

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03924

研究課題名(和文) グリカンの揺らぎを標的にした新規レトロウイルスワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a Novel Retroviral Vaccine Targeting Glycan Fluctuations

研究代表者

宮沢 孝幸 (Miyazawa, Takayuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80282705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ネコ白血病ウイルス(feline leukemia virus: FeLV)は猫に免疫不全や白血病を引き起こす。猫はFeLV感染後数年でほとんどが死に至るため、FeLV感染症は獣医临床上大きな問題となっている。FeLVに対するワクチンは90年代から市販されているものの感染防御能は低い。感染防御能の低さは、ワクチンが中和抗体を誘導しにくいことによるが、その原因はFeLVの外被糖タンパク質のグリカン(糖鎖)にある。本研究ではグリカンによって隠されていた中和エピトープを露出させたシュードタイプウイルスを作製することに成功した。本研究により、感染防御能の高いFeLVワクチンの開発に道を拓いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネコ白血病ウイルス(FeLV)は猫に免疫不全や白血病を引き起こし獣医領域で大きな問題となっている。FeLVに対するワクチンは90年代から市販されているものの感染防御能は低い。本研究では隠されていた中和エピトープを露出させたシュードタイプウイルスを作製することに成功した。本研究により、感染防御能の高いFeLVワクチンの開発に道を拓いた。本研究成果は他のウイルスにも応用可能であり、効率良いワクチンの開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Feline leukemia virus (FeLV) is a feline leukemia virus (FELV) that affects cats with immune deficiency and it causes leukemia. Because most cats die within a few years of FeLV infection, FeLV infection is a major veterinary clinical problem and vaccines against FeLV have been available on the market since the 1990s, but they offer poor protection against infection. The poor protection against infection is due to the vaccine's difficulty in inducing neutralizing antibodies to FeLV. It is located in the glycan (glycans) of the outer coat glycoprotein. In this study, a pseudotypic virus that exposes a neutralizing epitope hidden by glycans. The researchers succeeded in producing a vaccine for FeLV. This study paved the way for the development of a FeLV vaccine with high protection against infection.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ネコ 白血病 レトロウイルス ネコ白血病ウイルス ワクチン グリカン コアラ コアラレトロウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ネコ白血病ウイルス (FeLV) はウシ白血病ウイルスやヒト免疫不全ウイルスと同じくレトロウイルス科に分類されるウイルスである。猫が FeLV に感染すると、多くは持続性ウイルス血症となり、唾液や糞便に大量にウイルスを排出、接触感染により感染が拡大する。持続性ウイルス血症を呈した猫のほとんどは、およそ 4 から 6 年で、免疫不全、貧血、リンパ腫、白血病などを呈して死亡する。そのため、FeLV は小動物獣医臨床上もっとも怖れられている感染症の一つである。

一般にレトロウイルスに対するワクチンは開発が困難であり、ヒトや家畜においては FeLV 以外にはワクチンは市販されていない。FeLV に関しては、1975 年に試作ワクチン (不活化ワクチン) が開発、一定の有効性が確認され<sup>1)</sup>、1985 年にアメリカで初の FeLV ワクチンが認可された。国内においても 1996 年に販売が開始された。ところが現行の FeLV ワクチンは感染を完全に防御する効力は低く、ワクチンの効能も、血中ウイルス量を低くとどめる「持続性ウイルス血症」の抑制、すなわち発症率の低下を謳ったものにとどまっている。さらにワクチン接種率の低さから、国内での FeLV の感染率は上昇傾向にあり、現在では国内平均でおよそ 10%、地域によっては 30% を超える感染率に達し、危機的状況に陥っている。

ワクチンにより中和抗体が誘導された猫の個体の血清をワクチン非接種猫に移入すると、FeLV に対する感染防御効果がみられることから<sup>2)</sup>、ワクチンにより中和抗体が誘導されれば、感染防御効果は十分に期待できると考えられる。ところが、現行のワクチンを接種した猫では中和抗体が検出されない場合が多く、検出されても抗体価がごく低くとどまっている。その主な原因は、FeLV のエンベロープタンパク質 (Env) がグリカン (糖鎖) に覆われていることにある。グリカンは自己成分と同一であるために抗原性はなく、基本的に免疫系に認識されない。そのため FeLV に対する中和抗体は誘導されにくい。

