

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580427

研究課題名(和文)牛パピローマウイルスの病原性解析

研究課題名(英文)Studies on the pathogenesis of bovine papillomavirus (BPV)

研究代表者

芳賀 猛 (Haga, Takeshi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20315360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：牛属はパピローマ(乳頭腫)が最も多く見られる家畜で、その病原体であるパピローマウイルス(PV)のゲノム型と病態との関係を解析した。本研究により、以下の成果が得られた。[1]牛属のヤクの皮膚乳頭腫から新規のPV型を発見し、ヤクの学名(*Bos grunniens*)にちなみ、BgPV-1と命名された。[2]これまで皮膚の乳頭腫病変からしか見つからなかったBPV-10を舌病変部から発見し、BPV-10の新たな病態を明らかにした。[3]我々が発見したBPV-12の感染病変部に、全長ゲノムにあわせて欠損ゲノムが存在していることを発見し、BPV病変に見られる欠損ゲノムの初めての報告がなされた。

研究成果の概要(英文)：Papilloma occurs most commonly in bovine species than in other domestic animals. To further understand the genomic character of PV in bovines in association with disease, we analyzed the PV genomes and pathology in natural cases in Bovis including cattle (*Bos taurus*) and yak (*Bos grunniens*). The following results were obtained: [1] A novel delta-PV type was discovered from a fibropapilloma of yak, and designated as *Bos grunniens papillomavirus type 1* (BgPV-1). [2] BPV-10, which has been associated specifically with cutaneous papilloma, was found from a lingual papilloma of a 31-month-old cow. [3] A novel xi-PV type was discovered from a tongue epithelial papilloma of a 28-month-old cow, and designated as BPV-12. Along with the 7.2kb full length genome, deleted 3.4kb genome co-existed. This was the first report describing a circular genome deletion detected in a naturally BPV-infected sample. These results contribute to further understanding of the diversity and pathogenicity of BPVs.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：パピローマウイルス 乳頭腫 牛 新型 ウイルスゲノム ヤク 欠損ゲノム

1. 研究開始当初の背景

パピローマウイルス(PV)は乳頭腫(パピローマ)を起こす濾過性病原体としてウサギで発見され、その存在は古くから知られていた。しかし細胞培養での増殖が難しいことから、ウイルス学的な研究は遅れていた。分子生物学の進展と共に、PVの遺伝子解析が進められ、ウイルス粒子の殻となるカプシドを形成するL1蛋白の遺伝子相同性を基礎とした分類法が確立され、研究が急速に進んだ。PVは一般に種特異性が高く、人を含め、様々な動物種で特異的なPVが見つかったりしている。

人パピローマウイルス(HPV)は、特に子宮頸ガンとの関係が明らかになり、その発ガン機序が解明されてくると共に、HPV-16やHPV-18といった発ガンリスクが高いHPVの型が明らかになってきた。これらの高リスク型のHPV情報をもとに、L1蛋白を発現させたウイルス様粒子(VLP)が子宮頸ガンワクチンとして予防に使われ、人では実用化段階に入っている。

一方、動物においては、牛が最もよく乳頭腫の見られる家畜として知られ、その病原体として牛パピローマウイルス(BPV)が知られている。我々は本研究申請時、すでに牛の上皮性乳頭腫から新しいPV型を発見し、ウイルスの分類のスタンダードとなる国際ウイルス分類委員会(ICTV)委員との協議を経て、BPV-12を命名していた。しかしHPVでは、既に百数十の型が知られているのに対し、牛ではまだ12の型しか知られておらず、未解明の型が多く存在すると考えられる。またHPVにおいては、子宮頸ガンを引き起こしやすい高リスク型やその発ガン機序が解明されつつあるが、BPVに関しては型と病態についての知見

は十分に蓄積されていない。さらにPVは、一般に種特異性が高く、他の動物種へ伝播することはないと言われるが、BPV-1は唯一の例外として、馬に感染し、サルコイド症を発症することが知られている。種特異性を規定している因子は未解明であるが、BPVでは、このように種を越えて感染する例外が知られている。こういったことから、BPV感染を疑う自然症例を解析し、病変部におけるBPVゲノムの実態とその病態との関係を研究することは、BPVの病原性解明に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

