

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2012～2013  
課題番号：24700428  
研究課題名(和文)旧世界サル類における新規ヘパチウイルスの同定

研究課題名(英文)Macaque Hepatitis Virus

## 研究代表者

東濃 篤徳 (Higashino, Atsunori)

京都大学・霊長類研究所・研究員

研究者番号：30470199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含め類人猿，マカク類および新世界ザルなど，様々な霊長類ゲノムが解読されてきた．一方でヒトのC型肝炎の原因ウイルスであるHepatitis C virusは20年以上前に単離されたが，その起源と伝播経路を決定づけられるようなウイルスオルソログは未だ見つかっていない．そこで旧世界サルからヘパチウイルスが分離されれば，これまで報告されてきた肝炎ウイルスと比較することでHCVの起源を解明することができる考えた．我々はGPT高値なニホンザル血漿からウイルスRNAを抽出し，次世代シーケンサー解析を行った．検出された配列は，SV40，ERV-L，Adenovirus，およびHERVであった．

研究成果の概要(英文)：Various genome sequences of organisms have been determined using next-generation sequencing platforms. The ortholog of Hepatitis C virus (HCV) is not determined yet although HCV was isolated as non-A, non-B hepatitis virus more than 20 years ago. The narrow host range of HCV infection hampers development of animal models for the study of HCV infection and the viral immune-pathogenesis. The chimpanzees have been employed as an animal model for HCV infection, although the use of chimpanzees is limited by ethical concerns, restricted availability and high costs. In order to overcome these hurdles, new animal models for HCV infection appear to play critical roles. In this point of view, the development of a macaque model for hepatitis C will contribute to hepatitis C research in vivo. The genome sequences of viruses were determined from plasma samples of macaques with highly alanine aminotransferase. Some viruses were detected from macaque plasma, using next generation sequencer platform.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：ウイルス探索 血漿メタゲノム解析 ヘパチウイルス 霊長類 マカク 次世代シーケンサー 肝炎

### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎の原因ウイルスである Hepatitis C virus(HCV)は非 A、非 B型肝炎ウイルスとして今から 20 年以上前に単離された。HCV は世界的に蔓延しており、抗ウイルス剤や治療用ワクチン開発が急務である。薬剤開発やワクチン検定には実験動物を用いたサロゲートモデルが非常に重要な役割を果たすが、HCV の起源を決定づけられるようなウイルスオルソログは未だ見つかっていない。現時点ではタマリンから単離され、HCV と同じくヘパチウイルスとして分類されている GB ウイルス B 型(GBV-B)があり、新世界ザルに感染し肝炎症状を示すことが知られている。また近年の遺伝子解析技術の発達により、網羅的な塩基配列の解読結果からイヌ、ウマ、コウモリ、マウスにおけるヘパチウイルスのゲノム配列決定がなされている。しかしながらヒト、タマリン以外の哺乳類から C 型肝炎ウイルス様ヘパチウイルスが単離された報告はなく、HCV の起源は未だ明らかになっていない。

そこで旧世界サルからヘパチウイルスが分離されれば、これまで報告されてきた HCV(ヒト)、GBV-B(新世界ザル)、CHV(イヌ)などと比較・解析することによって HCV の起源を解明することができると考えた。

### 2. 研究の目的

Hepatitis C virus(HCV)は C 型肝炎の原因ウイルスでありヘパチウイルス属に分類される。本研究ではマカク類で見出された肝炎マーカー高値な個体に着目し、旧世界サルヘパチウイルスの同定を目的とする。これによりウイルス学において長年の命題であった HCV の起源を明らかにでき、さらに HCV 研究において旧世界サルヘパチウイルス/旧世界サルという新たなモデルの提案によって HCV の病原性、予防、治療のための研究に大きく貢献できると考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) マカク属サルにおける血中肝炎マーカーの調査

これまでに蓄積された血液生化学検査のデータを精査すると、マカク類に肝炎マーカーの値が高い個体が見出されている。これらの高 ALT 値が HCV 様ウイルス感染に起因しているのではないかと推測した。

