

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18795

研究課題名(和文) ウイルスゲノムの解析による猫伝染性腹膜炎の遺伝子診断法の確立

研究課題名(英文) Genome analysis of feline coronaviruses for the establishment of genetic diagnosis of feline infectious peritonitis

研究代表者

小熊 圭祐 (OGUMA, Keisuke)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：50436804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では猫の致死的な伝染病である猫伝染性腹膜炎(FIP)の原因となる猫コロナウイルスに着目して研究を行った。猫コロナウイルスにはFIPを起こすFIPウイルスと、軽い下痢程度でとどまる猫腸コロナウイルスの二種類がある。FIPウイルスと猫腸コロナウイルスの病原性の差異は、ウイルス自身が持つ蛋白質の設計図(遺伝子)がわずかに異なることによるとされているため、両ウイルスの遺伝子を比較した。

研究成果の概要(英文)：Feline coronavirus (FCoV) is classified into two types based on its pathogenicity in cats: a feline enteric coronavirus (FECV) causing mild diarrhea and a feline infectious peritonitis (FIP) virus (FIPV) that is lethal. The difference of FECV and FIPV has been considered to be attributed to the discrepancy of one or more of viral genes. It had been discovered that about 95% FIPVs had a mutation at specific position in the S gene of FCoV. Therefore, some commercial veterinary laboratories have offered the tests for the diagnosis of FIP through the analysis of S gene sequence to distinguish FIPVs from FECVs in the clinical specimens. Another candidate is 3c gene, which has been reported to have one or more mutations in more than 60% FIPVs. Because the relationship between the mutation of S and 3c genes was not well studied, we analysed these genes of FCoVs detected in clinical specimens such as ascites, tissues, and feces of cats.

研究分野：動物感染症学

キーワード：猫コロナウイルス ウイルスゲノム 変異解析 遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

猫伝染性腹膜炎 (Feline infectious peritonitis: FIP) は、猫コロナウイルスを原因とし、腹水や胸水の貯留や、内臓における肉芽腫性炎などを示し、ほぼ全症例が死に至る猫の感染症である。猫コロナウイルス感染症は多くが下痢や症状を呈さない不顕性感染に終わり、その原因は猫腸コロナウイルスと呼ばれる病原性の低い生物型の猫コロナウイルスによる。しかし、猫腸コロナウイルスに感染した猫のうち、数%程度の猫が FIP を発症すると考えられており、FIP を起こす生物型の猫コロナウイルスが FIP ウイルスと呼ばれている。既報の研究から、低病原性の猫腸コロナウイルスと、致死的な FIP ウイルスは元は同一とされており、猫腸コロナウイルスの遺伝子が猫体内で変異し、それによるウイルス蛋白の性状や活性の変化が、猫腸コロナウイルスから FIP ウイルスへの生物型の変化に関与すると考えられている。しかし、猫コロナウイルスが持つ遺伝子のうちのいずれがウイルスの病原性の変化に関与しているかは明らかになっていない。本研究を開始した時点で、一部の研究ではウイルス遺伝子のうち、構造蛋白の一つであるスパイク蛋白を規定する S 遺伝子の特定部位が約 95% の FIP ウイルスで変異していることが報告されていた。また、非構造蛋白と考えられている 3c 遺伝子が 60% 以上の FIP ウイルスで変異していることが報告され、3c 蛋白の機能が変化または喪失していることが示唆されていた。

FIP の診断は病理組織学的な検査が確定診断に必要なとされているが、FIP を疑う猫から生前に組織を採取し検査することは稀であり、行う場合は死後であることがほとんどである。そのため、多くの動物病院では腹水の貯留や、超音波検査などによる臓器病変の存在などから FIP を診断している。また、一部の民間検査会社では、ウイルスの S 遺伝子における変異の有無からウイルスの生物型を推定する検査サービスを提供しているが、その感度や特異性について検討を要する点もあった。すなわち、本研究の背景として、FIP ウイルス発生のために必要なウイルスゲノムの変化を、猫腸コロナウイルスとの比較解析と蛋白質の性状の変化に基づく研究から明らかにすることが必要と考えた。ウイルス蛋白の性状の変化につながるウイルス遺伝子の変異を詳細に解析することにより、猫腸コロナウイルスと FIP ウイルスを、ウイルスゲノムの塩基配列の解析から遺伝学的に鑑別する研究につなげることを考慮し、本研究の申請を行った。

