

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450413

研究課題名(和文) サイクロスポリンによるネコ伝染性腹膜炎ウイルスの複製阻害機構の解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of inhibition mechanisms of feline infectious peritonitis virus replication by cyclosporin.

研究代表者

田中 良和 (TANAKA, YOSHIKAZU)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50291159

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)：ネコ伝染性腹膜炎(FIP)は、一度発症すると致死的な経過をたどる。我々はサイクロスポリン(CsA)によるFIPウイルス(FIPV)ゲノム複製および転写抑制効果を見出した。

サイクロスポリンの細胞内結合蛋白質であるシクロフィリン(Cyp)のCsA結合能に影響を与える遺伝子変異体プラスミドを構築し、fcwf-4細胞に導入することによりFIPVの増殖に与える影響を解析した。その結果、CsAとの親和性を減少させる変異体は、FIPVの複製効率が低下した。本結果から、CypのCsA結合領域に結合する細胞側あるいはウイルス側因子とCsAが競合拮抗することにより、ウイルスの複製が阻害されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Feline infectious peritonitis (FIP) is a viral infectious disease and lethal. We previously found that cyclosporin A (CsA) inhibits FIP virus (FIPV) replication in vitro and in vivo. We made cellular cyclophilin (Cyp) mutants which binds CsA less than with a wild type Cyp and transfected them into fcwf-4 cells. Consequently, these mutants suppressed FIPV replication less than those in transfected into the cells with the wild type Cyp. These findings show that CsA competitively binds the binding domain of Cyp with any cellular and/or viral factors.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：ウイルス感染症 ネコ伝染性腹膜炎 ネココロナウイルス サイクロスポリン シクロフィリン

1. 研究開始当初の背景

ネココロナウイルス (FCoV) 感染症によるネコ伝染性腹膜炎 (FIP) は、一度発症すると致死的な経過をたどるが、FIP に対するワクチンはなく、有効な治療法も未だ確立されていない。申請者はサイクロスポリン (CsA) による FIP ウイルス (FIPV) ゲノム複製および転写抑制効果を見出した。一方、FIP 自然発症ネコに対する CsA 投与は、寛解を認めるが、治癒率は低い。このため FIP に対して、より有効な予防薬・治療薬の開発が世界中で求められている。

2. 研究の目的

本研究は、FIPV 複製制御に関わるウイルス側および細胞側因子を同定し、その複製における役割を解析する。さらに得られた知見から、CsA の作用機序や FIPV 複製制御機構の解明をおこない、新たな FIP 予防法・治療法開発への基盤を構築することに本研究の目的がある。

3. 研究の方法

(1) CsA の細胞内結合蛋白質であるシクロフィリン (Cyp) がネココロナウイルスの複製に影響を及ぼすかどうかを検討するために CypA および CypB のノックダウン細胞およびノックアウト細胞を樹立した。これらの細胞に FIPV を感染させ、ウイルス複製効率をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット解析により評価した。

(2) CsA 結合能に影響を与える CypA および CypB 遺伝子変異体プラスミドを構築し、これを fcwf-4 細胞に導入することにより FIPV の増殖に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) CypA および CypB の恒常的発現細胞では FCoV 増殖が優位に促進された (図 1)。また、

両遺伝子のノックダウン及びノックアウト各細胞において、FCoV の増殖は著しく抑制された (図 2, 図 3, 図 5)。また、ノックダウン細胞に CypA あるいは CypB 遺伝子を強制発現させると FCoV の複製効率が復帰した (図 4)。以上の結果から、FCoV の複製・増殖には CypA および CypB の両遺伝子発現が必要であることがわかった。

