

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790454

研究課題名(和文) ロタウイルス感染症の防御免疫におけるT細胞の役割に関する研究

研究課題名(英文) Role of T-cells on protective immune response to rotavirus infection.

研究代表者

藤井 克樹 (Fujii, Yoshiki)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：40518122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウスロタウイルスの感染モデルを用いて、T細胞応答に関する詳細な解析を行った。Balb/cマウスにロタウイルスEW株を経口感染させると、10日後に腸管内のT細胞数が最大となった。この時、腸管内に発現しているT細胞受容体(TCR)の塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した結果、ウイルス感染マウスの腸管に特異的に集積しているTCRの配列を特定することができた。今後、このT細胞の反応性を調べることにより、防御免疫機序やウイルス株間の交差反応性を検討することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：T-cell responses on murine rotavirus infection were analyzed in detail by using the mouse model. Murine rotavirus EW strain was inoculated orally to Balb/c mice. The maximum T-cell proliferation was observed at 10 days after infection. The nucleotide sequences of T-cell receptors (TCRs) expressed in ileum at 10 days after rotavirus infection were comprehensively analyzed by using next-generation sequencer. Then, it was found that rotavirus-specific TCRs accumulated on rotavirus-infected ileum and the sequences could be identified. In future studies, we will analyze the reactivity of these T-cells, which enables us to understand the mechanisms of protective immunity and cross-reactivity among virus strains.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ロタウイルス マウス T細胞受容体 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

(1) ロタウイルス (RV) は乳幼児重症下痢症の主要因であり、先進国・発展途上国を問わず広く流行している。わが国においても年間の感染者数は約80万人と推計されており、毎年数人の死者が報告されている。2011年および2012年に、わが国においてもRVワクチンが導入され、RV感染症の減少が期待されている。しかしRVワクチンの作用機序については未だ不明な点が多く、RV感染症における防御免疫や遺伝子型間の交差免疫応答の機序に関してもほとんど解明されていない。本研究では、RV感染によって誘導されるT細胞の応答を網羅的に解析し、RV感染における免疫応答の解明を目指した。

(2) RV ワクチンは、初回感染時に起こりやすい重症下痢症を予防する目的で開発されており、現在ロタテックおよびロタリックスの2種類の弱毒生ワクチンが世界中で使用されている。わが国においても2011年(ロタリックス)および2012年(ロタテック)に販売が開始された。いずれのワクチンも、ロタウイルス下痢症に対して70%程度、重症下痢症に対しては90~95%程度という高い予防率を有することが確認されている。しかし、ワクチンの作用機序や弱毒化のメカニズムについては未だ明らかになっていない。また、生ワクチンであるが故、ワクチン接種者から排泄されたワクチン株と野生株との交雑(リアソートメント)やワクチン株によるRV感染症の発生も危惧される。従って、いずれは生ワクチンから安全性の高い不活化あるいはコンポーネントワクチンなどに移行する必要があると考えられる。しかし、ワクチンの作用機序や防御免疫のメカニズムが十分に解明されていない現状では、新たなワクチンを開発・評価することも困難である。

(3) 種々の疫学調査や感染実験の結果から、ウイルスに対する中和抗体の惹起だけがワクチンの効果ではないことが示唆されており、中和抗体(特にIgA)、CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞のいずれもがRVに対する防御免疫に関与していると考えられている。特に腸内からのウイルス排除にはCD8陽性T細胞が重要な役割を果たしていることが、免疫不全マウスを用いた研究から明らかとなっている。T細胞によって認識されるエピトープはいくつか報告されているが、それらと感染防御との関連性については十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究の開始に先立ち、RV感染時の免疫応答を評価するため、マウスロタウイルスを用いた感染動物モデルの確立を試みた。

(2) 次に、その動物モデルを用いて、RV感染時に誘導されるT細胞の応答をT細胞受容体(T cell receptor: TCR)の分子レベルで解析し、RV特異的TCRの特定を試みた。

