

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07734

研究課題名(和文) 動物およびヒト由来ノロウイルス、サポウイルスの増殖系確立、改良に向けた研究

研究課題名(英文) Trials to improve and establish animal and human noroviruses and sapoviruses in cultured cells

研究代表者

岡 智一郎(Oka, Tomoichiro)

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：50356242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物およびヒト由来のノロウイルス、サポウイルスについて、複数の培養細胞、各種培養条件における増殖効率の検証を行い、新たな感受性細胞の同定に成功した。ノロウイルス、サポウイルスの多くはウイルスの増殖に胆汁酸の添加が必要であった。ノロウイルス、サポウイルスが属するカリシウイルスについて、分子生物学的手法によるウイルス産出法を確立するためのリプラスミドベースのリバースジェネティクスコンストラクト系の応用にも取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：We tested various cells and culture conditions to grow murine norovirus, human noroviruses, porcine sapovirus, and human sapoviruses to test the possibility of the virus propagation. During the study, an additional porcine sapovirus susceptible cell line was identified. Furthermore, several cells were susceptible for human norovirus or sapoviruses, because of detectable increase of viral RNA levels. Most of these viruses and cells were required bile acid for virus propagation. Plasmid-based reverse genetics constructs were also applied for porcine sapovirus and feline calicivirus as a new molecular tool for virus production.

研究分野：ウイルス学

キーワード：カリシウイルス ノロウイルス サポウイルス リバースジェネティクス 胆汁酸 感受性細胞

1. 研究開始当初の背景

カリシウイルス (ノロウイルス、サポウイルス、ベジウイルス、ラゴウイルス、ネボウイルス等) は、ヒトおよび様々な動物 (ウシ、ブタ、ミンク、イヌ、ネコ、サル、マウス、コウモリ等) から検出されているが、培養細胞での効率的な増殖が可能なウイルスは一部の動物由来株に限られている。これまではネコカリシウイルスに代表されるベジウイルスが広くカリシウイルスの研究に用いられてきたが、最近になってマウスノロウイルスやブタサポウイルスについての基礎的な研究が進み始めた。ヒト由来のノロウイルスについては研究開始当初、海外の研究グループがヒト由来細胞 (Caco-2細胞、B細胞) でウイルスの増殖 (ウイルス核酸の増加) を観察したとの報告があったものの、その再現性が問題となっており、広く研究に使える状況になかった。ヒト由来サポウイルスの増殖系確立については検討そのものの報告がなかった。

2. 研究の目的

ウイルス研究では、まずウイルス増殖が可能な培養細胞を見いだすことが大きなブレークスルーであり、さらにリバーシジェネティクスなどの分子生物学的手法によってウイルスゲノムの機能解析を行う事でさらに研究が進展する。そこで、培養増殖系の存在する動物由来ノロウイルス、サポウイルスについては、その増殖メカニズム検索のための、新たな感受性細胞の検索を行い、さらなる培養増殖条件の至適化の可能性も探る。申請者らが構築したリバーシジェネティクス系についての応用、改良も行う。いまだに培養細胞での増殖が困難なヒト由来ノロウイルス、サポウイルスについては、通常の培養細胞を用いた感受性細胞の検索を行い、最終的に実用的なウイルス増殖系の確立をめざす。

3. 研究の方法

培養増殖系がある動物由来カリシウイルスとしてマウスノロウイルス、ブタサポウイル

スのより効率的な培養条件の検討、増殖が可能な新たな細胞の検索を行った。申請者らがネコカリシウイルスで成功実績のある新たに構築したプラスミドベースのリバーシジェネティクス系をまだ適用例がないブタサポウイルスに応用した。効率的かつ再現性のある増殖系の確立されていないヒト由来のノロウイルスについては既報の感受性細胞も含めた検討を行い、ヒト由来のサポウイルスについては、ウイルス増殖が可能な細胞、培養条件を検索した。ヒト由来ノロウイルス、サポウイルスのウイルス増殖の有無の検証は、すでに分離株が存在し、ウイルス増殖に伴う細胞壊死も明瞭な動物由来のカリシウイルス (ノロウイルス、サポウイルス、ネコカリシウイルス) とは異なり、ウイルス陽性糞便を使用することから特定のウイルス株に限定した検討、ウイルス増殖に伴う細胞壊死の判断が困難であると考えられたため、多様なウイルス株の検出が可能な高精度、高感度なRT-PCR もしくはリアルタイムPCR による培養上清中のウイルスRNA 量の変動によって判定した。