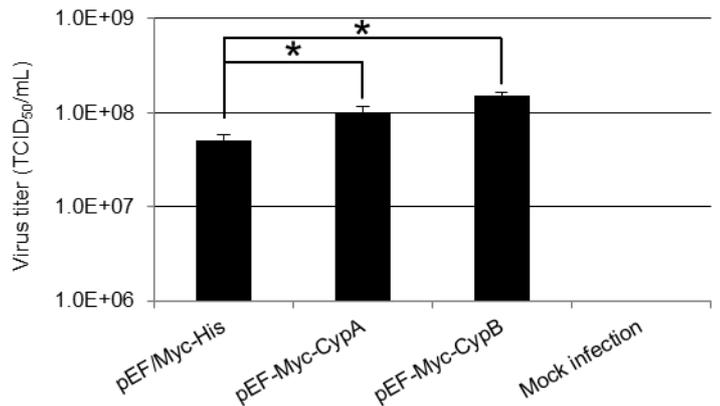


図 1

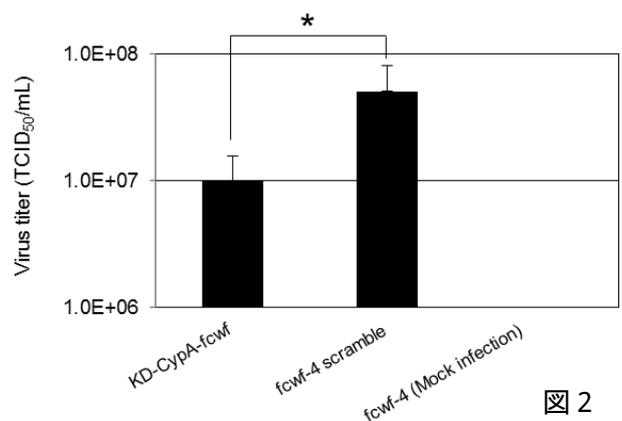


図 2

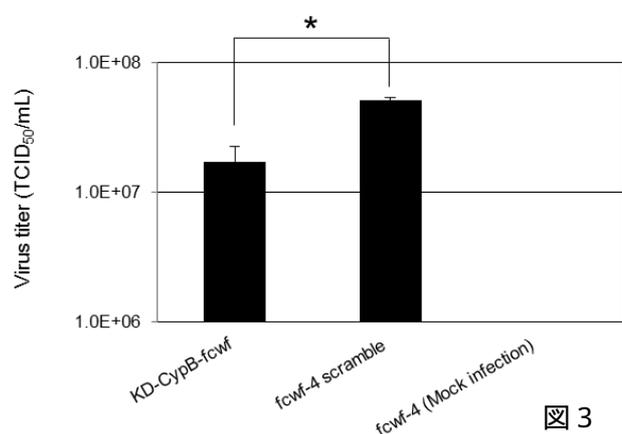


図 3

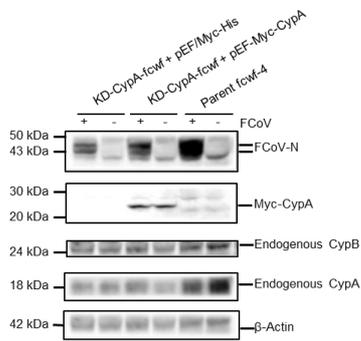


図 4

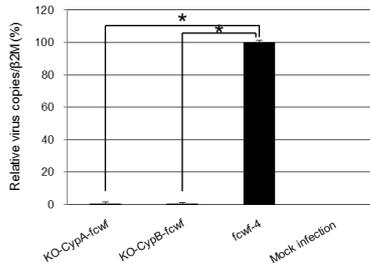


図 5

(2) CsA との親和性を減少させる CypA および CypB の変異体を fcwf-4 細胞に強制発現させると、FIPV の複製効率が低下した (図 6, 図 7)。この結果から、Cyp の CsA に対する結合領域に親和性のある細胞側因子あるいはウイルス側因子が CsA と競合拮抗することにより、ウイルスの複製が阻害されることがわかった。