(3) TCRを解析するにあたって、従来は adaptor-ligation PCR、microplate hybridization assay および molecular cloning による TCR シーケンス解析を行っていた。しかし、近年急速に発達した次世代シーケンス解析を用いた TCR レパトア解析法が実現可能となったため、本研究においてその実用可能性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 生後10日のBalb/cマウスにマウスロタウイルスEW株を経口接種することにより、ウイルスの用量依存的にマウスが下痢を発症することを確認し、50%下痢発症用量 DD_{50} (Dose causing diarrhea in 50% of animals)を算出した。感染マウスおよびコントロールマウス(生後10日にPBSを $5\mu\text{L}$ 経口投与、10日以前のマウスは非投与)の便、回腸および脾臓を経時的に採取し、組織はRNA later RNA Stabilization Reagen (Qiagen)に浸漬した。後日、各組織からRNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen)を使用してtotal RNAを抽出した。

(2) 便中および回腸内のウイルス量はreal-time PCRにて測定した。使用したプライマーとプローブはNSP3をターゲットとした。各種内部標準遺伝子(GAPDH、 β -actin)とCD抗原(CD3、CD4、CD8、CD20)の発現量についてもreal-time PCRにて定量を行った。使用したプライマーおよびプローブの配列は表1に示す。

表1. 使用したプライマーおよびプローブ配列

Primer name	5'- sequence -3'
EW-NSP3-F	CTAAACATCTGCATAACTCCCC
EW-NSP3-R	GTCACATAATGCCCCCTATAGC
EW-NSP3-P(*)	AGCACGATAGTTAAAAGCTAACACTGT
GAPDH-F	GAATGGGAAGCTTGTTCATCAAC
GAPDH-R	AGTAGACTCCACGACATACTCA
ACTB-F	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTG
ACTB-R	GTAAAACGCAGCTCAGTAACAG
CD3-F	ACTCTTCTCTGGGATGGATTCT
CD3-R	ATTGCCTTTTGCATTAGCAGAG
CD4-F	CCCTAGTGAATGGAACCTTGGT
CD4-R	TGTGGTATTCATCCCTGTGTTT
CD8-F	CCTTGAGAACATTCCTTAGCA
CD8-R	GACCATGGGTGACTCTTAGTTT
CD20-F	CCTTGCTTAGGGAGTCTTACAC
CD20-R	CTCTGACTCCTCTGCTGTAAAC

(*) 5'末端にFAM、3'末端にBHQを付加。

(3) TCR レパトア解析は adaptor-ligation PCR でサンプル中の全 TCR 遺伝子を均一に増幅した後、次世代シーケンサーGS Junior (ロシュ・ダイアグノスティックス)にて解析した。得られたデータはレパトア解析専用ソフト Repertoire Genesis™にて解析を行い、各サンプル中の TCR 分子の発現ランキングを作成した。このレパトア解析は Repertoire Genesis 株式会社に委託して行った。

4. 研究成果

(1) 10日齢の Balb/c マウスにマウスロタウイルス EW 株を 10000 DD₅₀ (5 µL) 経口接種し、下痢便の有無を観察した。低用量では下痢の有無が判断し難いケースがあるため、確実に下痢症状を確認できる 10000 DD₅₀を採用した。ウイルス感染から 3、5、7、10、14 日後に便、回腸および脾臓を採取し、RNA を抽出した。コントロールとして、生後 5、7、10、14、21、28、56 日齢のウイルス未接種マウスについても便、回腸および脾臓を採取した(いずれも n=4)。便中および回腸内のウイルス量を real-time PCR で測定したところ、便、回腸ともに、接種から 5 日後にウイルス遺伝子量が最大となることが判明した。また、CD3、CD4、CD8、CD20 の発現量についても real-time PCR で定量した結果、いずれもウイルス接種 3 日後ではコントロールよりも発現量が低かったが、5 日後にはコントロールより高くなり、7 日後にはピークとなった。特に CD3 と CD8 (図 1) は、コントロールと比較して発現量が顕著に上昇していた。CD4 と CD20 の上昇率は CD3、CD8 と比較すると穏やかだった。

