

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658261

研究課題名(和文)フラビウウイルスの感染臓器特異性に関する研究

研究課題名(英文)The research on flavivirus organ-tropism

研究代表者

前田 秋彦(MAEDA, Akihiko)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：70333359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：神経向性フラビウウイルスをモデルとして、病原微生物の感染臓器特異性を解明することを目的として、以下の実験を行った。ウイルスの感染を可視化するため、感染細胞で赤色蛍光蛋白質を発現するフラビウウイルスのレポーターウイルス様粒子(RVPs)を作製した。次に、マウスから摘出した脳のスライス標本培養系を作製した。さらに、培養脳スライス標本を用いてRVPsの感染系を構築した。本法を用いることで、フラビウウイルスの臓器特異性についての研究を、さらに推進できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： In order to solidify organ-tropisms of pathogenic microbes, we conducted the experiments as described below, using a neurotropic flavivirus as a model of infectious agent. First, flavivirus reporter virus particles (RVPs) encoding the red-fluorescent protein gene within its genome RNA, were prepared to be visible virus infections. Next, mouse brain slice-culture system was established to analyze organ-tropism of the virus easily. Finally, flavivirus RVPs-infection system on mouse brain slice-cultures was established. We might apply the system to do research on organ-tropism of pathogenic microbes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，応用獣医学

キーワード：感染症 フラビウウイルス スライス培養 臓器特異性

1. 研究開始当初の背景

病原微生物の宿主動物への感染メカニズムに関する情報は少ない。病原微生物が宿主動物に感染すると、宿主の体内で増殖し、その病原微生物に特徴的な病態変化を引き起こす。この感染に伴う病態の形成には、病原微生物の持つ感染臓器特異性(病原微生物によって、易感染性の細胞と難感染性の細胞が存在する)に依存しているものと考えられている。これまで、感染の「臓器特異性」の研究は主に二つの方法で行われて来た。すなわち、(1)病原微生物に感受性のある宿主動物に、様々な経路で当該微生物を感染する方法である。感染後、経時的に感染動物を安楽死し、その各種臓器を採材する。当該臓器における微生物の遺伝子や蛋白質を検出することにより、当該微生物の増殖を確認するとともに、病態変化を観察する。しかし、この方法では生の病原微生物を使用するので、宿主の免疫系により感染が制限される。したがって、感染部位(臓器)によっては実質的な感染能を評価することが困難となる。もう一つの方法は、(2)各種臓器から分離培養した初代培養細胞や、各種臓器から分離した株化細胞等を用いて感染実験を行い、病原微生物の感染性を評価する方法である。本法では、分離した個々の細胞についての、病原微生物の感受性についての情報は得られる。しかし、個体レベルでの病原微生物の臓器特異性については評価すること難しい。そこで、病原微生物の感染臓器特異性についての実質的な評価方法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、フラビウイルスを病原微生物のモデルとし、その感染臓器特異性を解明するための方法論の確立を目的とした。ある病原微生物についての感染臓器特異性に関する情報を得ることは、当該微生物感染症の治療における標的臓器への集中治療法の開発に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために以下の3項目について検討した。すなわち、(1)効率的なフラビウイルスのレポーターウイルス粒子(Reporter Virus particles; RVPs)の作製方法の開発、および(2)マウスの摘出脳へのフラビウイルス RVPs の感染、(3)マウスの摘出脳のスライス組織培養系の確立とフラビウイルス RVPs の感染、について検討した。

(1) 効率的なフラビウイルスの RVPs の作製方法の開発

フラビウイルスの一種であるウエストナイルウイルス(WNV)のゲノム RNA から、構造蛋白質のコード領域(コア(C)蛋白質のC末端とプレメンブラン(prM)蛋白質、エンペロープ(E)蛋白質)を除去し、除去部位にレポーター遺伝子として、赤色蛍光蛋白質

遺伝子である DsRed2 遺伝子を組み込んだ細胞内自己増殖型のレプリコン RNA (repWNV/DsRed2、構造蛋白質を持たないため、粒子は形成されない)が持続的に複製する BHK 細胞(RprBHK 2G2 細胞)を確立した。この RprBHK 2G2 細胞に、発現ベクター、pCAGGS-WNV prM/E および pCAGGS-WNV C を細胞に導入して、WNV の構造蛋白質(prM, E, および C 蛋白質)を発現させた。各種ウイルス蛋白質の発現を免疫染色法やウエスタンブロッティング法により確認した。また、細胞内での RVPs の産生を電子顕微鏡により観察した。次に、20~60%の密度勾配遠心により分画精製した WNV RVPs の構造蛋白質の構成と、同一分画における WNV のレプリコン RNA の存在、感染性物質の存在を調べることにより WNV RVPs の細胞外への放出を確認した。