### 2. 研究の目的

FeLV は猫に免疫不全や白血病を引き起こす。猫は FeLV 感染後数年でほとんどが死に至るため、FeLV 感染症は獣医臨床上大きな問題となっている。FeLV に対するワクチンは 90 年代から市販されているものの感染防御能は低く、ワクチン接種率の低さと相俟って、国内の猫の FeLV 感染率は上昇し続けている。感染防御能の低さは、ワクチンが中和抗体を誘導しにくいことによるが、その原因は FeLV の外被糖タンパク質上のグリカン (糖鎖) にある。本研究ではグリカンによって隠された中和エピトープを露出させたシュードタイプウイルスを作製し、感染防御効果の高い FeLV ワクチンを作出する。本研究成果は FeLV ワクチンのみならず、広く伴侶動物や家畜、ヒトのレトロウイルスのワクチン開発に寄与する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞

本研究で使用した細胞はすべて、動物用細胞培養液 (Dulbecco's modified Eagle's medium) に 10% のウシ胎児血清、100 µg/ml のストレプトマイシンと 100 U/ml のペニシリンを加えた溶液で培養した。また細胞はすべて炭酸ガス培養器内で培養した。炭酸ガス培養器内の気体は二酸化炭素が全体の 5% で、庫内の温度は 37°C に保った。

#### (2) ゲノム DNA の採取

FeLV 感染 HEK293 細胞を QIAamp DNA Blood Mini Kit により細胞のゲノム DNA を精製した。

#### (3) FeLV F8701 株の感染性クローンの作製

本実験では FeLV F8701 株を使用した。また感染性分子クローンの作製にあたり、その方法について Miyazawa らの方法<sup>3)</sup>に従った。F8701 株感染細胞のゲノム DNA から F8701 株のプロウイルス DNA を PCR 法で増幅させるために、Watanabe らの 2013 年の先行研究<sup>4)</sup>で使用された clone33 (GenBank accession No. AB060732) を基にプライマーを設計した (図 1A)。PCR のプライマーは 5' half 側の DNA について 5' half Fw、5' half Rv、3' half 側の DNA について、3' half Fw、3' half Rv を用いた。PCR について、溶液の全量を 25 µl とし (表 1B) 条件については表 1-C の通りである。PCR はサーマルサイクラー (C1000: バイオラッドラボラトリー社製) で行った。二種類の PCR 産物 (FeLV F8701 株の 5' half 側のゲノム DNA と 3' half 側のゲノム DNA) は pSP73 ベクター (プロメガ) に組み込んだ。その後二種のプラスミドを組み合わせることで、プロウイルス型 DNA に組換えた。制限酵素処理後のクローニングには、ライゲーション・ハイ (東洋紡) を使用し、ライゲーション反応は東洋紡が推奨するプロトコールに従った。

#### (4) PCR 産物の組み込みの確認

プロウイルス型 DNA に組換えたプラスミドを大腸菌に導入し、Mini Prep を行うことで、大腸菌内で増幅したプラスミドの精製を行った。その後、制限酵素処理を行った後、電気泳動により、DNA 長を確認することで、F8701 株全長の DNA 導入を確認した。使用した制限酵素は *EcoRI*、*BamHI*、*HindIII*、*XbaI*、*PvuII* (NEB) である。

#### (5) プラスミドの細胞への導入

方法 4 で精製を行ったプラスミドについて、感染性と増殖性を調べた。まず、HEK293T/LacZ 細胞 (LacZ 遺伝子が導入されたヒト胎児腎細胞) に Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションは Thermo Fisher Scientific のプロトコール通りに使用した (図 2A)。プラスミド導入から一週間後、0.45  $\mu\text{m}$  径のメンブレンフィルター (PALL) で培地上清をろ過し、HEK293 細胞にろ過した上清を接種した。接種した細胞は Sakaguchi ら<sup>5)</sup>の方法に基づき 2 日後に X-Gal 染色を行った。また、方法 6 で培養上清を接種した。

#### (6) 上清接種

方法 5 で培養上清を接種した HEK293 細胞 (ウイルス接種後 2 日) から培養上清を回収し、ろ過を行った後、HEK293T/LacZ 細胞に再度接種した。上清接種を行った細胞はその後、2 週間 37°C の炭酸ガス培養器内で培養した。その後、培養上清を、0.45  $\mu\text{m}$  径のメンブレンフィルターでろ過し、HEK293 細胞に接種した (図 3A)。