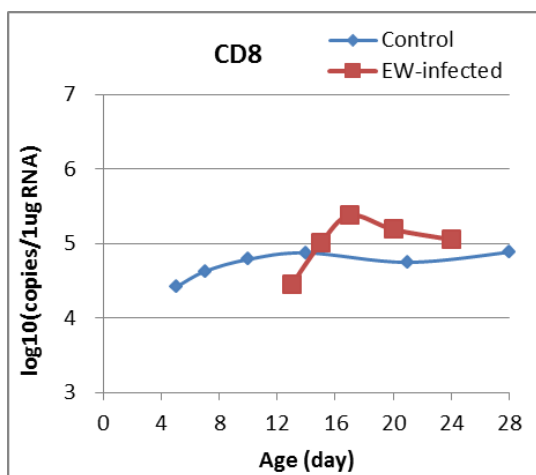


図 1 .RV 感染後の回腸における CD8 発現量

(2) RV 感染 7 日後のマウスの回腸について、TCR レパトア解析および TCR シークエンス解析を行った。コントロールとして生後 14 日の正常マウスを用いた。各サンプルについて adaptor-ligation PCR で全 TCR 遺伝子を均一に増幅した後、次世代シーケンス解析

を行い、得られたリード数を V ファミリー毎にカウントし、それをグラフ化した(図 2 および図 3)。解析の結果、ウイルス感染マウスの腸管において、鎖では TRAV3-3、TRAV6-6、TRAV13-1、TRAV21 が、鎖では TRBV13-2 と TRBV29 の存在比率がコントロールと比較して顕著に増加していることが明らかとなった。更に抗原認識部位である CDR3 のアミノ酸配列を比較したところ、個体間で同一あるいは類似した配列が数種類、高頻度に見られた。特に鎖において、配列の類似性が顕著であった。従って、これらの TCR を持つ T 細胞がロタウイルスに対して特異的に応答していると考えられた。今後、上記の TCR が認識するエピトープを in silico 解析により推定する予定である。また、ロタウイルス感染マウスから、この TCR を有した T 細胞をクローニングして抗原特異性を確認し、さらに細胞移入実験により感染防御能を検討する計画である。

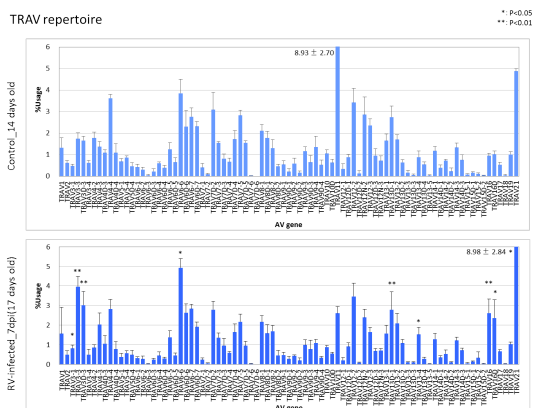


図 2 . TCR 鎖のレパトア解析結果

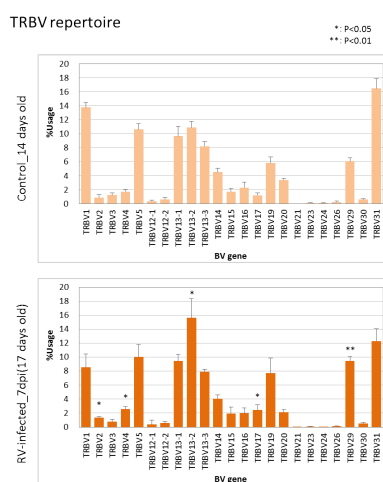


図 3 . TCR 鎖のレパトア解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Yoshiki Fujii, Takashi Shimoike, Hirotaka Takagi, Kazuhiko Katayama et al.: Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 2012, 56:630-638. doi : 10.1111/j.1348-0421.2012.00479.x.

