

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293112

研究課題名(和文) マーモセットモデルを用いたデング出血熱の病態形成機序の解明と新規治療法の基盤確立

研究課題名(英文) Establishment of marmoset model for elucidation of the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever and development of new treatment

研究代表者

倉根 一郎 (Kurane, Ichiro)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：90278656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：デング熱は世界的に重要な蚊媒介性ウイルス感染症であり、重症化により致死的なデング出血熱となる。デング熱・デング出血熱にはこれまで動物モデルがなく、病態形成機序の解明や新規予防治療法の開発の遅れの原因の一つであった。マーモセットはデングウイルス接種により高いウイルス血症を示し、また抗体応答、T細胞応答もヒトと同様であった。一つの血清型の弱毒生ワクチン候補株の免疫によって中和抗体が誘導され、同種血清型ウイルスの接種によるウイルス血症は防御された。以上、マーモセットが、病態形成機序の解明や新規予防治療法の開発のモデルとなることが示された。

研究成果の概要(英文)：Dengue fever is an important vector-borne virus disease in the world. Dengue hemorrhagic fever, a severe and fatal form of illness, is developed in some patients. There have been no animal models for dengue fever and dengue hemorrhagic fever, and the absence of animal models has hampered the understanding of the pathogenesis and the development of measures for prevention and treatment. High levels of viremia were detected in marmosets after inoculation with dengue virus. Antibody and T cell responses were similar to those detected in humans. High levels of neutralizing antibodies were detected after immunization with candidate live-attenuated dengue vaccine, and viremia was not detected after challenge with a wild strain of the same serotype. These results suggest that marmosets are an animal model suitable for the elucidation of the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever and the development of vaccine and treatment.

研究分野：ウイルス学

キーワード：感染防御・制御 デングウイルス マーモセット

1. 研究開始当初の背景

デング熱・デング出血熱は世界で最も重要な蚊媒介性ウイルス感染症といえる。流行域拡大と感染者の増大が深刻な問題となっている。年間数千万人のデング熱患者と約 50 万人のデング出血熱患者の発生が報告されている。特異的治療法は確立されておらず、ワクチンも実用化には至っていない。

デング熱、デング出血熱の病態形成機序の解明が遅れている理由の一つは、動物モデルが確立されていないことにある。これまで、げっ歯類や霊長類を用いた動物モデルの開発が進められてきたが、ヒトにおける病態を反映するモデルは完全には確立されていない。従って、デング熱・デング出血熱の病態機序の解明、及び治療法の確立には動物モデルの確立が急務である。

2. 研究の目的

デング熱・デング出血熱に関してはこれまで、げっ歯類や霊長類を用いた動物モデルの開発が進められてきたが、ヒトにおける病態を反映するモデルは確立されていない。本研究の目的は、ヒトにおける病態を反映するモデルを確立し、そのモデルを用いて、デング熱・デング出血熱の病態解明基盤となるウイルス免疫学的解析を行い、さらに病態形成機序に基づく新規治療法や予防法開発のための基盤を確立することにある。

3. 研究の方法

(1) デングウイルス異種血清型の接種時における感染病態：

コモンマーマモセット (Callithrix jacchus 以下マーマモセット) は非ヒト霊長類の実験動物であるが、我々はこれまでに、マーマモセットがデングウイルスに感受性を有する結果を得ている。

マーマモセットに、デングウイルスを接種しウイルスの各種接種条件において、ウイルス血症とともに抗体等の免疫応答も確立する。さらに、病態形成を解明するため、デングウイルスの単回接種や他の血清型ウイルスの 2 回目接種を行い、ヒトにおいて観察されるように再感染において症状が重篤化するかも検討する。再感染の接種間隔は接種した血清型以外に対する中和抗体価が 10 倍まで低下する時期を目安とし、再感染後においても血液学的評価を行った。

初感染と再感染においては複数の組み合わせを試みた。組み合わせとして デングウイルス 3 型初感染、2 型再感染、2 型初感染、1 型再感染、2 型初感染、3 型再感染を行った。初感染と再感染の期間は 59 週あるいは 83 週とした。

症状の発症に伴い、マーマモセットは安楽死させ、マクロおよびミクロの病理評価を行う。また、感染させた DV の生体内での存在を確認するために、免疫組織学的および in situ hybridization を行う。細胞免疫学的解析の

ために、初回感染時の末梢血細胞、二次感染時の種々の臓器および末梢血を採取し、一次保存する。実験で得られた血液サンプルを用いて、についてサイトカイン、ケモカイン等の蛋白量、発現量を解析する。またデングウイルス感染後の T 細胞応答を明らかにする。

(2) デングウイルス同種血清型の接種時における免疫応答と防御：

デングウイルス感染における防御と病態形成の解明のため、免疫マーマモセットに対して同血清型デングウイルスのチャレンジを行った。デングウイルス 1 型、あるいはデングウイルス 2 型の親株あるいはワクチン株ウイルスによって免疫されたマーマモセットに、各々同血清型のウイルスをチャレンジした。継時的に得られた血液サンプルを用いて、についてサイトカイン、ケモカイン等の蛋白量、発現量を解析する。またデングウイルス感染後の T 細胞応答を明らかにする。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) デングウイルス異種血清型の再感染時における感染病態及び抗体応答：