(2) マウスの摘出脳へのフラビウイルス RVPs の感染

C57BL/6 マウスを麻酔し、安楽殺した後、その脳を摘出した。摘出した脳は、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むダルベッコ修飾培養液(DMEM)中で培養した。培養は 37℃, 5% CO₂のインキュベーター内で行った。摘出直後のマウス脳に、WNV VLPs を感染し、経時的に DsRed2 の発現を蛍光顕微鏡下に観察した。

(3) マウスの摘出脳スライス組織培養系の確立とフラビウイルス RVPs の感染

C57BL/6 マウスを麻酔し、安楽殺した後、その脳を摘出した。マウス脳スライスブロックを用いて、摘出した脳を 1mm あるいは 2mm 厚にスライスした。また、スライサー(WPI)を用いて 200~400 μm 厚にスライスした。スライスした脳組織は、10% FCS を含む DMEM 中で培養した。培養は 37℃, 5% CO₂のインキュベーター内で行った。作製直後のマウス脳スライス培養に、WNV VLPs を感染し、経時的に DsRed2 の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) 効率的なフラビウイルスの RVPs の作製方法の開発

図 1 に、フラビウイルスの RVPs の従来法(図 1A)と、本研究により開発した新法(図 1B)を模式的に記す。従来法(図 1A)では、*In vitro* で転写した WNV レプリコン RNA, repWNV/DsRed2, を WNV の構造蛋白質発現ベクターである pCAGGS-WNV prM/E と pCAGGS-WNV C と共に BHK-21 細胞に導入することで、その培養上清中から回収される。しかし、この方法には、取扱いに注意が必要な長鎖 RNA の作製と細胞への導入ステップが含まれており、作業者は熟練を要する。一方、新法(図 1B)では、RNA の取扱いステップを排除しており、より簡便に WNV の RVPs を作製できる。新法の開発過程では、最初に *In vitro* で転写した repWNV/DsRed2 を BHK-21 細胞

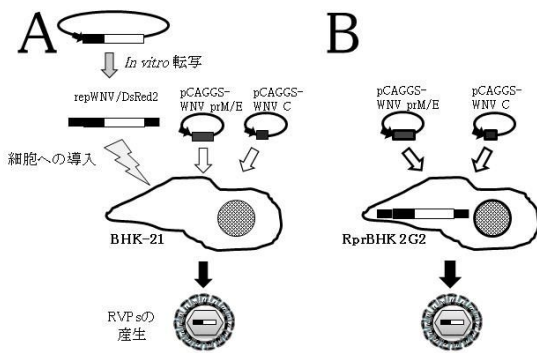


図1. WNV RVPs 作製の従来法と新法の比較

従来法 (A) では, *In vitro* で, 転写で作製したレプリコン RNA (repWNV/DsRed2) を, pCAGGS-WNV prM/E と pCAGGS-WNV C とともに BHK-21 細胞に導入する。本研究で確立した方法 (新法) (B) では, repWNV/DsRed2 が持続的に複製している細胞 (RprBHK2G2) を構築する。次に, pCAGGS-WNV prM/E と pCAGGS-WNV C を導入する。

胞に導入し, repWNV/DsRed2 が持続的に複製している細胞 (RprBHK2G2 細胞) を分離し, 株化した (図 2)。コントロールの BHK-21 細胞では, DsRed2 の発現は認められないが (図 2A), RprBHK2G2 細胞では, 細胞質に DsRed2 の発現が認められた (図 2B)。次に, RprBHK2G2 細胞に pCAGGS-WNV prM/E と pCAGGS-WNV C を導入し, WNV の prM と E, C 蛋白質を発現させた。RprBHK2G2 細胞における prM, E, および C 蛋白質の発現を各蛋白質に対する特異抗体を用いた免疫染色法とウエスタンブロット法により確認した。また, 培養上清中に放出された RVPs の同定について, 以下の通り行った。培養上清中の WNV RVPs を 20~60% ショ糖密度勾配中で 26,000rpm, 3 時間遠心して RVPs を分画した (RVPs 画分)。精製した RVPs の存在する画分について, WNV の構造蛋白質である E 蛋白質の存在をウエスタンブロット法により解析したところ, ウイルスの E 蛋白質が存在することが確認された。WNV RVPs は, その粒子内に repWNV/DsRed2 を有すると考えられるため, WNV RVPs の感染により感染細胞は DsRed2 を発現する。そこで, 超遠心による RVPs 画分を, WNV 感受性細胞である VeroE6 細胞に処理したところ, 細胞の

