

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591592

研究課題名(和文) ムンプスウイルスにおける病原性発現の分子基盤

研究課題名(英文) Research on the molecular basis for virulence expression in mumps virus

研究代表者

木所 稔(KIDOKORO, MINORU)

国立感染症研究所・ウイルス第三部第三室・室長

研究者番号：00370958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤処理による病原復帰株の解析から、病原復帰の主因はV/P内の変異であった。また、高病原性株Y213に新たに見出されたL遺伝子内の変異はウイルスの中枢神経病原性を昂進した。さらに、ワクチンによる水平感染例由来株(HTDV)株では全てL遺伝子に変異を持っており、元のワクチン株より中枢神経病原性が昂進していた。一方、高病原性野外株のL遺伝子に中枢神経で高発現するmiRNAの相補的配列を導入したところ、病原性が著しく減弱した。以上の結果から、MuVの病原性発現にはV/P及びL遺伝子が深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Through genetic analyses of the revertant mumps virus (MuV), we revealed that the main cause of the reversion is the mutation in the V/P gene. Meanwhile, introducing the mutation of the L gene of the highly virulent strain has enhanced the neurovirulence of an attenuated MuV. In addition, the MuV isolates from vaccinal horizontal transmission cases harbor the characteristic mutations in their L genes. And their neurovirulence were enhanced comparing with the original vaccine viruses. In order to assess the involvement of L gene in MuV neurovirulence, we constructed recombinant MuV (rOdate/miR) which has the L gene harboring the complement sequences of the miRNA expressed specifically in central nerve system. As the result, rOdate/miR exhibited little neurovirulence. These results strongly suggested that the main causative genes for MuV neurovirulence are V/P and L genes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ムンプスウイルス 中枢神経病原性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) おたふくかぜ (ムンプス) ウイルスを含むヒトのウイルスについては、その病原性発現機構について不明な点が多い。また日本国内のムンプス流行は、ワクチンによる無菌性髄膜炎が問題となって以来、ワクチン接種率の低迷が続き、全く制御できていない。一方、海外では、ワクチンの2回接種が広く普及しているにもかかわらず、ムンプスのアウトブレイクが頻発しており、ワクチンの有効性に疑義が生じている。従って、安全で且つ有効な新規ワクチンの開発およびワクチンの品質管理は焦眉の課題である。そのためにはウイルスの病原性発現の分子基盤を明らかにすることが必須であり、こうした研究の社会的な意義は大きいと考えられた。

(2) 申請者は、研究を遂行する上で必須となるムンプスウイルスの組み換え技術であるリバーズジェネティクス (RG) 法をすでに確立していたが、この方法で作出された強毒株 Y213 由来の組換えウイルス rY213 は、原株 Y213 の性状を反映せず、病原性を完全に失っていた。ところが、rY213 を変異原 (リバビリン) 存在下で培養すると、病原性が原株と同程度にまで復帰することを見いだした。この病原復帰ウイルス rY213Rev のゲノム配列を解析した結果、V/P と L 遺伝子内に2箇所の変異が同定された。そこで、これらの変異を rY213 の cDNA に導入したところ、得られた組換えウイルス rY213W は病原復帰ウイルス rY213Rib と同程度の病原性を示した。つまり、わずか2箇所の変異が病原性復帰に関わることが明らかとなった。従って、rY213W はムンプスウイルスの病原性発現の分子機構を解くための有効なツールとなりうると考えられた。

(3) また申請者は、ウイルスの病原性を評価するための動物 (ラット) を用いた感染モデル系についても実績を積んでおり、研究を遂行するための技術的な基盤がそろっていた。

## 2. 研究の目的

RG 法を用いてムンプスウイルスの弱毒化の機構解明を進める過程で、申請者はウイルスゲノム内のわずか2箇所の変異によって、ムンプスウイルスの病原性が劇的に昂進することを見出した。

本研究ではこの病原性復帰変異ムンプスウイルスを材料にして、病原性復帰がどのような分子的機構によって起こるのかを明らかにすることによって、ムンプスウイルスの病原性発現の分子基盤を解明すると共に、得られた情報を新規ムンプスワクチンの開発や品質管理に応用することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) V/P 遺伝子、及び L 遺伝子内の2箇所の変異のどちらが病原性発現において主要な役割を担っているかを特定する。