2. 研究の目的

本研究では現在病理組織学的な解析が確定診断に必要な FIP を、腹水や血液などに含まれる猫コロナウイルスの遺伝子解析から診断するための基盤知見を得ることを目的

としていた。研究開始当時から現在に至るまで、民間の検査会社ではウイルスの S 遺伝子の解析から FIP ウイルスであるかどうかの鑑別を行うサービスを提供している。しかし、本検査が FIP ウイルスと判別する根拠は、約 95% の FIP ウイルスに S 遺伝子の変異が認められるということであり、変異によるアミノ酸の変化がウイルスの増殖性や病原性にどのような影響を及ぼすかは不明なままである。また、残りの 5% のウイルスが FIP ウイルスではないという判断は、特に腹水などの FIP を強く疑う症状を示す場合は困難である。そのため、本研究では臨床検体から検出した猫コロナウイルスのゲノムを解析し、FIP ウイルスに比較的特異的と考えられる遺伝子変異がウイルス蛋白の性状に及ぼす影響を解析するための基盤となる知見を得ることを主目的としている。この実験で得られる知見はウイルス蛋白の性状変化の解析につながることができ、その実験結果を根拠とする FIP の遺伝学的診断の開発に資するものである。

3. 研究の方法

本研究では主に民間の動物病院に来院した FIP を疑う猫の検体と、自治体が運営している動物保護施設に収容されている猫の糞便検体を使用した。福岡県獣医師会所属の動物病院や他の地域の病院の協力を得て、主に腹水や胸水、糞便の他、一部の死亡猫から解剖により得られた組織の提供も受けることができた。猫コロナウイルスはプラス鎖 RNA をゲノムとするウイルスであるため、得られた検体から RNA を抽出し、相補 DNA を合成してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により猫コロナウイルスの遺伝子断片を増幅して、その塩基配列を解析した。腹水や糞便懸濁液などの液状検体からの RNA 抽出には、QIAGEN 社の QIAamp Viral RNA Mini Kit、またはニッポンジーン社の ISOGEN-LS を使用した。組織の RNA は組織片をニッポンジーン社の ISOGEN 試薬中で QIAGEN 社の TissueRuptor Disposal probe により破碎し抽出した。相補 DNA 合成には TAKARA BIO 社の PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit を使用した。

(1) S 遺伝子、3c 遺伝子、7 遺伝子群の解析

解析対象とした遺伝子は猫コロナウイルスが持つ 11 種類の遺伝子の内、スパイク蛋白を規定する S 遺伝子、3c 蛋白および 7a 蛋白、7b 蛋白をそれぞれ規定する 3c 遺伝子、7a 遺伝子、7b 遺伝子である。増幅に使用するプライマーは、既報のものと同様に設計したものを使用した。DNA ポリメラーゼとして Promega 社の GoTaq を使用し、94 °C・2 分の熱変性の後に、94 °C・30 秒、50 °C・30 秒、72 °C・45 秒を 50 サイクル行い、最終の熱変性として 72 °C・7 分を 1 回行った。Nested PCR を行う場合は、同じ温度・時間およびサイクル数で実施した。PCR 産物は 2%

アガロースゲル中で電気泳動し、疑わしい増幅産物を切り出して核酸を精製し、塩基配列を解析した。塩基配列の解析試薬および機器として、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer をそれぞれ使用した。

S 遺伝子の解析では、Chang らが 2012 年に報告した、血清型 型のウイルスにおけるコドン 1,058 とコドン 1,060 を対象とし、コドン 1,058 ではメチオニンがロイシンに置換される変異、コドン 1,060 ではセリンがアラニンに置換される変異の有無を解析した (Chang et al., *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1089-1095, 2012)。型ウイルスはスパイク蛋白のアミノ酸配列が型ウイルスと異なるため、本解析の対象外である。

3c 遺伝子は既報の数点の論文で、塩基の欠失などによるフレームシフトやナンセンス変異により、3c 蛋白が短縮する、または蛋白の産生が失われる変異が報告されている (Chang et al., *J. Gen. Virol.* 91: 415-420, 2010)。そのため、多くのウイルス株で 714 塩基から構成される 3c 遺伝子の翻訳領域全塩基配列を増幅する PCR を行い、塩基配列を解析した。