4. 研究成果

培養増殖系のあるブタサポウイルスについて、現在唯一感受性の報告があるブタ腎臓由来細胞 (LLC-PK1 細胞) 以外の、新たなブタ由来の感受性細胞を見出した。マウスノロウイルスの増殖には現在マウスマクロファージ由来細胞 (RAW264.7 細胞) が広く使用されている。今回検討したマウス非マクロファージ由来細胞ではマウスノロウイルスの増殖は認められなかった。これまでに得られた動物由来カリシウイルスの至適培養条件を用いることで、ブタサポウイルス、マウスノロウイルス、ネコカリシウイルスのいずれか、もしくはすべての感染、増殖を阻害する化合物の同定に

もつなげた。

さらに、分子生物学的手法への取り組みとして、我々がネコカリシウイルスの感染性ウイルス産出に成功した EF1 promoter を用いたプラスミドベースのリバースジェネティクス系を他の動物由来カリシウイルスに応用する目的で、同様に作成したブタサポウイルスのリバースジェネティクスコンストラクトをブタ由来腎臓細胞 (LLC-PK1 細胞) に transfect したが、感染性ウイルスの産出を確認できなかったため、この原因を探ったところ、LLC-PK1 細胞では EF1 promoter が機能しないことが示された。そこで、再度成功例のあるネコカリシウイルスについて、別途作製済みの CMV promoter を用いたリバースジェネティクスコンストラクトでも感染性ウイルスが産出できることを見出し、既知および新規に見出したブタサポウイルス感受性細胞での感染性ウイルスの産生を評価している。

ブタサポウイルス感受性細胞はいずれも感染性ウイルスの産出に胆汁酸由来成分が必要であったことから、DNA アレイを用いて胆汁酸添加によって発現が変動する遺伝子を評価した。感染受容体の同定については今後の課題である。

ヒト糞便由来のサポウイルス、ノロウイルスについて、ヒトおよび動物由来細胞における増殖の有無を定性、定量 PCR によって検討し、ノロウイルスについてはヒト腸管由来細胞 (Caco-2 細胞)、およびその他の一部の細胞の特定の培養条件において、ウイルスの増殖 (ウイルス RNA 量の増加) を認めた。サポウイルスについてはノロウイルスの増殖が認められた Caco-2 細胞、培養条件での増殖は確認できなかったが、こちらもその他の細胞でウイルスの増殖 (ウイルス RNA 量の増加) を認めた。ヒト由来のノロウイルス、サポウイルスの培養細胞でのウイルス増殖には胆汁酸成分が必須であった。また、胆汁酸成分

の種類によって増殖促進効果には差が認められた。引き続きこれらのウイルス増殖条件を検討中である。

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 11 件)

Oka T, Stoltzfus GT, Zhu C, Jung K, Wang Q, Saif LJ.

Attempts to grow human noroviruses, a sapovirus, and a bovine norovirus in vitro

PLoS One. 2018 13;13(2):e0178157.

doi: 10.1371/journal.pone.0178157

Oka T, Iritani N, Okada M, Ogawa T, Iizuka S, Tatsumi C, Harada S, Haga K, Doan YH.

First Complete Genome Sequences of Human Sapovirus Strains Classified as GI.3, GI.4, GI.6, GI.7, and GI.7

Genome Announc. 2018 Mar 22;6(12). pii: e00168-18.

doi: 10.1128/genomeA.00168-18.

Oka T, Doan YH, Shimoike T, Haga K,

Takizawa T. First complete genome sequences of genogroup V, genotype 3 porcine sapoviruses: common

5'-terminal genomic feature of sapoviruses

Virus Genes. 2017 Dec;53(6):848-855.

doi: 10.1007/s11262-017-1481-8.

Yokoyama M, Oka T, Takagi H, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Tohya Y, Sato H.

A Proposal for a Structural Model of the Feline Calicivirus Protease Bound to the

Substrate Peptide under Physiological Conditions.

Front Microbiol. 2017 Jul 25;8:1383.

doi: 10.3389/fmicb.2017.01383.

Oka T, Doan YH, Haga K, Mori K, Ogawa T, Yamazaki A.