Kazutaka Kitaura, Yoshiki Fujii, Ichiro Kurane, Ryuji Suzuki, et al.: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Imm Method* 2012, 384:81-91. doi : 10.1016/j.jim.2012.07.012.

Yoshiki Fujii, Kazutaka Kitaura, Ichiro Kurane, Ryuji Suzuki, et al.: Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes. *PLoS ONE* 2013, 8(2): e56296. doi:10.1371/journal.pone.0056296

Kosuke Murakami, Chie Kurihara, Yoshiki Fujii, Kazuhiko Katayama et al.: Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS ONE* 2013, 8(6): e66534. doi : 10.1371/journal.pone.0056296.

Fujiko Minami-Fukuda, Makoto Nagai, Yoshiki Fujii, Tetsuya Mizutani et al.: Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. *J Vet Med Sci.* 2013, 75:1651-5. doi : 10.1292/jvms.13-0265

Tsuneyuki Masuda, Makoto Nagai, Yoshiki Fujii, Tetsuya Mizutani et al.: Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol* 2014, 171(1-2):66-73. doi : 10.1016/j.vetmic.2014.03.009.

Yoshiki Fujii, Toyoko Nakagomi, Kazuhiko Katayama, Osamu Nakagomi et al.: Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* 2014, 28:426-33. doi : 10.1016/j.meegid.2014.08.001.

Francis E. Dennis, Yoshiki Fujii, Kei

Haga, Kazuhiko Katayama et al.: Identification of Novel Ghanaian G8P[6] Human-Bovine Reassortant Rotavirus Strain by Next Generation Sequencing. *PLoS One* 2014, 9(6):e100699. doi : 10.1371/journal.pone.0100699

Satoshi Komoto, Yaowapa Pongsuwanna, Yoshiki Fujii, Kazuhiko Katayama, Koki Taniguchi et al.: Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Vet Microbiol.* 2014, 174(3-4):577-583. doi : 10.1016/j.vetmic.2014.09.033.

Manabu Nemoto, Makoto Nagai, Yoshiki Fujii, Kazuhiko Katayama, Tetsuya Mizutani et al.: Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009-2010. *Arch Virol.* 2015, 160(5):1171-9. doi : 10.1007/s00705-015-2374-6

Makoto Nagai, Saya Shimada, Yoshiki Fujii, Kazuhiko Katayama, Tetsuya Mizutani et al.: H2 genotypes of G4P[6], G5P[7], and G9[23] porcine rotaviruses show super-short RNA electropherotypes. *Vet Microbiol.* 2015, 176(3-4):250-6 doi : 10.1016/j.vetmic.2015.02.002.

Tomihiko Ide, Satoshi Komoto, Yoshiki Fujii, Kazuhiko Katayama, Koki Taniguchi et al. Whole Genomic Analysis of Human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar. *PLoS One.* 2015, 10(5):e0124965 doi : 10.1371/journal.pone.0124965.

[学会発表](計19件)

藤井克樹、下池貴志、戸高玲子、片山和彦：ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学研究(2012年) 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013年11月10-12日

高木弘隆、藤井克樹、小林宣道、棚林清、片山和彦：多様なA群ロタウイルス株に対応する感受性MA104細胞クローン樹立の試み 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013年11月10-12日

戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆字、中西章、片山和彦：カリシウイルスのリバーシジェネティクスシステムを用いた感染性粒子の研究 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013年11月10-12日