7 遺伝子群は 7a 遺伝子および 7b 遺伝子から構成される。どちらも解析の報告が少ないものの、これまでにインターフェロンの抗ウイルス作用を抑制することなどが示唆されているため、本研究で解析した。3c 遺伝子と同様に 7a 遺伝子と 7b 遺伝子を含む領域を PCR で増幅し、その塩基配列を解析した。

(2) 次世代シーケンサーによるウイルスゲノムの解析

本研究では次世代シーケンサーによるウイルスゲノムの解析を申請研究内容に含めている。猫コロナウイルスの 1 本鎖 RNA ゲノムは約 30,000 塩基長であり、一般的なキャピラリー式のシーケンサーでは数百塩基から一千塩基弱しか一度に読めず、ゲノム全体の解析に時間を要する。そこで、次世代シーケンサーを使用し、猫腸コロナウイルスと FIP ウイルスのゲノムを比較して、その差異を具体的な実験対象の候補遺伝子領域とする研究を検討した。猫腸コロナウイルスから FIP ウイルスが発生すると考えられているため、同一猫に由来する検体を使用することを考えた。概要としては、糞便中の猫腸コロナウイルスと、腹水などに含まれる FIP ウイルスのゲノムから、逆転写 PCR によりゲノム全長をカバーするように約 4,000~6,000 塩基ずつ増幅し、その増幅産物を混合して塩基配列を次世代シーケンサーで解析して比較する。次世代シーケンスは本研究の申請書に記載のとおり外部業者に委託した。研究期間中に収集した動物病院からの臨床検体の内、糞便と腹水または胸水などの体腔滲出液の両方から猫コロナウイルスが検出されたものを使用した。

(3) 猫コロナウイルス分離のための培養細胞の樹立

猫コロナウイルスには血清型が型と型の2種類が存在し、それぞれの血清型に猫腸コロナウイルスと FIP ウイルスが存在する。

型のウイルスは猫コロナウイルス感染症の約 90% を占めているとされる。型のウイルスが細胞に感染する際の受容体は Aminopeptidase N とされており、培養細胞による分離が可能である。一方、型のウイルスは培養細胞による分離が困難で、ウイルスに対する細胞の受容体の詳細は不明であるが、CD209 が受容体として働く可能性が示唆されている (Regan et al., *J. Virol.* 82: 11992-11996, 2008)。猫コロナウイルス感染の大部分を占める型ウイルスの研究にはウイルス分離が必要であるが、現在までに効率よく分離できる細胞株は発見も樹立もされていない。そこで、本研究では CD209 を安定的に発現する細胞株を作製する実験を行った。まず、幼齢猫の組織由来 RNA から CD209 の翻訳領域全塩基配列を逆転写 PCR で増幅し、蛋白発現ベクターに組み込んだ。本ベクターを猫の培養細胞の一つである fcwf-4 細胞に遺伝子導入試薬を使用して導入し、G418 存在下で約 2 週間培養後にシャーレに形成されたコロニーを形成した細胞を分取してウエスタンブロット法にて CD209 蛋白の産生を確認する実験を行った。

4. 研究成果

(1) S 遺伝子、3c 遺伝子、7 遺伝子群の解析

平成 29 年度末までに得られた動物病院に来院した 98 頭の猫の症例の内、約 60 症例では猫コロナウイルスの遺伝子が明瞭に検出され、それらについてウイルス遺伝子の解析を進めている。これらのうち、査読付きの学術雑誌に掲載が決定した S 遺伝子および 3c 遺伝子の実験結果の一部は次のとおりである。

S 遺伝子のコドン 1,058 および 1,060 の解析

神奈川県動物保護センターに収容されていた猫から糞便を採取し、逆転写 PCR を行って 19 頭の糞便から型のウイルスを検出した。これらの猫は外見上は健常または軽度の下痢を呈していた。また、動物病院に来院した約 100 頭の猫の内、40 頭の猫から得た 53 検体から猫コロナウイルスを検出した。このうち、38 頭の症例猫からは血清型型のウイルス、2 頭からは型のウイルスを検出することができた。ウイルスの血清型の判別は、血清型を区別可能なプライマーによる PCR で増幅される S 遺伝子の断片長、または増幅断片の塩基配列解析により決定した。