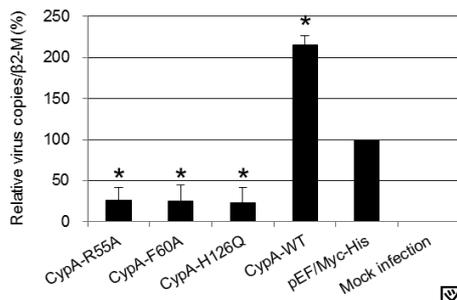


図 6

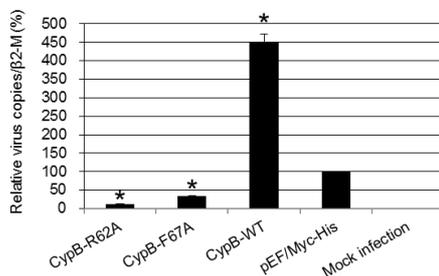


図 7

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 7 件)

Kobayashi M, Saito A, Tanaka Y, Michishita M, Kobayashi M, Irimajiri M, Kaneda T, Ochiai K, Bonkobara M, Takahashi K, Hori T, Kawakami E. MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. J Vet Med Sci. DOI:10.1292/jvms.16-0279. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28239051. (2017)

Tanaka Y, Sato Y, Sasaki T. Feline coronavirus replication is affected by both cyclophilin A and cyclophilin B. J Gen Virol. (2017) Feb;98(2):190-200. DOI: 10.1099/jgv.0.000663. Epub 2017 Mar 13. PubMed PMID: 27902373.

Tanaka Y, Amano A, Morisaki M, Sato Y, Sasaki T. Cellular peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase Pin1 facilitates replication of feline coronavirus. Antiviral Research, 126: 1-7. (2016) DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.11.013

Sasaki T, Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Matsuo M, Lu YJ, Tanaka Y, Hiramatsu K. Complete Genome Sequence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus schleiferi* Strain TSCC54 of Canine Origin. Genome Announcements. 29; 3(5). Oct pii: e01268-15. DOI: 10.1128/genomeA.01268-15. PubMed PMID: 26514766 (2015).

Munakata S, Tanaka Y, Nezu Y, Harada Y, Yogo T, Hara Y, Tian H, Matsuo Y, Tagawa M, Yodoi J. Induction of thioredoxin-1 in response

to oxidative stress in dogs. American Journal of Veterinary Research, 76(6):554-60. DOI: 10.2460/ajvr.76.6.554. PubMed PMID: 26000603. (2015) Jun

Tanaka Y., Sasaki, T., Matsuda, R., Uematsu, Y., Yamaguchi, T. Molecular epidemiological study of feline coronavirus strains in Japan using RT-PCR targeting nsp14 gene. BMC Veterinary Research, 11 (1), art. no. 57, DOI: 10.1186/s12917-015-0372-2. (2015).

Tanaka Y., Sato Y, Takahashi D, Matsumoto H, Sasaki T. Treatment of a case of feline infectious peritonitis with cyclosporin A. Veterinary Record Case Reports. Feb 10. 3:e000134. DOI:10.1136/vetreccr-2014-000134. (2015)

[学会発表](計 5 件)

Cellular Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase Pin1 Facilitates Replication of Feline Coronavirus. Tanaka Y., Sato Y, Sasaki T. June 18, 2016. American Society for Virology annual meeting, Virginia Tech, Virginia, USA

サイクロスポリン製剤によるネコ伝染性腹膜炎治療効果 田中 良和, 松本浩毅, 佐々木 崇 日本獣医学会学術集会講演要旨集 (1347-8621)157 回 Page492(2014.08), 北海道大学(北海道)

ウシヘルペスウイルス 4 型(BHV4)の Bo4、Bo5 蛋白質の機能解析 木村 加奈, 田中 良和, 日本獣医学会学術集会講演要旨集 (1347-8621)157 回 Page415(2014.08), 北海道大学(北海道)

Pin1 阻害剤を用いたネコ伝染性腹膜炎ウイルス複製阻害効果の検討 森崎 将

輝, 田中 良和, 日本獣医学会学術集会講演要旨集 (1347-8621)157 回 Page399(2014.08), 北海道大学(北海道)

ネココロナウイルスにおける nsp14 を標的とした系統解析 松田 亮, 佐々木 崇, 田中 良和, 日本獣医学会学術集会講演要旨集 (1347-8621)157 回 Page399(2014.08), 北海道大学(北海道)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 良和 (TANAKA, Yoshikazu)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号 : 50291159