牛パピローマウイルス(BPV)の病原性を解明するため、以下の3項目を実施する。

(1)新規BPVの検索：病変部に由来する未知のBPV候補を解析し、ICTVの国際基準に則り、新型BPVの基準を満たす場合には命名をし、新規BPVの型を提唱する。

(2)腫瘍に關与するBPVの性状解析：BPVが検出される腫瘍組織で、BPVの遺伝子性状と病理組織学的特徴を解析し、遺伝子型と病態の相関に関する知見を集積する。

(3)BPV発病に關与する因子の解析：BPV感染病変部に見られたBPV遺伝子欠損ゲノムの特徴を解析する。

3. 研究の方法

(1)新規BPVの検索：

PV感染を疑う検体からDNAを抽出し、L1遺伝子領域のPVコンセンサスプライマーにてPCRを実施した。陽性検体については、L1遺伝子の塩基配列を決定し、相同性検索からその型を決定した。新規の型を提唱するために、ICTVの基準に則り、全ゲノムのベクターへのクローニングを実施するとともに、全ゲノムの遺伝子配

列を決定した。また既知の PV ゲノム構造と比較することより、その遺伝子性状を明らかにした。さらに、その病変部の特性を明らかにするため、HE 染色や特殊染色といった病理組織学的解析を行った。また抗 PV 抗体を用いた免疫染色により、病変組織におけるウイルス抗原の発現を観察した。

(2) 腫瘍に關与する BPV の性状解析：牛の腫瘍症例から見つかった BPV の遺伝子的特徴を解析するとともに、病理組織学的解析を実施し、これまで知られている PV 型と病態との相関を考察した。

(3) BPV 発病に關与する因子の解析：BPV 陽性の腫瘍病変部で見られた、一部遺伝子欠損した BPV (BPV-12-del) 遺伝子の解析を行った。臨床検体の中での BPV-12-del の量的な解析をするため、リアルタイム PCR 法を用いて、欠損型ゲノム (BPV-12-del) と、完全長の BPV ゲノムとの割合を算出した。

4. 研究成果

本研究により、以下の成果が上がった。

(1) 牛属の新しい PV 型としての BgPV-1 の発見：

中国青海省の高地に生息する牛属、ヤクの体表部に見られたパピローマより新しい PV 型を発見した。7946 bp の全塩基配列を決定して遺伝子性状を明らかにするとともに、全遺伝子をプラスミドベクターにクローニングし、ICTV が定める国際基準をクリアしたことから、命名を進めた。ICTV 委員との協議により、ヤクは家畜の牛 (*Bos taurus*) と同じ牛属だが、亜属が違うため、BPV とは独立した新たな PV として、ヤクの学名 (*Bos grunience*) に因み、BgPV-1 と命名することとした。論文発表により BgPV-1 の名称は国際的に認知された。L1 の遺伝子配列に基づく系統樹からは BgPV-1 は、BPV の中では BPV-1 や BPV-2 に最も近く、

(デルタ) 4 PV に属することが明らかとなった (図1)。病変部の病理組織学的解析結果は線維性乳頭腫で、免疫染色により PV 抗原も検出された。これらの病理学的特徴は、牛でよく見られる BPV-1 や BPV-2 による線維性乳頭腫と類似している。ヤクは牛と比較して高地での生活に馴化した動物であり、本研究で解析したヤクは、地域的に牛との接触はほとんどなかったと考えられる。このことから、ヤクを宿主とする BgPV-1 は、BPV-1 や BPV-2 と同じ祖先の PV が、同様の病原性を保持しつつ、宿主であるヤクと共に、独自に馴化したウイルスである可能性が考えられた。BgPV や BPV が牛属の内外で、どのような宿主域を有しているかは、PV の種特異性の観点からも、今後、解析が必要な課題である。