神奈川県動物保護センターに収容されている 19 頭の猫の糞便から検出されたウイルスの S 遺伝子は、いずれもコドン 1,058 がメ

チオニン、1,060 がセリンであり、他のアミノ酸への置換を示すウイルスは認められなかった。

動物病院に来院し FIP と診断された 30 頭の猫から採取された腹水および胸水中のウイルスでは、内 93.3% に当たる 28 頭の検体のウイルスにおいて同コドンのアミノ酸の変化につながる変異が生じており、残り 2 例では変異は認められなかった。また、これらの猫のうち、14 頭の糞便検体中のウイルスの 71.4% に当たる 10 例では同部位のアミノ酸の置換は認められず、残りの 4 例では置換が認められた。

3c 遺伝子の解析

血清型 型のウイルスについて特定のコドン解析対象とした S 遺伝子とは異なり、3c 遺伝子は 型のウイルスも含め、翻訳領域全塩基配列を解析し、3c 蛋白の短縮や産生の消失につながる変異を解析した。

神奈川県動物保護センターの 19 頭の猫の糞便から検出された 型ウイルスのうち、18 例 (94.7%) では 3c 蛋白の短縮を起こす変異は認められなかった。1 例では 1 アミノ酸分の短縮につながる 3 塩基の欠失が認められた。

動物病院から得た体腔滲出液の内、 型ウイルスを含む 30 例では、26 例 (86.7%) で 3c 遺伝子の変異が認められ、4 例では認められなかった。本研究では 型ウイルスを含む滲出液が 2 頭の猫から得られ、両例で 3c 遺伝子の変異が認められた。

FIP を疑う症例猫の糞便では、 型ウイルス 14 例の内 10 例 (71.4%) では変異が無く、4 例では変異が認められた。

S 遺伝子と 3c 遺伝子の変異の関係

既報の文献の多くは S 遺伝子や 3c 遺伝子の変異を別個に報告している。しかし、両遺伝子の変異の関係性についての研究は少ないため、本研究で解析を行った。

神奈川県動物保護センターの非 FIP 猫の糞便から検出された 19 株の 型ウイルスでは、S 遺伝子の変異は全例で認められず、3c 遺伝子は 1 例で変異が認められた。

動物病院で FIP と診断された猫の体腔滲出液中の 30 株の 型ウイルスでは、S 遺伝子の変異が認められたものが 4 例 (13.3%)、3c 遺伝子の変異が認められたものが 2 例 (6.7%) であり、残りの 24 例 (80.0%) では S 遺伝子と 3c 遺伝子の両方に変異が生じていた。

FIP を疑う猫の糞便 14 例では、両遺伝子に変異がなかったものは 10 例 (71.4%) であったが、残りの 4 例は S 遺伝子と 3c 遺伝子のどちらも変異していた。

死亡した 4 頭の猫から剖検にて得られた 6 種類の組織から検出された 型ウイルスは、S 遺伝子および 3c 遺伝子の両方に変異が生じていた。

以上の結果から、非 FIP 猫の糞便中の 型猫コロナウイルスの大部分は S 遺伝子および 3c 遺伝子に変異は無いと考えられる。しかし、3c 遺伝子に変異を持ち、FIP には罹患していないと考えられる動物保護センター収容猫の糞便中ウイルスの病原性は不明であり、猫への感染実験などで解析する必要があると考えられる。また、胸水・腹水中の猫コロナウイルスは、その多くが S 遺伝子および 3c 遺伝子の両方に変異を持つと考えられるが、一部のウイルスは片方の遺伝子のみが変異し、どちらも変異していないものは検出されなかった。したがって、ウイルスの増殖性や細胞親和性の変化などに、これらの遺伝子の変異が関与している可能性が考えられる。また、本結果から 2 種類以上のウイルス遺伝子に変異が段階的に蓄積し、それに伴ってウイルスの性状が多段階に変化してゆくと思われている。