#### (7) LacZ マーカーレスキューアッセイ

LacZ マーカーレスキューアッセイは、Sakaguchi ら<sup>5)</sup>の方法に従った。培養上清接種前日に、標的細胞である HEK293 細胞を、96 穴プレートに 1 穴につき  $2.0 \times 10^5$  個撒いた。翌日に、方法 5、6 の通りに培地上清を接種した。上清接種から 2 日後、プレート内の細胞に 5 プロモ 4 クロロ 3 インドリル B-D-ガラクトピラノサイト (X-Gal) を添加した。X-Gal 添加 2 時間後に、LacZ マーカーの有無を顕微鏡下で確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) PCR

PCR を行った結果、3' half 側で約 3kbp の PCR 産物、5' half 側で約 6kbp の PCR 産物が得られた。FeLV F8701 株の 3' half 側、5' half 側の PCR 産物をプラスミド pSP73 に組み、DNA 組換えによりプロウイルス DNA 型に組換えた。

#### (2) 目的遺伝子の組み込み

プロウイルス DNA 型の FeLV F8701 株全長 cDNA を組み込んだプラスミドについて、制限酵素 *Hind*III、*Eco*RI、*Xba*I、*Pvu*I、*Bam*HI で制限酵素処理を行った結果、FeLV のプロウイルス DNA の全長が導入できたと考えられるプラスミドが 11 クローン得られ、それぞれ pSPFeLV(F8701) clone #1-#11 と命名した。

#### (3) 感染性の確認

結果 2 で得られた 11 種類のプラスミドクローンについて、感染性を確認した。方法 5、7 を行った結果、11 クローンすべてで感染性を確認出来た。また陰性対照としてウイルス粒子の入っていない培地上清を HEK293 細胞に接種し、同様に X-Gal 染色を行った結果、非特異的な染色反応は確認されなかった (図 2B)。

#### (4) 増殖性の確認

結果 3 で感染性を確認した clone#1-#11 について、その増殖性を確認した。方法 6、7 を行った結果、感染性を確認したすべての pSPFeLV(F8701)クローンにおいて、ウイルスの増殖が確認できた。また結果 3 と同様に、非特異的な染色反応は確認されなかった (図 3B)。

本研究では、作製した 11 個の pSPFeLV(F8701)クローンの感染性ならびに増殖性を確認できた。このことから、FeLV F8701 株の感染性分子クローンの作製に成功したと結論づけられた。

一般的に FeLV-A はネコ以外の細胞には感染せず、同種指向性であるとされてきたが、現在は同種指向性でなく、異種細胞にも感染することが Nakata らの先行研究<sup>6)</sup>などで示されている。本研究でも、FeLV F8701 株はネコ由来の細胞のみならず、ヒト由来細胞 (HEK293 細胞) にも感染することが分かった。FeLV F8701 株は FeLV-A であると Nakamura らの 2010 年の先行研究で示されているが、FeLV F8701 株が FeLV-A であると断定できない<sup>7)</sup>。Nakamura らの研究では、FeLV F8701 株に感染した FEA 細胞に対し、FeLV-A、-B、-C シュードタイプウイルスを接種し、FeLV F8701 株を FeLV-A と結論づけたが<sup>7)</sup>、FeLV-A、-B、-C に感染した FEA 細胞 (ネコ由来細胞) に FeLV F8701 株を接種する実験を行っていない。この場合、FeLV F8701 株が FeLV-A の受容体である THTR-1 を介して FEA 細胞に感染するウイルスを含むことは明らかであるが、それ以外の受容体も同様に利用して、細胞に感染していないとは断言できない。宮沢の 2009 年の報告<sup>8)</sup>によると、FeLV は生体内で感染する場合、FeLV-A の単独感染は見られるが、FeLV-B、-C の単独感染は見られず、感染が起こる場合、必ず FeLV-A との混合感染が見られる、とある。そのため、FeLV F8701 株が FeLV-A と FeLV-B、-C 以外のウイルス株との混合感染が起きた生体から分離されていた場合、本実験で作製された感染性分子クローンは FeLV-A の感染性分子クローンのみならず、FeLV-A、-B、-C 以外のサブグループに属する感染性分子クローンを作製している可能性がある。Shalev らの 2009 年の報告<sup>9)</sup>によると、FeLV-A と FeLV-C のキメラ分離株 (FY981 株) が存在している。Shalev らによるとこのキメラ分離株が、THTR-1 のみならず、FeLV-C の受

