

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460563

研究課題名(和文) ヒトメタニューモウイルス中和抗体価迅速測定法の開発とゲノム一次転写解析系の確立

研究課題名(英文) Development of rapid neutralization assays and a primary transcription assay for human metapneumovirus

研究代表者

後藤 敏 (Gotoh, Bin)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00211920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトメタニューモウイルス(HMPV)は、乳幼児に重症の細気管支炎、肺炎を起こすことがあるため、小児科領域で重要な呼吸器感染症のひとつである。しかしながら、診断の助けとなる中和抗体価の測定には、最低1週間を必要とする。培養細胞でのHMPVの増殖は遅く、細胞変性効果も弱いためである。本研究では、高感度ルシフェラーゼを発現する組換えHMPVを利用して迅速な中和抗体価測定法を開発した。本法では、12時間以内に測定が完了し、多段増殖に必要なトリプシンや蛍光染色をとらなうブラックアッセイも必要としない。これまで報告されたどの測定法よりも迅速で、多量検体の測定にも適した簡便な方法が確立された。

研究成果の概要(英文)：Human metapneumovirus (HMPV) is an important cause of lower respiratory tract infections in young children. Because of its slow replication and weak cytopathic effect in cultured cells, conventional neutralization assays for HMPV require about one week for completion. In this study we established a rapid neutralization assay based on a recombinant virus expressing highly sensitive luciferase genes. This assay could be completed within 12 h and eliminated the requirement of trypsin supporting multistep replication in cultured cells, as well as laborious processes including the plaque assay with immunostaining. Thus we succeeded in establishing the novel neutralization assay for HMPV, which is the fastest and the most straightforward of all previous assays and may be available for high throughput screening of neutralizing antibodies.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトメタニューモウイルス 中和抗体価測定法 組換えウイルス ルシフェラーゼ 緑色蛍光色素 一次転写 迅速 簡便

1. 研究開始当初の背景

ヒトメタニューモウイルス (HMPV: human metapneumovirus) はヒトに気管支炎・細気管支炎を起こす。あらゆる年齢層に感染するが、先天性心疾患をもつ乳幼児や低出生体重児等では重症化することがあるため、小児科領域ではRSウイルスとならんで重要な呼吸器感染症である。

HMPV 感染に対する免疫応答の解析やワクチン開発には、迅速で信頼性の高い中和抗体価測定法が求められる。しかしながら、HMPV は、培養細胞での増殖が遅く細胞変性効果も弱いため、細胞変性効果やプラークを指標とする中和抗体価測定法は難しく、免疫染色等の操作を必要とする。また、測定には1週間以上を要する。近年、緑色蛍光色素タンパク質 (GFP: Green fluorescence protein) 発現組換えウイルスを用いた改良法 (NA-GFP 法) が報告され、免疫染色は省略できるようになったが、それでも測定に3~5日ほどかかっていた。

2. 研究の目的

本研究は、HMPV 中和抗体価測定法のさらなる迅速化と簡便化を目的とする。測定時間の大幅な短縮のため、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ (Rluc: Renilla luciferase) あるいは、Rluc より高感度の Nanoluc (Nluc) を発現する組換え HMPV (rHMPV) を作製し、luc 活性を指標とした中和抗体価測定法 (それぞれ NA-Rluc 法、NA-Nluc 法) を確立する。さらに、分泌型 Nluc (sNluc) を発現する rHMPV を作製し、細胞破碎の手順を省くことにより多量検体に適した測定法の確立もすすめる。また、作製した組換えウイルスをウイルス感染細胞の一次転写検出系として利用できるかどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) rHMPV の作製: HMPV Jpn03-1 株の転写複製に関わる N、P、L、M2-1 タンパク質発現プラスミドと、ゲノム RNA 発現プラスミドを作製し、それらを培養細胞に導入すること (リバースジェネティクス法) で組換えウイルスを作製した。最初に、GFP と Rluc を発現する rHMPV-Rluc/GFP と GFP を発現する rHMPV-GFP を作製した (図 1)。

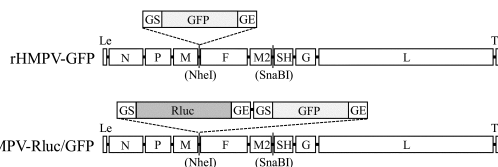


図1 rHMPV-GFP と rHMPV-Rluc/GFP のゲノム構造

さらに、より感度の高い Nluc あるいは分泌型の sNluc を発現する組換えウイルス rHMPV-Nluc/GFP、rHMPV-sNluc/GFP も同様な手順で作製した。Nluc としてはトゲオ

