 享史、澤 洋文 . オートファジーによるウエストナイルウイルス増殖抑制機構の解明、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 09 月 20 日、岐阜大学 (岐阜県)
木村 享史、奥村 恵、金 恩美、佐々木 道仁、大場 靖子、澤 洋文 . ラット中脳由来神経細胞株 CSM14.1 における日本脳炎ウイルス感染様式、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 09 月 20 日、岐阜大学 (岐阜県)
木村 享史 . ウイルス感染と免疫 . 日本獣医病理学会スライドセミナー “炎症と免疫” 第 155 回日本獣医学会学術集会 (招待講演)、2013 年 03 月 30 日、東京大学 (東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

木村 享史 (Kimura, Takashi)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：9 0 2 6 1 3 3 8

(2) 研究分担者

佐々木 宜哉 (SASAKI, Nobuya)
北里大学・獣医学部・教授
研究者番号：2 0 3 0 2 6 1 4
(平成 24 年度～26 年度)

大西 なおみ (Ohnishi, Naomi)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン
ター・助教
研究者番号：50507217
(平成24年度~25年度)