容体である FLVCR1 もしくは FLVCR2 の受容体を利用して細胞に感染している。今後、本研究で作製された 11 種の感染性分子クローンについて、干渉試験や発現クローニング法を駆使して、受容体の解析を行いたい。

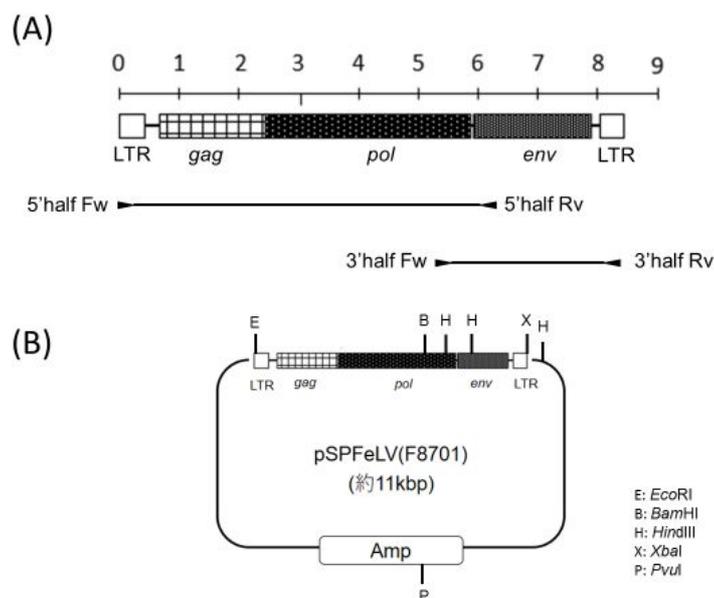


図1 PCRについて

- (A) FeLV F8701 株の全ゲノム長とプライマーの位置  
 (B) 得られると予想されるプラスミド産物

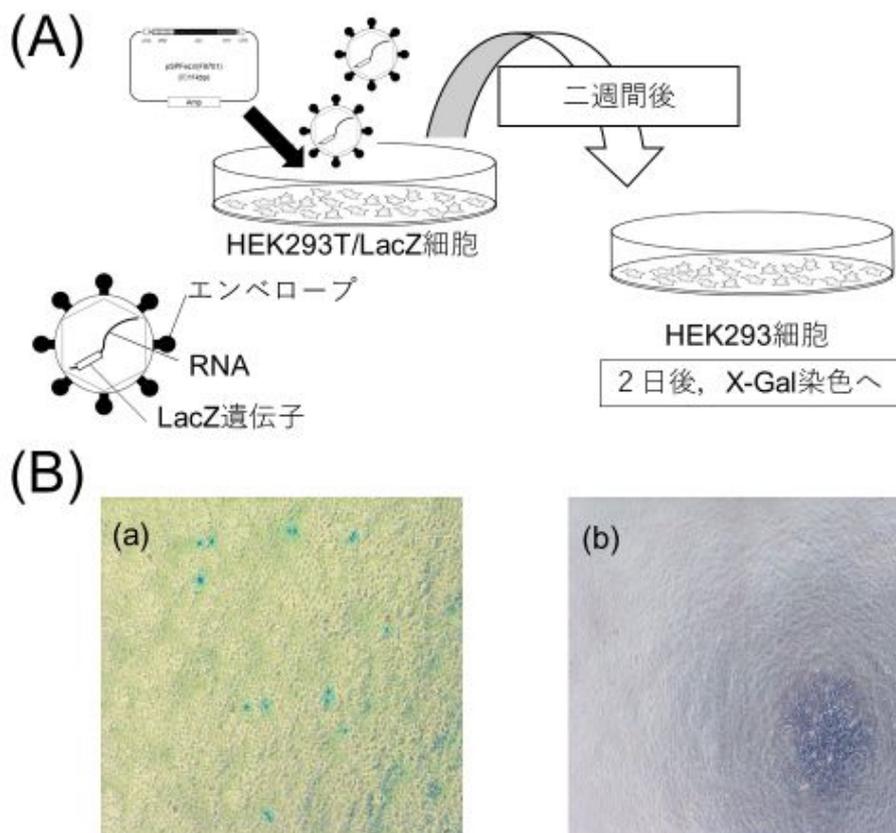
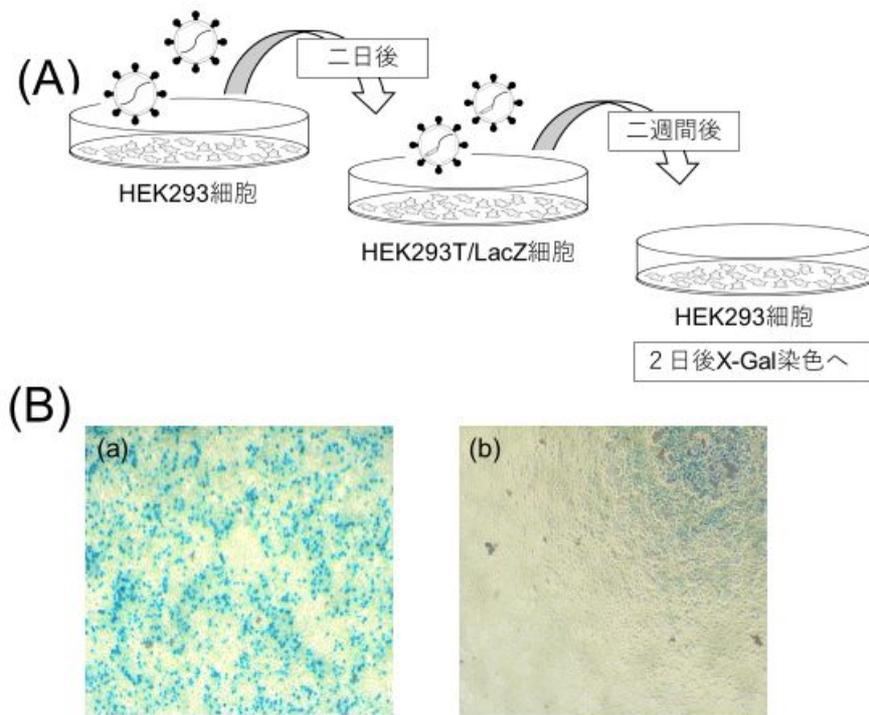