キヒオドシエビ (Oplophorus gracilirostris) のルシフェラーゼ遺伝子を利用し、Nluc の N 端にシグナルペプチドを付加したものを sNluc とした。

(2) プラークアッセイ: ウイルスを LLC-MK2 細胞に接種後、トリプシン含有 3%メチルセルロース培養液を重層し、一週間後にプラーク数をカウントした。

(3) 免疫沈降とイムノプロット解析: HMPV に対して高い中和能を有するヒト血清 No.9 を使って解析した。血清 No.9 を protein G (あるいは Glutathione) セファロースビーズと混合後、遠心し、その上清を protein G (あるいは Glutathione) 処理血清 (コントロール) として利用した。FLAG タグ付加ウイルスタンパク質 (F, G, SH) を一過性に発現させた HEK293T の細胞溶解液を No.9 血清あるいはビーズ処理コントロールを使って免疫沈降後、抗 FLAG 抗体によるイムノプロット解析を行った。

(4) NA-Rluc 法と NA-GFP 法: 段階希釈した血清と rHMVP-Rluc/GFP (50pfu/well) を混合後、LLC-MK2 細胞に接種した。NA-Rluc 法では、トリプシン非添加培養液を重層し、1日後に Rluc 活性を測定した。NA-GFP 法では、トリプシン含有培養液を重層し、7日後に LAS-4000 を利用して GFP 発現を定量化した。中和抗体価は、Rluc 活性あるいは GFP 発現が 50%に抑制されたときの血清希釈倍率の逆数と定義した。

(5) Nluc と sNluc の活性測定: rHMPV-Nluc/GFP あるいは rHMPV-sNluc/GFP を LLC-MK2 に 50pfu/well で感染後、経時的に細胞内 Nluc 活性、あるいは培養液中 sNluc 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) rHMPV-Rluc/GFP の増殖能は、rHMPV-GFP とほぼ同じで、大きな差は認められなかった (図 2)。

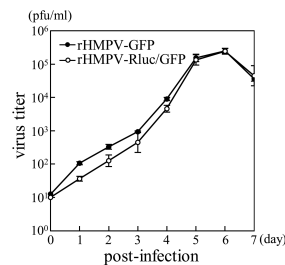


図2 rHMPV-GFP と rHMPV-Rluc/GFP の増殖曲線
各組換えウイルスを LLC-MK2 細胞に moi 0.01 で接種後、培養液中のウイルス粒子数を経時的にブラック法で測定した。

rHMPV-GFP は野生株の増殖能と遜色ないので、rHMPV-Rluc/GFP の増殖能も野生株とほぼ同じと考えられた。

(2) HMPV は、多段増殖するのにトリプシンを必要とする。しかしながら、rHMPV-Rluc/GFP は、10 pfu/well 以上で接種すれば、トリプシン非存在下(1段増殖)でも接種24時間後には Rluc 活性を検出できる(図3)ので、Rluc 活性を指標とすれば中和抗体価測定には多段増殖させる必要がないと考えられた。

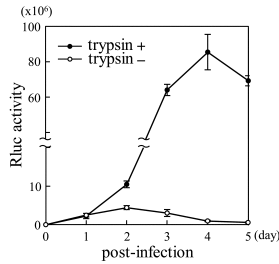


図3 rHMPV-Rluc/GFP 接種後の Rluc 活性の検出
rHMPV-Rluc/GFP を LLC-MK2 細胞に moi 0.01 で接種後、トリプシン存在下と非存在下で培養し、経時的に Rluc 活性を測定した。

(3) Rluc 活性を指標とした血清 No.9 の中和曲線は、GFP 発現を指標とした場合とほぼ同様のものが得られた(図4 AB)。

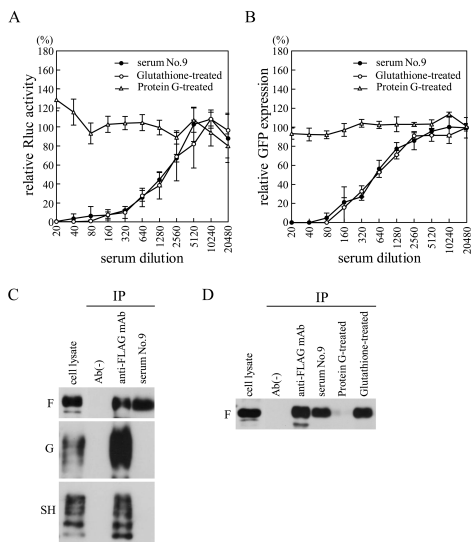


図4 Rluc 活性または GFP 発現に基づく中和抗体価測定
中和抗体価測定のための指標である Rluc 活性(A)あるいは GFP 発現(B)は、ウイルス接種後それぞれ1日後、7日後に測定した。FLAG-F, FLAG-G, FLAG-SH を発現させた HEK293T 細胞の抽出液を使って FLAG 単クローン抗体、No.9 ヒト血清、プロテイン G 処理 No.9 血清(プロテイン G ピーズ混合後の遠心上清)、グルタチオン処理 No.9 血清(グルタチオンピーズ混合後の遠心上清)で免疫沈降後、FLAG 単クローン抗体でイムノプロット解析した(C, D)。