(2) 病原復帰に関わる変異がどのような分子的機構によって病原性を発現するかを、変異に

よるウイルス蛋白質の機能変化と病原性の変化との関連性を調べることで明らかにする。

(3) 現行のムンプスワクチンウイルス中に同様の変異を持つヴァリエントウイルスが含まれていないかを解析し、含まれている場合にはその病原性を評価する。こうした解析を通じて新たなワクチンの開発や品質管理方法の基盤となる情報を得る。

(4) 他の高病性分離株 (大館株) や MMR ワクチンの副反応の原因となったワクチン株 (占部株) についても同様の病原性発現機構が働いているかどうか、キメラウイルスを作製して調べる。これによって、ムンプスウイルスの病原性発現にどのような普遍性と特異性があるかを明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 弱毒組換えウイルス rY213 ori に病原性復帰に関わると考えられた2ヶ所の変異を単

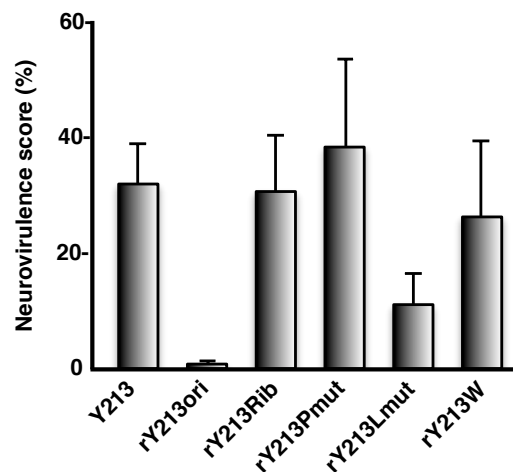


図 1

独、もしくは両方を導入した組換えウイルスを作製し、各々の病原性をラットモデルで評価した (図 1)。その結果、V/P 遺伝子内の変異を導入したウイルスで中枢神経病原性が上昇したことから、この変異が病原性の昂進に関わることが判明した。

そこで、その分子機構を解明するため、この変異を導入した V 蛋白質と P 蛋白質の機能を元の蛋白質と比較した。まず、V 蛋白質によるインターフェロン誘導の阻害活性への影響を細胞レベルで測定した。その結果 V 蛋白質の変異はインターフェロン誘導の阻害活性に全く影響せず、野生型と変異型のいずれの V 蛋白質も細胞内標的分子である STAT1 の分解を誘導してインターフェロン産生を阻害した。

また、ウイルス RNA の転写複製に関わる P タンパク質の機能へのこの変異の影響を調べるため、変異を持つ組換え体 rY213Pm と変異を持たない元株 rY213 の転写と複製の効率を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、ゲノム RNA 量、アンチゲノム RNA 量、各遺伝子ごとの mRNA 量、いずれにも差は認められなかった。

併せて、感染細胞内のウイルス蛋白質の局在、

および宿主蛋白質との相互作用の違いについても解析した。しかし、NP, V, P, M, F, HN, L いずれのウイルス蛋白質の細胞内局在にも変化を認めなかった。また、P 蛋白質に結合する細胞内宿主蛋白質を解析したが、変異型

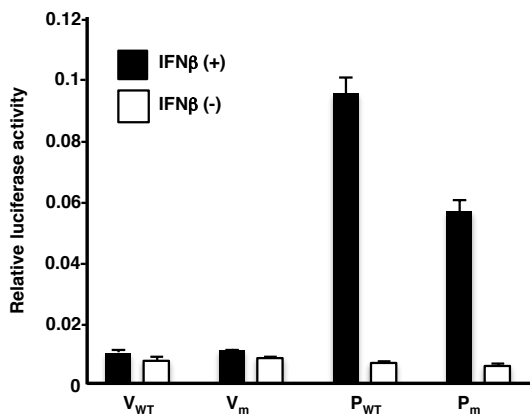


図 2

と野生型とで違いは認められなかった。従って、病原性復帰の原因は不明のままである。

(2) rY213 ori の元株である強毒株 Y213 を次世代シーケンサで解析したところ、rY213 ori には反映されていない未知の変異が新たに 2ヶ所、L 遺伝子内に見出された。そこで、これらの内の 1 つの変異を rY213 ori に導入した組換えウイルス rY213m2 を作出し、ラットモデルで評価したところ、rY213 ori に比べて中枢神経病原性が有意に上昇した。この結果から、Y213 株の病原性発現の原因は L 遺伝子にあることが示唆された。