図2 pSPFeLV(F8701)の感染性の確認

- (A) pSPFeLV(F8701)を HEK293T/LacZ 細胞にトランスフェクション法にて導入、培養上清を回収した後 HEK293 細胞に接種した。2 日後に X-Gal で染色し、感染を LacZ マーカーレスキューアッセイで確認した。  
 (B) LacZ マーカーレスキューアッセイ後の顕微鏡写真。(a) は pSPFeLV(F8701)を HEK293T/LacZ 細胞にトランスフェクションした上清を接種したもの。(b) は上清中にウイルス粒子が入っていない陰性対照。



**図3** pSPFeLV(F8701)の増殖性の確認  
**(A)** HEK293 細胞に pSPFeLV(F8701)由来ウイルスを接種した後、上清中のウイルス粒子を回収した。その後、回収した培養上清を HEK293T/LacZ 細胞に接種し、さらにその上清を HEK293 細胞に接種した。  
**(B)** HEK293 細胞における LacZ マーカーレスクューアッセイ。(a) は FeLV F8701 株を接種したもの。(b) はウイルス粒子が入っていない培地上清を接種したもの(陰性対照)。

#### 参考文献

- 1) W. Jarrett, O. Jarrett, L. Mackey, H. Laird, C. Hood, and D. Hay. (1975) Vaccination against feline leukaemia virus using a cell membrane antigen system. *Int. J. Cancer*. 16: 134-141.
- 2) E. A. Hoover, J. P. Schaller, L. E. Mathes, and R. G. Olsen. (1977) Passive immunity to feline leukemia: evaluation of immunity from dams naturally infected and experimentally vaccinated. *Infect. Immun.* 16: 54-59.
- 3) T. Miyazawa, M. Fukakusa, A. Hasegawa, N. Maki, K. Ikuta, E. Takahashi, M. Hayami, and T. Mikami. (1991) Molecular cloning of a novel iso-late of feline immunodeficiency virus biologically and genetically different from the original U.S. isolate. *J. Virol.* 65: 1572-1577.
- 4) S. Watanabe, M. Kawamura, Y. Odahara, Y. Anai, H. Ochi, S. Nakagawa, E. Yasuyuki, H. Tsujimoto, and K. Nishigaki. (2013) Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus *env* gene. *PLoS ONE* 8: 0061009.
- 5) S. Sakaguchi, M. Okada, T. Shojima, T., K. Baba, and T. Miyazawa. (2008) Establishment of a LacZ marker res-cue assay to detect infectious RD114 virus. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 785-790.
- 6) R. Nakata, T. Miyazawa, Y. Shin, R. Watanabe, T. Mikami T., and Y. Matsuura. (2003) Reevaluation of host ranges of feline leukemia virus subgroups. *Microbes Infect.* 5: 947-950.
- 7) M. Nakamura, E. Sato, T. Miura, K. Baba, T., Shimoda, and T. Miyazawa. (2010) Differential diagnosis of feline leukemia virus subgroups using pseudotype viruses expressing green fluorescent protein. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 787-790.
- 8) 宮沢孝幸 (2009) 動物由来レトロウイルスの受容体 ウイルス 59: 223-242.
- 9) Z. Shalev, S. P. Duffy, K. Adema, W. Prasad, R. N. Hussain, W. J. Brian, and C. S. Tailor. (2009) Identification of a feline leukemia virus variant that can use THTR1, FLVCR1, and FLVCR2 for infection. *J. Virol.* 83: 6706-6716.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakurai Toshihiro, Nakagawa So, Bai Hanako, Bai Rulan, Kusama Kazuya, Ideta Atsushi, Aoyagi Yoshito, Kaneko Kazuyuki, Iga Kosuke, Yasuda Jiro, Miyazawa Takayuki, Imakawa Kazuhiko	4. 巻 474