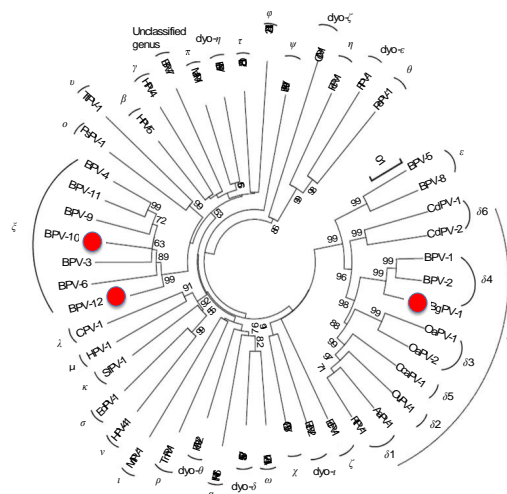


図1：PV 系統樹

(● は、本研究で解析した PV)

一方で、我々の報告とほぼ同じ頃、インドのグループよりヤクから BPV-1 と BPV-2 を検出したという論文が発表された (Transbound Emerg Dis. 2013 Oct;60(5):475-80)。しかし我々が、その論文に記載されているインドのヤク由来の BPV の遺伝子情報を GenBank のデータを元に解析したところ、彼らの示した BPV-1 の塩基配列は、BPV-1 でも BgPV-1 でもない、新たな PV の可能性があることが判明

した。この論文では、BPV の型決定法として、ウイルス型特異的プライマーによる PCR が使われていた。しかし、いまだに未発見の型が多く存在する可能性が高い BPV では、型特異的プライマーによる PCR 法を用いた解析方法では、この論文のように、未知の型を既知の型特異的プライマーで検出して誤った結果を出してしまうリスクがある。このような国際的な BPV 研究の状況を踏まえ、BPV の型解析においては、より厳密なシーケンスとホモロジー解析による型の同定が必要であると主張し、国際ウイルス分類委員会 PV 研究部会委員長である Burk 博士らと共に、Guest Editorial を執筆し、情報発信を行った。

(2) 舌の腫瘍由来の BPV 解析 :

(グザイ)PV に属する BPV-10 (図 1) は、これまで体表部での検出報告しかなかったが、本研究の中で、31 ヶ月齢の牛の舌で見出された上皮性乳頭腫から BPV-10 が検出された。牛の舌に発生した腫瘍より PV ゲノムを検出し、解析を行った。シーケンス解析によりウイルス型を決定したところ、これまで舌からの病変報告のない BPV-10 であったため、全ゲノムをクローニングし、塩基配列を決定した。またこの BPV-10 が検出された病変部は、病理組織的解析により上皮性パピローマと診断された。抗 BPV 抗体による免疫染色で封入体が抗原陽性であることが示され、ウイルス蛋白が発現していることが確認された。この結果は、BPV-10 による新しい病態として、論文発表された。

(3) 欠損ゲノムの発見 :

28 ヶ月齢の牛の舌で見出された上皮性乳頭腫より、我々は既に、(グザイ)PV に属する新しい型として BPV-12 (図 1) を発見していたが、その同じ病変部から、一部遺伝子を欠損した環状ゲノム (BPV-12-del) が存在するのを見だし、解析を行った。シーケンス結果より、完全長の BPV-12 が 7197 kb であるのに対し、BPV-12-del は 3363 kb で、

ゲノムの 47% を欠く欠損ゲノムあった (図 2) 。その結果は、サザンブロット法でも確認された。リアルタイム PCR を用いて、病変部に存在する BPV-12 ゲノムの内の BPV-12-del の割合を求めたところ、病変部には完全長のウイルスゲノムと共に、欠損ゲノムが、[全長 : 欠損 = 58 : 42] の割合で混在していることを発見した。欠損ゲノムの病原性への関与は不明だが、病変部の BPV-12 ゲノムの半分近くが欠損ゲノムであったことは興味深い結果であり、また BPV ではこれまで欠損ゲノムの存在は知られていなかったことから、欠損 BPV ゲノムの初めての報告として論文発表された。