村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、
下池貴志、脇田隆字、栗原千枝、穂刈量太、
松田幹、片山和彦：ノロウイルスの小腸上皮
細胞への結合メカニズム 第 61 回日本ウイ
ルス学会学術集会(神戸)2013年 11月 10-12
日

下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、
戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆字、片
山和彦：マウスノロウイルス感染細胞内のウ
イルス蛋白質間とそのゲノム RNA との相互作
用 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神
戸)2013年 11月 10-12日

藤井克樹：ロタウイルスの新知見 ウイル
ス性下痢症研究会第 25 回学術集会(神戸)
2013年 11月 9日

藤井克樹：ロタウイルスの分子疫学 衛生
微生物技術協議会第 34 回研究会(名古屋)
2013年 7月 11-12日

藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、中込とよ
子、中込治、片山和彦：ゲノム遺伝子型構成
解析による網羅的ロタウイルス分子疫学基
盤構築 第 54 回日本臨床ウイルス学会(倉
敷)2013年 6月 8-9日

西村直子、野口篤子、伊藤陽里、辰巳正純、
大場邦弘、中込治、中込とよ子、藤井克樹、
片山和彦：我が国で流行したロタウイルスの
遺伝子型の全国分布(2012年) 第 54 回日
本臨床ウイルス学会(倉敷)2013年 6月 8-9
日

伊藤陽里、中込とよ子、中込治、藤井克樹、
片山和彦：京都府南丹地区におけるロタウイ
ルス胃腸炎入院率 第 54 回日本臨床ウイ
ルス学会(倉敷)2013年 6月 8-9日

三浦忍、野口篤子、藤井克樹、中込治、片
山和彦、中込とよ子、高橋勉：秋田県由利地
区におけるロタウイルス胃腸炎による入院
率 第 54 回日本臨床ウイルス学会(倉敷)
2013年 6月 8-9日

村上耕介、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦：
ノロウイルス小腸上皮細胞への結合メカニ
ズムの解析 第 54 回日本臨床ウイルス学会
(倉敷)2013年 6月 8-9日

藤井克樹：ロタウイルスの検出法と疫学調
査 平成 26 度希少感染症診断技術研修会(東
京)2015年 2月 17-18日

Yoshiki Fujii, Yen Hai Doan, Toyoko
Nakagomi, Osamu Nakagomi, Kazuhiko
Katayama : Continued circulation of novel
G1P[8] double-reassortant strains carrying

the DS-1-like genotype constellation in
Japan. 17th International Conference on
Emerging Infectious Diseases (EID) (台
北)2015年 1月 25-29日

Yoshiki Fujii : Molecular evolutionary
study of rotavirus genome using next
generation sequencer. 感染症制御セミナー
(NIID International Seminar on
Infectious Diseases)(東京)2015年 1月
22-23日

藤井克樹 : Impact of next generation
sequencing technologies on whole genome
analysis of rotaviruses(シンポジウム) 第
62 回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2014
年 11月 10-12日

河本聡志、井手富彦、和久田光毅、Dennis
Francis Ekow, 芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、
谷口孝喜：タイで検出された G10P[5]ブタロ
タウイルス P343 株ゲノムの全塩基配列の解
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

井手富彦、河本聡志、森口匡子、Dennis
Francis Ekow, 芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、
Shofiqur Rahman、梅田浩二、Sa Van
Nguyen、辻孝雄、谷口孝喜：ミャンマーに
おける G12P[8]ヒトロタウイルスの全塩基配
列に基づく遺伝子解析 第 62 回日本ウイ
ルス学会学術集会(横浜)2014年 11月 10-12
日

藤井克樹：ロタウイルスの分子疫学とロタ
ウイルスワクチン(シンポジウム) 第 63
回日本感染症学会東日本地方会総会学術集
会・第 61 回日本化学療法学会東日本支部総
会合同学会(東京)2014年 10月 29-31日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井克樹 (FUJII, Yoshiki)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任
研究官

研究者番号：40518122