

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659212

研究課題名(和文) エイズ患者から同定した新しいヒトレトロウイルスの感染病理学的解析

研究課題名(英文) Identification of retrovirus-like DNA fragments in an AIDS patient

研究代表者

片野 晴隆 (Katano, Harutaka)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：70321867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エイズ患者の剖検で採取した脾臓の凍結組織を次世代シーケンサーにより、サルの内因性レトロウイルスと相当性のある遺伝子を同定した。全長約8 kbのウイルスゲノムの全長の塩基配列を決定し、系統樹解析では、ベータレトロウイルス属に分類された。本ウイルス遺伝子を検出する定量的PCR法を作成し、さまざまなヒト検体を検査したが、陽性例はなく、本レトロウイルス遺伝子を検出されることはヒト検体においては極めてまれであることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Genome fragments of unidentified retrovirus were discovered from the spleen tissue of an AIDS autopsy using a next generation sequencer. The whole genome of the retrovirus was 8kb of length containing gag, pol, env and protease genes, and belonged to beta-retrovirus family. A real-time PCR assay revealed that any genome of the virus was not detected in other human pathological samples, suggesting that the virus is rare and uncommon among human.

研究分野：感染病理学

キーワード：ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

近年の核酸配列同定法(DNA シークエンス法)の進展には目覚ましいものがあり、検体中の全塩基配列を決定するハイスループットの次世代シーケンサーは感染症研究でもきわめて有力なツールとなっている。多くの不明感染症例において、次世代シーケンサーにより、原因病原体の遺伝子核酸が同定されている。われわれは、エイズ患者の剖検で採取した脾臓の凍結組織を次世代シーケンサーにより解析したところ、サルゲノムの一部に相当性のある遺伝子を同定した。得られた配列情報をもとにプライマーを作成し、最終的に Long PCR で約 6 キロの DNA 断片の増幅に成功した。増幅された DNA はその中に、gag, pol, protease, env のレトロウイルス様の構造を保持しており、マカク属のサルゲノムの一部とヒビの内因性レトロウイルスの断片が含まれていることから、新しいヒトレトロウイルス(new human retrovirus, NHRV)の遺伝子と考えられた。本遺伝子配列は元のエイズ患者から検出されることが PCR で確認された。さらに、別の患者に発症したエイズ関連リンパ腫にも、このウイルス断片が検出された。なお、近年話題になっている XMRV (Science 326:585-9, 2009)とは全く異なる配列を持っており、マウスなど他の種からのコンタミネーションの可能性はない。

## 2. 研究の目的

ウイルス両端の long terminal repeat (LTR)の配列が決定されていないことから、まずはウイルスの全ゲノム構造を決定する。高感度な定量的 PCR や特異抗体の開発など、検出系を立ち上げ、悪性リンパ腫などの検体におけるウイルスタンパクの発現を調査するとともに、血清抗体検出系を作成し、健常者における感染率など、血清疫学を明らかにする。一般健常者における感染やエイズなどのある特定の疾患でのこのウイルスの広がりを調査する必要がある。遺伝子にサルとヒビのレトロウイルス成分が含まれる点はウイルス進化論的にも興味深く、ヒトへの感染経路の解明から、レトロウイルス学の新たな展開につながる可能性が期待される。エイズ患者から検出されていることから、免疫不全との関連が考えられ、さらに脾臓から検出されていることから、リンパ球系の組織に感染、増

殖するウイルスであることが推定される。Nこのウイルスの感染機構、病原性発症機構を解明することは新たなウイルス発癌機構の解明や、特殊な細胞への感染機構の解明につながる可能性があり、学術的に大変意義深い。このウイルスはサル、およびヒビの内因性レトロウイルスに組換えが起こり、何らかの契機でヒトに感染したものと考えられる。サルゲノムのレトロトランスポゾン(RNA を介した可動遺伝因子)から生じた内因性レトロウイルスが、異種であるヒトに感染した例はこれまでに報告はない。このウイルスが HIV と同様に、サルから人へ直接感染したか、媒介するものがあるかは不明であるが、その進化的な解析結果は、興味を持たれる。また、将来的にはクローニングしたウイルス遺伝子から実験的に in vitro のウイルス作製に成功すれば、レトロウイルスの生物学に大きな貢献ができるだけでなく、ウイルス発癌について普遍的な知見が得られる可能性もある。さらに、本研究で開発する抗体や血清抗体検出系はウイルス診断に寄与するとともに、本ウイルスと新たな疾患との関連を明らかにすることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) エイズ剖検例からの核酸抽出

ヒト検体を用いた研究は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行われた(承認番号 425)。剖検時に採取し凍結保存した検体から、Isogen(ニッポンジーン)により RNA を、DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen)により DNA を抽出した。また、リンパ腫などのヒト生検サンプルのホルマリン固定パラフィン包埋切片からは PureLink FFPE RNA Isolation Kit (Life Technologies)を用いて RNA を、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いて DNA を抽出した。

