

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08802

研究課題名(和文) エボラウイルスの初期標的細胞と病原性発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) determination of early target cells of ebola virus

研究代表者

津田 祥美 (TSUDA, YOSHIMI)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：70447051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではエボラウイルス病の病原性発現メカニズムを明らかにするため、エボラウイルスの初期標的細胞を同定を目的とした。マウスに致死病的病原性を示すマウス順化株を腹腔内感染し、経時的に腹腔内より採取した細胞を解析した結果、その多くがマクロファージ細胞であることがわかった。さらにマウス腹腔内において最初にlarge peritoneal macrophages (LPM)に感染し、LPMの減少に伴い増加したsmall peritoneal macrophagesが感染していた。感染局所における標的細胞での効果的な増殖がその後の病態へ大きく影響することを示す結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エボラウイルス病はヒトやサルに重篤な出血熱を引き起こす人獣共通感染症である。2014年の大規模なアウトブレイク以後、ワクチンや治療薬の開発が進んでいるが、有効な治療薬や的確な対症療法の開発のための病原性の解明は喫緊の課題である。本研究の成果は、エボラウイルスが感染局所において初期標的細胞とされていたマクロファージや樹状細胞へどの様に感染し増殖、伝播するかを示す結果であり、今後の治療法開発などに非常に重要な知見を与えるものとなると期待される。

研究成果の概要(英文)：Macrophages, monocytes and dendritic cells are the primary targets for Ebola virus (EBOV) infection and roles for important trigger of immune response in EBOV disease. To analyze the first target cells of EBOV, we evaluated the virus propagation in the peritoneal cavity in mice model that inoculated with mouse-adapted EBOV by intraperitoneal route. Cells collected from peritoneal cavity of infected mice were analyzed cell types by flow cytometry. Most of MAEBOV infected cells were identified as the large peritoneal macrophages (LPMs) and then infected small peritoneal macrophages (SPMs) population increased over time. These results suggested that virus replication in first target cells at the infected site is a important factor for EBOV pathogenicity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 感染細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エボラウイルスはヒトやサルに感染して重篤な出血熱を引き起こす。1976年に発見されて以来、中央アフリカを中心に度々小規模なアウトブレイクが報告されていたが、2014年、西アフリカでこれまでにない大規模なアウトブレイクが発生した。多くの医療関係者へも感染し周辺国や欧米への輸入感染も報告されるなど国際的に大きな問題となった。エボラウイルスには認可されたワクチンや治療法は存在せず、いくつかの動物実験で効果、安全性が確認されたワクチン候補が、臨床試験を兼ねて未認可で使用されることとなった。エボラウイルス病はアフリカなど流行地域での対策とともに、バイオテロ対策としても対応が求められることから、有効な治療薬や治療法の開発は重要であり、その基盤となる病原性の解明は喫緊の課題である。

エボラウイルスに感染すると免疫抑制傾向、全身性炎症反応に加えて血液凝固系の破綻を起こし、全身性ショックにより死に至る。これまでにエボラウイルスの主要標的細胞はマクロファージや樹状細胞などの単核性食細胞系であることがいくつかの報告により示唆されている。しかしながら、宿主に侵入したエボラウイルスが実際に初めに感染しているのがマクロファージや樹状細胞なのか、マクロファージや樹状細胞への感染が致死病的病態にどのような意味を持つのかは不明である。申請者はエボラウイルスの致死病的病原性におけるマクロファージや樹状細胞での増殖の重要性に着目し、これまでに組換えウイルスを用いた解析を行ってきた。本課題ではエボラウイルスの初期感染細胞を同定し、宿主に侵入したエボラウイルスの特定細胞への指向性と、感染に伴って誘導される宿主応答を明らかにすることを目的として解析を行う。

### 2. 研究の目的

エボラウイルス病はヒトやサルに重篤な出血熱を引き起こす人獣共通感染症である。エボラウイルスの主要標的細胞はマクロファージや樹状細胞であると言われているが、エボラウイルスが感染した宿主体内で実際に初めにマクロファージや樹状細胞で増殖しているのか、また致死病的病態にどのように関与しているのかは未だ不明である。本研究ではエボラウイルス病の病原性発現メカニズムを明らかにするために、エボラウイルスの初期標的細胞を同定し、感染により誘導される病態形成に重要な宿主応答を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

エボラウイルスの主要標的細胞は免疫細胞であるマクロファージや樹状細胞であるとの報告があることから、これまでの研究において作出したmicroRNAのターゲティングを利用してマクロファージや樹状細胞特異的に増殖が抑制された組換えエボラウイルスを用いて、親株とウイルス感染細胞を比較することとした。マウスに致死病的病原性を示すマウス馴化株、およびマクロファージや樹状細胞特異的に増殖が抑制された組換えウイルス(増殖抑制株)を実験感染した。ウイルス接種部位である腹腔内より感染細胞を採取し、初期感染細胞をフローサイトメトリーを用いて同定し、ウイルス接種部位におけるウイルス増殖を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 初期感染細胞の同定