ニホンザルおよび他マカク属サルを対象として血漿サンプリングを行い、血漿中 GPT、GOT 値(肝炎マーカー)の測定を行った。高 GPT 個体のスクリーニングは個別飼育由来サンプル、および放飼場由来サンプルで行った。

#### (2) 血漿中核酸のシーケンス

血漿サンプルよりウイルス核酸を抽出し、逆転写反応によって cDNA 合成を行った。次いで次世代シーケンサー(Roche GS Jr.)を用いることにより、得られた血漿中の核酸配列からウイルスゲノムデータの検出を行った。

#### (3) データ解析

得られたリードは Newbler Assembler を用いてアセンブルを行った。次いでコンティグを BLAST 検索により解析し、どのような配列にヒットしたか集計した。

### 4. 研究成果

#### (1) マカク属サルにおける血中肝炎マーカー

マカク属サルから血漿サンプリングを行い、肝炎マーカー(GOT, GPT)の測定を行った。これらのうちで GPT が比較的高い個体(>80)は、およそ 2%であった(図 1)。

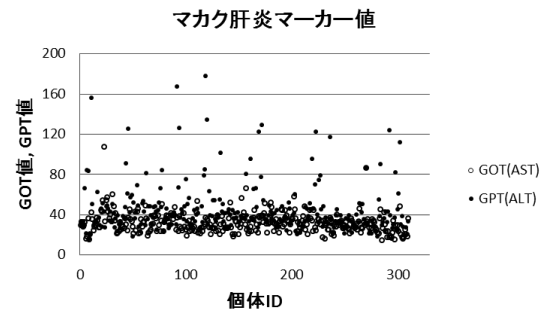


図 1

マカク血漿中の肝炎マーカー(GOT, GPT)の値

#### (2) 血漿中核酸のシーケンス

GPT 高値な血漿のウイルス探索結果を一部、テーブル 1 に示す。BLAST データベース検索からウイルス様配列としてヒットした割合はおよそ 0.2%であった(図 2)。

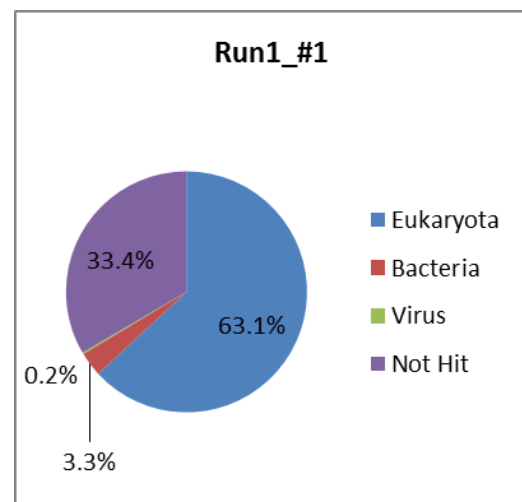


図 2

GPT 高値なサンプルにおけるウイルス探索結果

これらのウイルス様配列は全てアデノウイルス配列であった(テーブル 1)。

## テーブル1

GPT 高値なサンプルから BLAST 検索によって検出されたウイルス様配列

Sample	Length (bp)	Virus
Macaque	761	Human adenovirus C strain
Macaque	696	Human adenovirus C strain
Macaque	145	Human adenovirus C strain

### (3) データ解析

他のサンプル解析からは、ウイルス様配列にヒットしたシーケンス配列は、SV40, HERV-K, ERV-L, Adenovirus, ERV-P, HERV-9 などがヒットした(テーブル2)。

## テーブル2

マカク血漿サンプルから BLAST 検索によって検出されたウイルス様配列

ID	GPT	BLAST Search
1	16	SV40, Human Retro K
2	16	SV40, Human Retro K
3	16	SV40, Human Retro K, ERV-L
4	24	SV40, Human Retro K
5	26	SV40, Human Retro K
6	124	SV40, Human Retro K
7	126	SV40, Human Retro K
8	134	SV40, Human Retro K, Adenovirus, Human Retro virus, ERV-P, Human ERV-9
9	167	SV40, Human Retro K
10	178	SV40, Human Retro K