Genetic Characterization of Rare Genotype GII.5 Sapovirus Strain Detected from a Suspected Food-Borne Gastroenteritis Outbreak among Adults in Japan in 2010.

Jpn J Infect Dis. 2017 Mar

24;70(2):223-224.

doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.468.

Ohba M, Oka T, Ando T, Arahata S, Ikegaya A, Takagi H, Ogo N, Zhu C, Owada K, Kawamori F, Wang Q, Saif LJ, Asai A.

Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses.

J Antibiot (Tokyo). 2017

Apr;70(4):443-447.

doi: 10.1038/ja.2016.128.

Oka T, Lu Z, Phan T, Delwart EL, Saif LJ, Wang Q.

Genetic Characterization and Classification of Human and Animal Sapoviruses.

PLoS One. 2016 May 26;11(5):e0156373.

doi: 10.1371/journal.pone.0156373.

Iritani N, Yamamoto SP, Abe N, Kubo H, Oka T, Kaida A.

Epidemics of GI.2 sapovirus in gastroenteritis outbreaks during 2012-2013 in Osaka City, Japan.

J Med Virol. 2016 Jul;88(7):1187-93.

doi: 10.1002/jmv.24451.

Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, Katayama K, Sakaguchi T, Tohya Y.

Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation.

Vet Microbiol. 2016 Mar 15;185:62-7.

doi: 10.1016/j.vetmic.2016.02.005.

Ohba M, Oka T, Ando T, Arahata S, Ikegaya A, Takagi H, Ogo N, Owada K, Kawamori F, Wang Q, Saif LJ, Asai A.

Discovery and Synthesis of Heterocyclic Carboxamide Derivatives as Potent Anti-norovirus Agents.

Chem Pharm Bull

(Tokyo).2016;64(5):465-75. doi:

10.1248/cpb.c16-00001.

Lu Z, Yokoyama M, Chen N, Oka T, Jung K, Chang KO, Annamalai T, Wang Q, Saif LJ.

Mechanism of Cell Culture Adaptation of an Enteric Calicivirus, the Porcine Sapovirus Cowden Strain.

J Virol. 2015 Nov 18;90(3):1345-58. Print 2016 Feb 1.

doi: 10.1128/JVI.02197-15.

〔学会発表〕(計 7 件)

Oka T, Stoltzfus GT, Zhu C, Jung K, Wang Q, Saif LJ.

Attempts to grow human noroviruses and a sapovirus in vitro

第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017

Oka T.
Molecular epidemiology of human sapoviruses
The 6th International Calicivirus Conference, Savannah, GA, USA, 2016

Ohba M, Oka T, Ando T, Arahata S, Ikegaya A, Takagi H, Ogo N, Owada K, Kawamori F, Wang Q, Saif LJ, Asai A.

Discovery and Synthesis of Heterocyclic Carboxamide Derivatives as Potent Anti-norovirus Agents.

The 6th International Calicivirus Conference, Savannah, GA, USA, 2016

Ohba M, Oka T, Ando T, Arahata S, Ikegaya A, Takagi H, Ogo N, Zhu C, Owada K, Kawamori F, Wang Q, Saif LJ, Asai A. Discovery of novel anti-calicivirus The 3rd International conference on Pharma-Food (ICPF2016), 静岡, 2016

岡 智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸
培養可能なカリシウイルスの新規 plasmid-based リバースジェネティクス系の構築
第 3 9 回日本分子生物学会, 神奈川, 2016

大場舞、岡智一郎、安藤隆幸、荒畑沙織、池ヶ谷朝香、高木弘隆、小郷尚久、小和田和宏、川森文彦、浅井章良
(他) 抗ノロウイルス活性を有する低分子化合物の探索
日本薬学会第 136 年会, 神奈川, 2016

岡智一郎、高木弘隆、横山 勝、小島宏建、岡部 隆義、長野 哲雄、佐藤 裕徳 (筆) ネコカリシウイルスプロテアーゼの基質特徴を有する非ペプチド性低分子化合物の抗ウイルス活性
日本薬学会第 136 年会, 神奈川, 2016

〔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 岡 智一郎
(Oka Tomoichiro)

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：50356242

(2)研究分担者 高木 弘隆
(Takagi Hirotaka)

国立感染症研究所・
バイオセーフティ管理室・研究員
研究者番号：00332362

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()