protein G 処理により IgG を除いたコントロールサンプルでは、中和活性が喪失していた。イムノプロットの結果から、中和活性は、HMPV F タンパク質に結合する IgG に由来すると推定された(図4 CD)。

(4) ヒト血清 23 検体について、NA-Rluc 法と NA-GFP 法で中和抗体価を測定した。中和抗体陽性・陰性の判定は、両者の間ですべて一致した(図5 A)。また、両者の中和抗体価の値には正の相関が認められた(図5 B)。

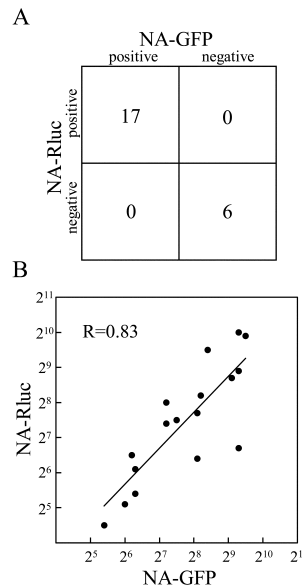


図5 NA-Rluc 法と NA-GFP 法で測定されたヒト血清 23 サンプルの中和抗体価の相関
20 倍希釈の血清が Rluc 活性あるいは GFP 発現を 50% 抑制できなかったとき、陰性とした。

(5) NA-GFP 法でも測定に 3~5 日必要であったが、今回確立した NA-Rluc 法は 24 時間以内に測定でき大幅な時間短縮となった。また、培養液にトリプシンを添加する必要がないため、トリプシンによる細胞剥離が起こらず、測定に失敗するリスクは激減した。NA-GFP 法と同程度の感度と特異性を持つことが明らかとなったが、使用ウイルス量(50pfu/well)を減らすことにより、より高感度な測定法に改善できる可能性がある。また、NA-Rluc 法では、アガロース重層や免疫染色など煩雑の手順が不必要であり、操作の簡便性の点でも NA-GFP 法に劣らない。

(6) rHMPV-Rluc/GFP の代わりに rHMPV-Rluc/GFP を使うと、さらに測定時間が短くなり、12 時間以内に終了することができた。これまでの方法の中で最も迅速且つ簡便な測定法となった。

(7) rHMPV-Rluc/GFP の代わりに rHMPV-Rluc/GFP を使うことで、細胞破壊操作を省略でき、多量検体をあつかうのに適した測

定法が確立できた。ただし、測定時間は延び、最低 36 時間必要となった。それは、rHMPV-sNluc/GFP のシードストックに含まれる sNluc が高いバックグラウンドになるためである。

(8) rHMPV-Nluc/GFP を利用することにより、感染後 2 時間から Nluc 活性を認め、ウイルスの一次転写に由来するタンパク質合成の検出が可能であったが、測定値は不安定で、これをベースにウイルス一次転写を解析するのは難しいことがわかった。

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)

Yuto Satoh, Mitsuhiro Hirose, Hiroko Shogaki, Hiroshi Wakimoto, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Ken-ichi Takahashi, Masae Itoh. Intramolecular complementation of measles virus fusion protein stability confers cell-cell fusion activity at 37 . FEBS Letters 589, 152-158, 2015, 査読有 DOI: 10.1016/j.febslet.2014.11.040

Mayu Yamaguchi, Yoshinori Kitagawa, Min Zhou, Masae Itoh, Bin Gotoh. An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: Inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction. FEBS Letters 588, 28-34, 2014, 査読有 DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.015

Min Zhou, Yoshinori Kitagawa, Mayu Yamaguchi, Chika Uchiyama, Masae Itoh, Bin Gotoh. Expeditious neutralization assay for human metapneumovirus based on a recombinant virus expressing Renilla luciferase. Journal of Clinical Virology, 56, 31-36, 2013, 査読有 DOI: 10.1016/j.jcvi.2013.11.015