以上の結果はマカクサル血漿中で検出されるウイルス核酸情報と肝炎マーカーの関係について明らかにする。

今後、メタゲノム解析によってウイルスゲノムを検出するには、検出感度を高める必要がある。そのためには、血漿サンプル数百個体分をバルク処理するのが望ましいだろう。さらに cDNA 調整の際、精製手法を改良する必要がある。

旧世界サルヘパチウイルスの同定がなされれば、これまで不明であった HCV の起源を明らかにすることができる。HCV 研究において、旧世

界サルヘパチウイルス/旧世界サルという新たなモデルの提案によって HCV の病原性、予防、治療のための研究に大きく貢献することができると。

## 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)

Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H: Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3, 314, 2012  
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00314.

Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H: Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archives of Virology* 158, 1209-1220, 2013.  
DOI: 10.1007/s00705-013-1618-6.

Yoshida T, Suzuki S, Iwasaki Y, Kaneko A, Saito A, Enomoto Y, Higashino A, Watanabe A, Suzuki J, Inoue K, Kuroda T, Takada M, Ito R, Ito M, Akari H: Efficient in vivo depletion of CD8+ T lymphocytes in common marmosets by novel CD8 monoclonal antibody administration. *Immunology Letters* 154, 12-17, 2013.  
DOI: 10.1016/j.imlet.2013.08.005

Higashino A, Sakate R, Kameoka Y, Takahashi I, Hirata M, Tanuma R, Masui T, Yasutomi Y, Osada N: Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. *Genome Biology* 13, R58, 2012.  
DOI: 10.1186/gb-2012-13-7-r58

(学会発表) (計 5 件)

Atsunori Higashino, Saori Suzuki, Akatsuki Saito, Yuko Katakai, Sachi Okabayashi, Hirofumi Akari, 「Analysis of dynamics in GB virus B quasispecies in the course of long-term persistent infection and disease progression in marmosets.」, 『20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses』, 2013 年 10 月 6 日 ~ 2013 年 10 月 10 日

東濃篤徳, 鈴木紗織, 齊藤暁, 片貝祐子, 岡林佐知, 明里宏文, 「新世界ザルにおける持続感染 GBV-B の Quasispecies 解析」, 『第 61 回日本ウイルス学会学術集会』, 2013 年 11 月 10 日 ~ 2013 年 11 月 12 日

東濃篤徳, 森健一, 鈴木紗織, 岩崎優紀, 吉

田友教, 齊藤暁, 榎昇, 明里宏文, 「霊長類を用いたHCV/GBV-Bキメラウイルス感染モデル」, 『第60回日本実験動物学会総会』, 2013年5月15日~2013年5月17日

東濃篤徳, 森健一, 鈴木紗織, 岩崎優紀, 吉田友教, 齊藤暁, 榎昇, 明里宏文, 「タマリンを用いたHCV/GBV-Bキメラウイルス感染モデル」, 『日本ウイルス学会学術集会』, 2012年11月13日~2012年11月15日

Atsunori Higashino, Ken-ichi Mori, Saori Suzuki, Yuki Iwasaki, Tomoyuki Yoshida, Akatsuki Saito, Noboru Maki, Hirofumi Akari, 「An animal model for chimeric virus of hepatitis C virus/GB virus B」, 『19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses』, 2012年10月05日~2012年10月09日

東濃篤徳, 坂手龍一, 亀岡洋祐, 高橋一郎, 平田誠, 田沼玲子, 増井 徹, 保富康宏, 長田直樹, 「マレーシア産カニクイザルのゲノム解析 Genome analysis of Malaysian cynomolgus monkey」, 『第28回日本霊長類学会大会』, 2012年07月06日~2012年07月08日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/chemr/kari-lab/pg157.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東濃 篤徳 (Higashino Atsunori)

京都大学・霊長類研究所・特定研究員

研究者番号: 30470199