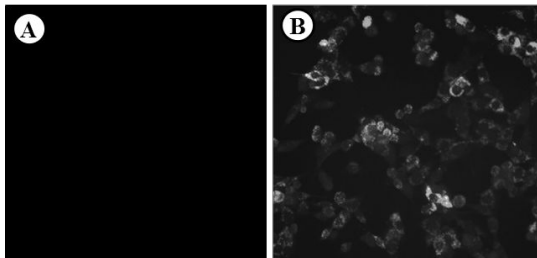


図2. RprBHK2G2 細胞における DsRed2 の発現

BHK-21 細胞 (A) と RprBHK2G2 細胞 (B) を蛍光顕微鏡下で観察した。

表1. 従来法と新法のWNV RVPs 産生数の比較

作製方法	WNV RVPs数 / mL
従来法	~ 5 x 10 ⁶
新法	~ 2 x 10 ⁶

細胞質に DsRed2 の発現が確認された。また, RVPs 画分のネガティブ染色を行ったところ, 直径 50~100nm の粒子様構造物が確認された。以上の結果は, 超遠心の RVPs 画分には, ウイルスの構造蛋白質から構成され, 粒子内に repWNV/DsRed2 を持つ粒子様構造物である RVPs が含まれることを示している。WNV RVPs の産生数は, 従来法と新法で差は認められなかった (表 1) ため, 今回, 開発した RVPs の作製法は, 従来法の代替として使用できるものと考えられる。

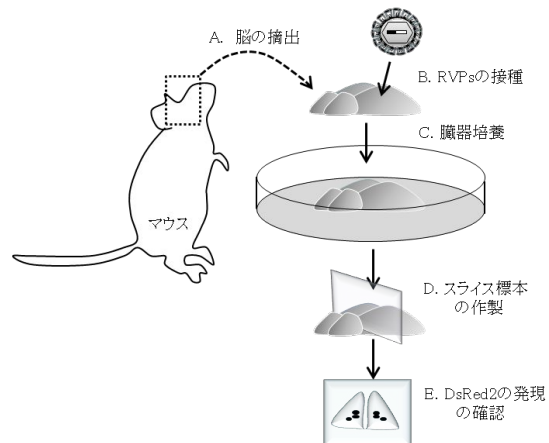
(2) マウスの摘出脳へのフラビウイルス RVPs の感染

C57BL/6 マウスから摘出した脳 (図 3A) に, WNV RVPs を, シリンジを用いて摂取した (図 3B)。この脳を, 10% FCS を含む DMEM 培地中で, 37 °C, 5% CO₂ の条件で臓器培養した (図 3C)。WNV RVPs 感染後 4 日目に, 脳スライスを作製し (図 3D), DsRed2 の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。しかし, WNV RVPs は摂取部位に局限していた。

(3) マウスの摘出脳のスライス組織培養法の確立とフラビウイルス RVPs の感染

前項のマウス摘出脳への WNV RVPs の直接摂取実験では, WNV RVPs の感染が摂取部位に局限してしまったため, WNV 脳の臓器特異性

図3 マウス脳の臓器培養と WNV RVPs



マウスから脳を摘出し (A), 10% FCS を含む DMEM 培地中で培養した (C)。WNV RVPs 感染後 (B), 3 日目以降に脳のスライス組織を作製し (D) 投与部位に DsRed2 遺伝子が発現していた (E) が, 局限していた。

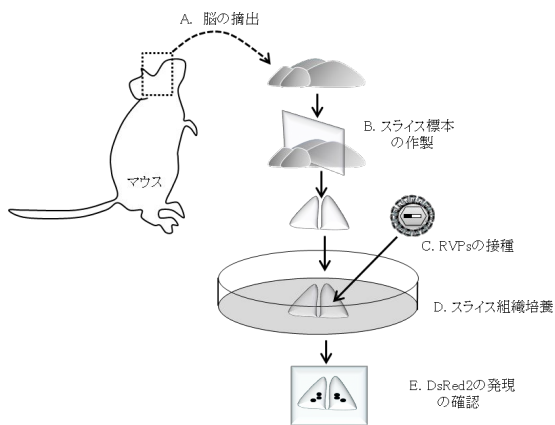


図4. マウス脳のスライス組織培養と WNV RVPs

脳を摘出し(A)、脳のスライスを作製した(B)。WNV RVPsを感染後(C)、10% FCSを含むDMEM培地中で培養した(D)。経時的に、DsRed2遺伝子の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。(E)