### (2) 次世代シーケンサーによるウイルス遺伝子の検索

凍結組織から抽出した核酸サンプルから illumina 社 Miseq を用い、メタゲノム解析(DNA-seq および RNA-seq)を行った。解読した全配列を blast search し、微生物遺伝子と相同性のある遺伝子配列を MEGAN にて分類し該当生物種の存在比を推定した。

### (3) ウイルスゲノム特異的定量的 PCR

NHRV がコードする gag, protease, pol, env の配列を標的にプローブとプライマーの設計を Primer express (Applied Biosystem)で行った。設計に際してはパラフィン切片でも検出可能であるよう、amplicon を 200bp 以下になるよう設計した。PCR は QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い、One-step 法で行った。標準曲線は標的遺伝子を含むプラスミドを段階希釈したものを使用し、描出した。

### (3) ELISA

血清は国立感染症研究所血清銀行に保存してある血清サンプル 1,000 人分を用いた。gag, protease, pol, env 抗原のリコンビナントタンパク(GST 融合タンパク)を作成した。これらを抗原として 96 ウェルプレートにコーティングした。2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を反応させ、発色は p-Nitrophenyl phosphate Substrate tablet を用いた。405nm の吸光度を ELISA plate reader を用いて計測した。

## 4 . 研究成果

### (1) ウイルスの全ゲノム構造決定

高コピー数を含む検体を次世代シーケンサーによる検索を行い、これまで分かっている gag, env の遺伝子配列から、LTR を含む全長の遺伝子配列を決定した。解析の結果、本ウイルス遺伝子の全長は約 8kb であり、その中に gag, pol, protease, env と相同性のある配列を保持しており、既知のサルの内因性レトロウイルスと相同性が認められた。さらには本遺伝子配列は元のエイズ患者から検出されることが PCR で確認された。

### (2) 定量的 PCR や特異抗体などの検出系の開発と臨床検体での調査

gag, pol, protease, env の各領域を検出するための real-time PCR を作成し、エイズ関連悪性リンパ腫、バーキットリンパ腫、メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患など、免疫不全に伴い発症した悪性リンパ腫の検体を中心に、ヒトリンパ増殖性疾患の病理検体につき、本ウイルスの遺伝子が増幅されるかどうか、検討した。同時にヒト他疾患の臓器など

も検索した。約 50 検体のパラフィン切片から DNA を抽出し、本ウイルスの遺伝子を特異的に検出する real-time PCR を施行したが、いずれの遺伝子でも全例が陰性であった。このことから、本ウイルス遺伝子が検出されることはヒト検体においては極めてまれであることが分かった。

### (3) 血清疫学

健常者の血清中に本ウイルスに対する抗体が検出されるかどうかを検討した。まず、GST 融合タンパクシステムにより、本ウイルスの gag, pol, protease, env タンパクを組換タンパクとして合成した。これを抗原に ELISA の系を確立し、小児血清を用いて、陰性者の抗体価の平均と標準偏差を算出し、カットオフ値を設定した。次に、血清銀行に保存されている日本人血清約 1,000 人分における抗体価の調査を行なった。その結果、抗体陽性者はごく少数であり、日本人における本ウイルスの感染は極めてまれであることが示唆された。疾患との関連や感染性などは今後の研究課題である。

## 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 5 件)

Tsuzuki S, Fukumoto H, Mine S, Sato N, Mochizuki M, Hasegawa H, Sekizuka T, Kuroda M, Matsushita T, Katano H: *Detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in a fatal case of myocarditis in a seven-month-old girl.* **Int J Clin Exp Pathol** 2014. 7:5308-5312.

Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Hagiwara S, Yajima K, Koizumi Y, Shirasaka T, Kojima Y, Nagai H, Yokomaku Y, Shiozawa Y, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Katano H: *Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition.* **Cancer Med** 2014. 3:143-153.

Katano H, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Oyaizu N, Ota Y, Mine S, Igari T, Ajisawa A, Teruya K, Tanuma J, Kikuchi Y, Uehira T, Shirasaka T, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Yasuoka A: *The prevalence of opportunistic infections and malignancies in autopsied patients with human immunodeficiency virus infection in Japan.* **BMC Infect Dis** 2014. 14:229.

Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Katano H: *Frequent detection of Merkel cell polyomavirus DNA in sera of HIV-1-positive patients.* **Virology** 2013. 50:84.

Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, Kuroda M: *Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease.* **Int J Clin Exp Pathol** 2012. 5:814-823.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

片野晴隆 (KATANO, Harutaka)  
国立感染症研究所・感染病理部・室長  
研究者番号：70321867

### (2)連携研究者

黒田誠 (KURODA, Makoto)  
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究  
センター・センター長  
研究者番号：80317411

長谷川秀樹 (HASEGAWA, Hideki)  
国立感染症研究所・感染病理部・部長  
研究者番号：30301790