Hiroshi Wakimoto, Masakatsu Shimodo, Yuto Satoh, Yoshinori Kitagawa, Kaoru Takeuchi, Bin Gotoh, Masae Itoh. F-actin modulates measles virus cell-cell fusion and assembly by altering the interaction between the matrix protein and the cytoplasmic tail of hemagglutinin. Journal of Virology, 87, 1974-1984, 2013, 査読有 DOI: 10.1128/JVI.02371-12

Yoshinori Kitagawa, Mayu Yamaguchi, Min Zhou, Machiko Nishio, Masae Itoh, Bin Gotoh. Human parainfluenza virus type 2

V protein inhibits TRAF6-mediated ubiquitination of IRF7 to prevent Toll-like receptor 7 (TLR7)- and TLR9-dependent interferon induction. Journal of Virology, 87, 7966-7976, 2013, 査読有 DOI: 10.1128/JVI.03525-12

[学会発表](計 11 件)

Yoshinori Kitagawa, Madoka Sakai, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijyo, Masae Itoh, Bin Gotoh. NSs protein of SFTS virus targets STAT2 for preventing type I interferon signaling. The 63rd annual meeting of the Japanese Society for Virology. 2015.11.22-2015.11.24, Fukuoka, Japan.

Takayuki Komatsu, Yukie Tanaka, Yoshinori Kitagawa, Naoki Koide, Yoshikazu Naiki, Mayu Yamaguchi, Bin Gotoh, Takashi Yokochi. Sendai Virus V protein inhibits the NLRP3 inflammasome activation by preventing the NLRP3 oligomerization. The 63rd annual meeting of the Japanese Society for Virology. 2015.11.22-2015.11.24, Fukuoka, Japan.

Hiroko Shogaki, Yuto Satoh, Saeka Yonemori, Mitsuhiro Hirose, Hiroshi Wakimoto, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Ken-ichi Takahashi, Masae Itoh. Mechanism how amino acid 465 in the HR-B domain of measles virus fusion protein modulates the fusion activity. The 63rd annual meeting of the Japanese Society for Virology. 2015.11.22-2015.11.24, Fukuoka, Japan.

脇本浩史、鈴木翔大、森田健介、佐藤友人、正垣博子、北川善紀、後藤敏、伊藤正恵、Nedd4 の麻疹ウイルス粒子形成促進作用とそのメカニズム、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日-2014 年 11 月 12 日、横浜

佐藤友人、樋口遙、姜大鵬、西川大智、正垣博子、脇本浩史、北川善紀、後藤敏、伊藤正恵、SSPE ウイルス Kobe-1 株 F 蛋白の細胞融合に関わる変異の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日-2014 年 11 月 12 日、横浜

北川善紀、山口まゆ、渡邊摩耶、伊藤正恵、後藤敏、センダイウイルス C タンパク質による JAK-STAT 経路阻害機構の研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日-2014 年 11 月 12 日、横浜

小松孝行、田中幸枝、北川善紀、山口まゆ、小出直樹、内記良一、後藤敏、横地高志、センダイウイルス V 蛋白質による NLRP3 inflammasome 活性化の阻害、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日-2014 年 11 月 12 日、横浜

北川善紀、山口まゆ、周敏、伊藤正恵、後藤敏、形質細胞様樹状細胞の IFN- α 産生とヒトメタニューモウイルス、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、神戸

周敏、北川善紀、山口まゆ、伊藤正恵、後藤敏、ヒトメタニューモウイルスの pH 依存性細胞融合とウイルス侵入様式、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、神戸

佐藤友人、正垣博子、廣瀬充宏、脇本浩史、高橋健一、北川善紀、竹内薫、後藤敏、伊藤正恵、麻疹ウイルス F 蛋白質のプロテアーゼ感受性決定要因、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、神戸

小松孝行、Odkhuu Erdenezaya、竹内健司、小出直樹、横地高志、後藤敏、一酸化窒素産生抑制におけるセンダイウイルス C 蛋白質の役割、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、神戸

〔その他〕

ホームページ等

<http://sumsdbweb.shiga-med.ac.jp/profile/ja.acb37f4a7735097c002eb8b95079000d.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 敏 (GOTOH, Bin)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00211920

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

北川 善紀 (KITAGAWA, Yoshinori)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00444448

(4) 研究協力者

山口 まゆ (YAMAGUCHI, Mayu)

滋賀医科大学大学院医学系研究科博士課程・学生

研究者番号：なし

周 敏 (ZHOU, Min)

滋賀医科大学大学院医学系研究科博士課程・学生

研究者番号：なし

伊藤 正恵 (ITO, Masae)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10201328