を評価することは困難であると考えられた。そこで、脳スライス組織培養法を確立し、WNV RVPsの感染実験を行った(図4)。C57BL/6マウスから脳を摘出し(図4A)、スライスブロックを用いて1mmあるいは2mm厚の脳スライスを作製した(図4B)。スライスした脳組織に、WNV RVPsを感染し(図4C)、10%FCSを含むDMEM培地中で、37℃、5%CO₂の条件で臓器培養した(図4D)。感染後、経時的にDsRed2の発現を蛍光顕微鏡下で観察した(図4E)。感染後3日目より、脳細胞の一部にDsRed2の発現が観察された。今後、WNV RVPsの感染脳スライスを組織染色し、WNV RVPsの脳における感染細胞について解析する予定である。

本研究では、実験系の構築に大部分の時間を費やしてしまい、当初予定していたフラビウイルス感受性マウスと非感受性マウスとの比較解析、これら両者を比較解析することによる感染性因子の同定は行えなかった。今回確立したスライス組織培養法を使用したWNV RVPsの感染実験を行うことにより、WNVの感染臓器特異性の研究が可能となったため、消化できなかった事項については今後の検討事項とする。

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5件)

伊藤亜希, 岡本奈津実, 米島万有子, 染谷梓, 前田秋彦, 京都市市街地における蚊の調査, 京都産業大学総合学術研究所報, 査読無, 9巻, 2014, *In press*
Makino, Y., Suzuki, T., Hasebe, R., Kimura, T., and Maeda, A., Takahashi, H., Sawa, H. Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in

particle transport, *J. Virol. Methods*, 査読有, 195, 2013, 250-257, doi: 10.1016/j.jviromet.2013.10.002.

Maeda, A., and Maeda, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection, *Vet. J.*, 査読有, 195, 2013, 33-40, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.08.019.

染谷梓, 池永充宏, 大西修, Igor Velado Fernandez, 西野佳以, 前田秋彦, 京都市山科区で駆除されたイノシシに寄生していたマダニ類の解析, 京都産業大学総合学術研究所報, 査読無, 8巻, 2013, 57-62,

Tag-El-din-Hassan, Hassan T., Sasaki, N., Moritoh, K., Torigoe, D., Maeda, A., and Takashi, A. The chicken 2-5 oligoadenylate synthetase A inhibits the replication of West Nile Virus. *Jap. J. Vet. Res.*, 査読有, 60, 2012, 95-103, PMID: 23094584

〔学会発表〕(計4件)

Yonejima, M., Nakaya, T., Nihei, N., Tsuda, Y., Kobayashi, M., Watanabe, M. and Maeda, A. Effects of land use pattern on spatial distribution of host-seeking mosquitoes within urban areas in Kyoto, Japan, International Geographic Union, Kyoto Regional Conference, 2013.8.4-9, Kyoto

伊藤亜希, 米島万有子, Igor Velado Fernandez, 福田美樹, 染谷梓, 前田秋彦, 京都市における蚊媒介性フラビウイルス媒介蚊の調査, 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2013.5.24-25, 熱海市

米島万有子, 前田秋彦, 福田美樹, 伊藤亜希, Igor Velado Fernandez, 津田良夫, 渡辺護, 中谷友樹, 京都市におけるアカイエカとチカイエカの捕集数および構成比の空間差異, 第65回日本衛生動物学会, 2013.4.5-7, 江別市

染谷梓, 池永充宏, 大西修, 近野真由美, 杉江真理子, Igor Velado Fernandez, 西野佳以, 前田秋彦, 京都市における紅斑熱群リケッチアの検出, 第154回日本獣医学会総会, 2012.9.14-16, 盛岡市

〔図書〕(計1件)

前田秋彦, 近代出版, 第4章 動物感染症診断のための微生物検査, 1.産業動物, 4)神経系感染症, (編)副所秋雄, 前田秋彦ら, 『動物微生物検査学』, 2014, 155-157

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 秋彦 (MAEDA, Akihiko)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：70333359

(2) 研究分担者

佐々木 宣哉 (SASAKI, Nobuya)
北里大学・獣医学部・教授
研究者番号：20302614