(3) ワクチンウイルスによる水平感染によってワクチン接種歴の無い幼児から分離されたワクチン由来株(水平感染ウイルス)3 株を解析したところ、その全てで L 遺伝子内に 1 箇所以上の変異(アミノ酸置換)が検出された(図 3)。これらの変異部位は L 蛋白質の機能ドメインにほぼ一致していること(図 3)、また、ワクチン接種後副反応を呈した児から分離されたワクチンウイルスでは、こうした変異は検出されなかったことなどから、これらの変異は水平感染に関与している可能性が示唆された。そこで、水平感染ウイルスの

水平感染由来株で検出された L 蛋白質上の変異部位

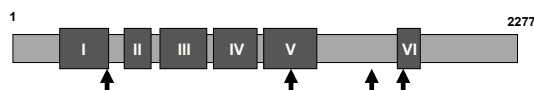


図 3

ラットにおける病原性を元のワクチンウイルスと比較した。その結果水平感染ウイルスは元のワクチンウイルスに比べ、ラットにおける中枢神経病原性が昂進する傾向が認められたことから、検出された L 遺伝子の変異が病原性の変化にも関与している可能性が

示唆された。

また、水平感染ウイルス出現の原因を知り、ワクチンの品質管理に役立てるため、元のワクチンについて、次世代シーケンサによる解析を行い、水平感染ウイルスと同じ変異が元のワクチンに含まれているかどうかを調べ

ラット脳内におけるウイルスゲノムRNA量

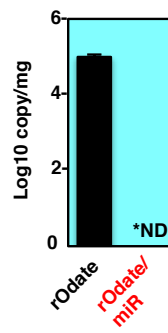


図 4

たところ、変異は検出されなかった。従って、水平感染ウイルスの変異は、ワクチン接種後にヒトの体内で獲得されたものである可能性が示唆される。

(4) 野外強毒株大館株はヒトでの中枢神経病原性が高いことで知られている。そこで、病原性への L 遺伝子の関与を調べるため、大館株の L

遺伝子末端に、中枢神経系で特異的に高発現しているマイクロ RNA(miRNA) に相補的な配列を導入したウイルスを作製した(rOdate/miRNA)。これによって、中枢神経系における L 蛋白質の発現を miRNA の働きによって mRNA 合成の段階で抑制するモデルを考案した。このウイルスを元株の rOdate と共にラットのモデル系で評価したところ、rOdate はラット脳内で良く増殖して高い病原性を示したのに対し、rOdate/miRNA は脳内でほとんど増殖せず、大館株の持つ中枢神経病原性を失っていた。従って、中枢神経病原性への L 遺伝子の関与を示唆する結果を得た。また、rOdate/miRNA は通常の培養細胞では rOdate と遜色ない増殖能を維持していることから、中枢神経でのみ選択的に増殖できないことが示された。従って、免疫原性を維持したまま、病原性を無くした理想的なムンプスワクチンになり得る可能性がある。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 木所稔、落合仁、渡辺正博、青木なつ子、竹田誠、庵原俊昭、ムンプスワクチンによる水平感染疑い例由来ウイルスの解析、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日
2. 木所稔、落合仁、渡辺正博、竹田誠、庵原俊昭、ムンプスワクチン株による水平感染疑い例の解析、第55回日本臨床ウイルス学会、札幌、2014年6月14-15日
3. 加藤大志、齋加志津子、久保田耐、網康至、須崎百合子、加藤篤、竹田誠、木所稔、ムンプスウイルスPタンパク質に導入されたアミノ酸変異による病原性復帰機構の解

析、第61回日本ウイルス学会、神戸、2013年11月10-12日

4. 木所 稔、齋加志津子、網 康至、須崎百合子、加藤 篤、竹田 誠：リバーシジェネティクスによって作製したムンプスウイルスの病原性復帰と遺伝的多様性との関連性に関する研究、第60回日本ウイルス学会総会、大阪、2012年11月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ムンプスウイルスの弱毒化方法、ムンプスウイルス、及び、生ワクチン

発明者：木所 稔、加藤大志

権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特許

番号：特願 2014-244999 号

出願年月日：2014年12月3日

国内外の別：国内

○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

木所 稔 (KIDOKORO, Minoru)

国立感染症研究所ウイルス第三部第三室・室長

研究者番号：00370958

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

加藤大志 (KATO, Hiroshi)

国立感染症研究所ウイルス第三部第三室・研究員

研究者番号：80711712