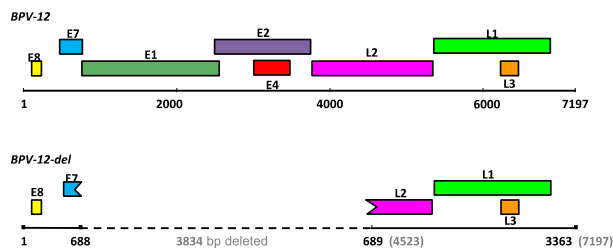


図 2 : 全長 (BPV-12) および欠損型 (BPV-12-del) の BPV-12 ゲノム構造

以上のように、本研究により BPV のゲノムや病態に関する知見を蓄積することができ、その多様性や病原性解明に大きく貢献する成果を上げた。

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 4 件)

Zhu, W, Dong, J B, Uchida, K, Watanabe, K-I, Nakayama, H, Goto, Y, Haga, T: Bovine papillomavirus type 10 with deletion associated with a lingual papilloma in a cow. *Vet. J.* 2014, 199(2):303-305 (査読有) doi:10.1016/j.tvjl.2013.11.016

Haga, T, Dong, J, Zhu, W, Burk, R.: The many unknown aspects of bovine papillomavirus diversity, infection and pathogenesis. *Vet J* 2013, 197(2):122-123. (査読有)
doi:10.1016/j.tvjl.2013.05.006

Dong, J, Zhu, W, **Goto, Y**, **Haga, T**: Initial Detection of a Circular Genome Deletion in a Naturally Bovine Papillomavirus-Infected Sample. *J Vet Med Sci* 2013, 75(2):179-182. (査読有)
doi.org/10.1292/jvms.12-0274

Zhu, W, Dong, J B, Zhang, J, Uchida, K, Watanabe, K-I, **Goto, Y**, **Haga, T**: Bos grunniens papillomavirus type 1 (BgPV-1): a novel Deltapapillomavirus associated with fibropapilloma in yak. *J Gen Virol* 2013, 94(Pt 1):159-165. (査読有)
doi: 10.1099/vir.0.046086-0

[学会発表](計5件)

芳賀 猛、朱 偉、董 建宝、渡邊 謙一、James Chambers、内田 和幸、**上間 亜希子**、**後藤 義孝**: 牛属のパピローマウイルスの多様性と病原性解析、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日、横浜国際会議場(横浜)

董 建宝、朱 偉、**芳賀 猛**、上松 瑞穂、内田 和幸、渡邊 謙一、**後藤 義孝**、乗峰 潤三、谷口 喬子、三澤 尚明: The likelihood of insect transmission of BPV in an outbreak of teat papillomatosis in Holstein dairy cattle. 第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月10日、北海道大学(札幌)

朱 偉、董 建宝、**芳賀 猛**、内田 和幸、渡邊 謙一、乗峰 潤三、三澤 尚明、**後藤 義孝**: Initial Detection for Co-infection with Bovine Papular Stomatitis Virus and Bovine Papillomavirus in Lingual Papilloma-like Lesion of Cattle. 第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月10日、北海道大学(札幌)

朱 偉、董 建宝、内田 和幸、渡邊 謙一、**後藤 義孝**、**芳賀 猛**: Bovine papillomavirus type 10 with a natural deleted genome associated with tongue mucosal papilloma in cattle. 第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20日、岐阜大学(岐阜)

Dong, J B, Zhu, W, Uchida, K, Watanabe, K-I, **Goto, Y**, **Haga T**: A novel Delta-papillomavirus Bos grunniens papillomavirus type 1 (BgPV-1) caused fibropapilloma in yak. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日、大阪国際会議場(大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳賀 猛 (HAGA, Takeshi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 20315360

(2) 研究分担者

後藤 義孝 (GOTO, Yoshitaka)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号: 30142136

上間 亜希子 (UEMA, Akiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号: 20630156
(平成 24, 25 年度は連携研究者)