S 遺伝子の解析結果の一部は平成 28 年 9 月に開催された第 159 回日本獣医学会学術総会 (於: 日本大学生物資源科学部) で発表した。また、S 遺伝子および 3c 遺伝子の解析結果は Journal of Veterinary Medical Science 誌への掲載が決定している。

7 遺伝子群の解析

多くのウイルス株で 303 塩基長の 7a 遺伝子と、618 塩基長の 7b 遺伝子からなる 7 遺伝子群の解析では、動物保護センターの猫の糞便中ウイルス 19 例と、FIP を疑う猫の滲出液 25 例および糞便中ウイルス 7 例を使用した。以上の全 51 検体を解析した結果、7a 蛋白の短縮につながる変異は糞便で 2/26 例 (7.7%)、滲出液で 3/25 例 (12.0%) 認められた。同じく 7b 蛋白では糞便で 10/26 例 (38.5%)、滲出液で 6/25 例 (24.0%) 認められた。

アミノ酸組成の解析では、7a 遺伝子はコドン 9 とコドン 47 においてアミノ酸の変化につながる塩基の非同義置換が多く、この部位のアミノ酸組成はウイルス株間で多様性に富むことが明らかとなった。7b は特に N 末端から 30 アミノ酸残基の間に多様性に富む部分が認められた。両蛋白の性状および機能はほとんど未知であるため、今後も研究を続ける。7 遺伝子群の解析結果の一部は平成 29 年 9 月に開催された第 160 回日本獣医学会学術総会 (於: 鹿児島大学) で発表した。

(2) 次世代シーケンサーによるウイルスゲノムの解析

次世代シーケンサーを使用した解析に使用する 3 検体の糞便から検出した 型のウイルスからは、PCR により数千塩基対程度ずつの増幅産物がゲノム全体をカバーするよう得られた。一方、同一猫の腹水や胸水からは一千~二千塩基対程度の増幅産物は得られたものの、数千塩基対の増幅産物は解析を検討したいずれの検体からも得られなかった。そのため、本研究ではまず 3 例の糞便検

体のみを次世代シーケンス業者に提出した。その結果、約 28,000 塩基長、22,000 塩基長、18,000 塩基長のゲノム塩基配列を明らかにすることができた。体腔滲出液から PCR による長鎖の増幅ができなかった理由として、糞便と比較しウイルス量が少ないこと、ウイルスゲノムが増殖細胞内や細胞外で短鎖に断片化し、PCR での増幅が困難なことなどが可能性として考えられる。したがって、特に型ウイルスを解析対処とする場合は、効率よくウイルスを分離できる培養細胞細胞の樹立が必要である。

(3) 猫コロナウイルス分離のための培養細胞の樹立

幼齢猫の組織からクローニングした CD209 を挿入した蛋白発現ベクターを導入した猫の fcwf-4 細胞を、G418 存在下で約 2 週間培養した結果、ベクター上のネオマイシン耐性遺伝子の働きで生残するコロニーが多数形成された。これらを分取して培養し、蛋白を抽出してウエスタンブロットにより CD209 蛋白と融合させた FLAG ペプチド配列に対する抗体で検出を行った。その結果、安定的に CD209 を高発現する細胞が数株得られたことが判明した。現在、型猫コロナウイルス株の一種の Yayoi 株などを使用し、ウイルスの感染性や増殖性を解析中である。型ウイルスの分離用細胞として使用可能であれば、これまでに得た滲出液からウイルス分離を試み、次世代シーケンサーによる解析を行う。

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1件)

Oguma K., Ohno M., Yoshida M., Sentsui H. Mutation of the S and 3c genes in genomes of feline coronaviruses. J. Vet. Med. Sci. 80: in press (2018).
(査読付き)

[学会発表](計2件)

安達友, 小熊圭祐, 泉對博: 猫コロナウイルスの 7 遺伝子群の変異解析. 第 160 回日本獣医学会学術集会 (演題番号 DVO-65, 2017 年 9 月 15 日(金), 鹿児島大学)

大野恵, 小熊圭祐, 泉對博: 猫伝染性腹膜炎のスパイク遺伝子の変異解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (演題番号 DVO-72, 2016 年 9 月 8 日(木), 日本大学)

[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
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~sentsui/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小熊 圭祐 (OGUMA, Keisuke)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号: 50436804