ヒトにおいては、再感染時にデング出血熱の発症率が高いことから、マーマモセットにおけるデングウイルス再感染時におけるウイルス学的、免疫学的応答を解析した。

再感染後 2, 4, 7 日にどの型によってもコンスタントに高いレベルのウイルス血症が認められた。再感染後は Fc レセプター陽性 BHK 細胞による測定によって、Fc レセプター陰性 BHK 細胞に比べ高いレベルのウイルス価が認められ、感染性を有するウイルス - 免疫複合体の存在が示唆された。

IgM 抗体反応は初感染に比べ遅くまた低レベルであった。また、IgG 抗体反応は初感染に比べ感染後早期から認められ初感染に比べ高レベルであった。これらの免疫応答はヒトにおける再感染時の反応と同様であった。さらに、中和抗体のレベルを Fc レセプター陽性細胞及び、陰性細胞によって測定した。Fc レセプター陰性細胞による測定では、中和抗体は血清型交叉性であり、いずれの血清型にも高いレベルの中和抗体価が観察された。一方、Fc レセプター陽性細胞による測定によれば、抗体の交叉性は低く、特に再感染初期においては初感染のウイルス血清型に対して認められた。血清型交叉性中和抗体はレベルも低く感染後 14 日に認められた。この抗体反応もヒトとほぼ同様であった。デング出血熱の症状はいずれのサルにおいても出現しなかった。一方、感染後のウイルス動態、抗体反応はヒトにおける再感染時と同様であった。

異なる血清型のウイルスをチャレンジした場合の病態についても解析した。再感染により高いウイルス血症とともに、出血斑や肝腫大が認められた。さらに、また、各臓器におけるデングウイルス抗原の存在を検討した。肝臓、脾臓、腎臓においてデングウイルス抗原陽性細胞が認められた。

また、出血斑が認められた皮膚においてデングウイルス抗原陽性細胞が認められた。これらの結果は、異なる血清型のデングウイルス感染においては防御は認められず、感染が成立し、デング出血熱に類似する病態像が認められることを示唆している。以上より、マモセットはデングウイルス感染時の防御においても、病態形成においてもヒトにおける状態を反映し、良いモデルとなりうることを示している。

(2) デングウイルス同種血清型の接種時における免疫応答と防御：

免疫マモセットに対して同血清型デングウイルスのチャレンジを行った。デングウイルス1型、あるいはデングウイルス2型の親株あるいはワクチン株ウイルスによって免疫されたマモセットに、各々同血清型のウイルスをチャレンジした。ウイルス血症は認められず同血清型ウイルスに対する防御が確認された。IgG抗体はチャレンジ後早期に上昇し、抗体反応が防御に大きな役割を果たしていることが示唆された。

さらに、T細胞免疫応答を解析すると、親株あるいはワクチン株による免疫時に比べ、CD3陽性細胞、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞の増加が早期に認められた。また、細胞におけるIFN γ 及びIL2発現レベルもチャレンジ群において上昇した。以上の結果は、初感染時により記憶T細胞、記憶B細胞が誘導され、これら記憶細胞のチャレンジ後早期の活性化が起こっていること、またこのことが防御に貢献していることが示唆された。

これらのIgG応答も、ヒトにおいて知られている応答と非常に類似している。従って、マモセットは、上記のように異なる血清型のデングウイルスによる再感染時の感染動態、免疫応答を示すのみでなく、同種血清型のデングウイルス感染時の防御免疫においても人と同様の反応を示すことが示唆された。

以上マモセットはデングウイルス感染時の防御免疫の解析、病態形成における解析においても良いモデルとなりうることを示している。

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 2 件)

Moi, M.L., Ami, Y., Shirai, K., Lim, C.K., Suzuki, Y., Saito, Y., Kitaura,

K., Saijo, M., Suzuki, R., Kurane, I. and Takasaki, T. Formation of infectious dengue virus-antibody immune complex in vivo in marmosets (*Callithrix jacchus*) after passive transfer of anti-dengue virus monoclonal antibodies and infection with dengue virus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 92, No. 2, 2015, pp. 370-376.

Moi, M.L., Takasaki, T., Omatsu, T., Nakamura, S., Katakai, Y., Ami, Y., Suzuki, Y., Saijo, M., Akari, H. and Kurane, I. Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viremia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. Journal of General Virology. Vol. 95, No. 3, 2014, pp. 591-600.

〔学会発表〕(計 4 件)

Moi ML, Shirai K, Ami Y, Lim CK, Suzuki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Development of a non-human primate model for primary and secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). The 63rd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, November 2014, New Orleans, Louisiana, (USA).

Moi Meng Ling, 白井顕治, 網康至, 宮田幸長, 林昌宏, 須崎百合子, 北浦一孝, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

Moi ML, Kurane I, Takasaki T. Development of tools for advancing dengue pathogenesis and vaccine research. Malaysia-Japan Academic Scholar Conference. November 2013, Tokyo, (Japan) <<BEST POSTER AWARD>>

Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Ami Y, Katakai Y, Suzuki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I, Takasaki T. Development of a novel non-human primate model for secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

倉根 一郎 (KURANE ICHIRO)

国立感染症研究所 所長

研究者番号：90278656

(2) 研究分担者

高崎 智彦 (TAKASAKI TOMOHIKO)

国立感染症研究所 ウイルス第一部室長

研究者番号：20221351

松谷 隆治 (MATSUTANI TAKAJI)

和歌山県立医科大学医学部 講師

研究者番号：70372290

鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI)

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床

研究センター 室長

研究者番号：70373470