2. 論文標題 Novel endogenous retrovirus-derived transcript expressed in the bovine placenta is regulated by WNT signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 3499 ~ 3512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20170531	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koide Rie, Yoshikawa Rokusuke, Okamoto Munehiro, Sakaguchi Shoichi, Suzuki Juri, Isa Tadashi, Nakagawa So, Sakawaki Hiromi, Miura Tomoyuki, Miyazawa Takayuki	4. 巻 100
2. 論文標題 Experimental infection of Japanese macaques with simian retrovirus 5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 266 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001199	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitao Koichi, Tanikaga Takamasa, Miyazawa Takayuki	4. 巻 100
2. 論文標題 Identification of a post-transcriptional regulatory element in the human endogenous retroviral syncytin-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 662 ~ 668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001238	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakaguchi Shoichi, Nakagawa So, Mitsuhashi Satomi, Ogawa Makoto, Sugiyama Kazutoshi, Tamukai Kenichi, Koide Rie, Katayama Yukie, Nakano Takashi, Makino Shinji, Imanishi Tadashi, Miyazawa Takayuki, Mizutani Tetsuya	4. 巻 165
2. 論文標題 Molecular characterization of feline paramyxovirus in Japanese cat populations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 413 ~ 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-019-04480-x	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto-Gotoh Akira, Kitao Koichi, Miyazawa Takayuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Persistent Infection of Simian Foamy Virus Derived from the Japanese Macaque Leads to the High-Level Expression of microRNA that Resembles the miR-1 microRNA Precursor Family	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME19130	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto-Gotoh Akira, Yoshikawa Rokusuke, Nakagawa So, Okamoto Munehiro, Miyazawa Takayuki	4. 巻 734
2. 論文標題 Phylogenetic analyses reveal that simian foamy virus isolated from Japanese Yakushima macaques ( <i>Macaca fuscata yakui</i> ) is distinct from most of Japanese Hondo macaques ( <i>Macaca fuscata fuscata</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144382 ~ 144382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2020.144382	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 司悠真、宮沢孝幸
2. 発表標題 猫白血病ウイルスのフェレット由来細胞への感染性及び増殖可能性
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金村優香、宮沢孝幸
2. 発表標題 コアラレトロウイルスサブグループBの分子クローンの作製とその性状解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金村優香、山浦瑞樹、小出りえ、宮沢孝幸
2. 発表標題 細胞増殖を抑制する猫白血病ウイルスF8701株の感染性分子クローンの作製
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金村優香、山浦瑞樹、小出りえ、宮沢孝幸
2. 発表標題 ネコ白血病ウイルスF8701株の受容体解析：新規受容体サブグループの可能性
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017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
研究分担者	上田 真保子  (Ueda Mahoko)  (60760353)	東海大学・マイクロ・ナノ研究開発センター・特定研究員   (32644)	
研究分担者	入江 崇  (Irie Takashi)  (70419498)	広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授   (15401)	