エボラウイルスはヒトとサルにのみ致死病的病原性を示すウイルスである。そのためマウスなどの齧歯類をモデル動物として使用するために、それぞれに馴化させ病原性を示すようになった馴化株が研究に用いられている。エボラウイルスのマウス馴化株はマウスに対して腹腔内投与の場合に致死病的病態を示すことが報告されている。すなわち、マウスモデルにおいては腹腔内細胞がエボラウイルスの初期感染細胞であることが推察される。そこでマウス馴化株をマウスに腹腔内投与し、経時的に腹腔内細胞を回収して、各種細胞のウイルス感染をフローサイトメトリー法およびウイルス学的力価測定により調べた。

マウス馴化株を感受性マウスに腹腔内投与すると、感染3日目頃から体重減少などの病態を示し、感染後約6-8日で死に至る。そこで感染後1、3、5日目に腹腔洗浄液を回収し、洗浄液中に

含まれる腹腔内細胞を回収した。まず回収した細胞数を比較したところ、感染3日目以降に非感染対照群と比較して細胞数が増加していることがわかった。次に、回収した細胞をウイルス抗原である抗VP40抗体およびマクロファージや単球を含む、T細胞、B細胞、好酸球、樹状細胞などの細胞マーカーもしくは抗体と反応させ、フローサイトメトリーにより感染細胞の種類を同定した。感染1日後では一部のマウスでごくわずかに感染細胞が検出されたのみであったが、感染3日後、5日後には腹腔内細胞の半数以上に感染が広がっていることがわかった。フローサイトメトリーにより感染細胞を同定したところ、その多くがマクロファージ細胞であることが確認された。

## (2) マクロファージや樹状細胞特異的に増殖が抑制されたウイルスとの比較

次に、マウス馴化株とマクロファージや樹状細胞に多く発現する microRNA のターゲット配列を組み込むことでマクロファージや樹状細胞での増殖が抑制された組換えウイルス(増殖抑制株)の腹腔内細胞でのウイルス感染を比較した。培養細胞を用いた In vitro 増殖試験において、増殖抑制株は親株と比較して約 1 log 程度ウイルス増殖が低下していることを確認している。マウスの腹腔内においても、増殖抑制株はマウス馴化株と比較して増殖が抑制されていることが確認された。採取された腹腔内細胞を解析した結果、マウスの腹腔内においてエボラウイルスは最初に large peritoneal macrophages(LPMs)に感染し、LPMs の消失に伴い感染した small peritoneal macrophages(SPMs)が増加していることがわかった(図:マウス馴化株)。

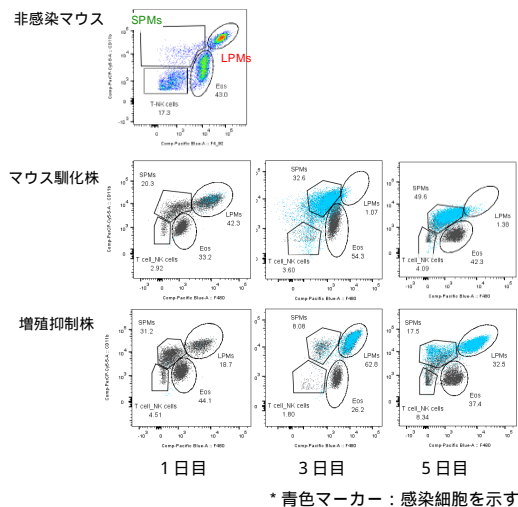


図 マウス腹腔内におけるエボラウイルス感染細胞

マウスの腹腔内では、由来の異なる LPMs と SPMs が存在し、感染や LPS などによる炎症刺激により、LPMs の消失とともに、SPMs の腹腔内への流入することで SPMs が増加し炎症性単球の主役となることが報告されている。エボラウイルス感染においても同様に、感染した LPMs が消失するとともに新たに増加した SPMs と推察される単球が標的細胞となり効率よく増加していることが示唆された。

一方で、増殖抑制株を感染させたマウスでは、感染5日目においても LPMs に感染が確認された。また感染した SPMs の増加もマウス馴化株に比べて少ないことがわかった。これらの結果より、マウスモデルにおける致死的病態には感染局所における効率的なウイルス複製と感染マクロファージの増加が重要である可能性が示唆された(図:増殖抑制株)。

マウスモデルと異なり、ヒトやサルへの感染は主にウイルスを含む体液の接触感染であり、感染局所における免疫担当細胞は異なることが推察される。しかしながら、本研究は感染局所における標的細胞での効率的な増殖がその後の病態へ大きく影響する可能性を示唆する重要な知見を示した。今後は他の接種方法における感染局所のウイルス増殖、および感染細胞についても解析を試みたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tsuda Y, Yamaoka S, Weisend C, Meade-White K, Banadyga L, Takada A, Arikawa J, Ebihara H
2. 発表標題 Replication in macrophages is a key factor for lethal outcome of Ebola virus infection
3. 学会等名 8th International Symposium on Filoviruses (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	吉田 玲子  (YOSHIDA REIKO)  (80435966)	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教    (10101)	