

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07587

研究課題名(和文) エボラ出血熱の発症の分子基盤に関する研究

研究課題名(英文) Molecular mechanism of Ebola virus disease

研究代表者

津田 祥美 (Tsuda, Yoshimi)

長崎大学・高度感染症研究センター・准教授

研究者番号：70447051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの解析により、主要標的細胞とされるマクロファージなどでのウイルス増殖を抑制した組換えエボラウイルスは、マウスモデルにおいて病原性が減弱するなど、感染初期におけるマクロファージでのウイルス増殖の重要性を示した。本課題では、マクロファージや樹状細胞に加えて標的臓器でのウイルス増殖と致死的病態との関連性を解析することを目的とし、肝臓での発現が報告されているmicroRNAに対応する遺伝子配列を組み込んだ組換えエボラウイルスの作出を試みた。作出された組換えウイルスを用いて親株とのウイルス増殖を比較した結果、標的となるmicroRNAを発現した細胞において増殖が抑制されていることが確認された。

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、有効な治療薬や適切な治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、エボラウイルスの標的細胞とされていたマクロファージの感染初期におけるウイルス増殖がその後の致死的病態に重要であることを示すとともに、エボラウイルスの病態の中でも特にウイルス増殖の多い肝細胞での、ウイルス増殖の役割について解析するツールの可能性を示すなど、今後のエボラウイルスの解析に重要な知見を得るものとなった。

研究成果の概要(英文)：Cells such as macrophages and dendritic cells as well as hepatocytes are important targets for Ebola virus (EBOV) infection. However, the pathobiological significance of EBOV replication to these cells is remaining unclear. Cellular tropism of viruses can be engineered through the insertion of cell-specific target sequences for microRNA in the viral genome. Using this mechanism, we generated recombinant mouse-adapted EBOV possessing a microRNA-target sequence (maEBOVt). In the previous study we demonstrated maEBOVt possessing microRNA-target sequence that mainly express in cells of the mononuclear phagocyte system showed significantly attenuated pathogenicity in infected mice. In this study, we focus on the hepatocyte and generated maEBOVt possessing microRNA-target sequence that mainly express in the hepatocyte. That rescued virus showed attenuated virus replication in cells expressing target microRNA.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 病原性

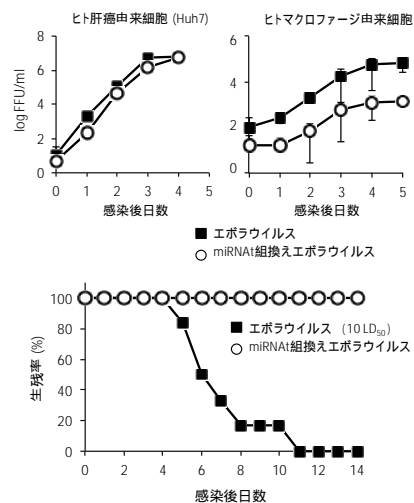
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルスはヒトや類人猿に、重篤な出血熱を引き起こす。これまでエボラ出血熱は中央アフリカを中心に小規模のアウトブレイクを度々発生していたが、2014年に西アフリカのギニア、リベリア、シエラレオネを中心に大規模なアウトブレイクが発生した。その後も小規模なアウトブレイクが発生しており、2018年にコンゴ民主共和国で発生したアウトブレイクでは、2014年に次いで多くの感染者が報告された。エボラ出血熱を含むフィロウイルス感染症には当時は認可されたワクチンや治療法は存在せず、2014年のアウトブレイクでは、研究段階であったワクチン、治療薬が試験的に使用された。一方で、完治したはずの患者体内に持続感染していたウイルスが感染源となったケースや、また、コンゴ民主共和国で発生したアウトブレイクでは、発生地域の治安上の問題から医療関係者の十分な介入が難しいなど、感染地域では2014年にも試用されたワクチンを用いた試験的リングワクチンも実施されたにも関わらず収束が難しい事態が続いた。このような状況にも対応していくためには、ワクチン開発とともに感染症発生後に対処するための、治療薬や適切な治療法の開発は、喫緊の課題である。感染病態に見合った治療薬や適切な治療法の開発のためには、まずターゲットとなる病原性の解明が重要となることから、本課題では、エボラウイルスの主要標的細胞の役割に着目し解析を行うこととした。

2. 研究の目的

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。エボラウイルスの主要標的細胞が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はこれまでも示されていた。しかしながら、マクロファージや樹状細胞で増殖したウイルスがどのエボラウイルス感染の致死的病態にどのような役割を果たしているか、また致死的病態にどのように関与しているのかは不明であった。申請者はこれまでに、エボラウイルスの致死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、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ウイルスを作出し、ウイルス感染におけるマクロファージや樹状細胞でのウイルス増殖と宿主応答について解析した。その結果、マクロファージでのエボラウイルスの初期増殖がその後の宿主応答や重篤な病態に重要である可能性を示唆する結果が得られた(右図)。



一方で、これまでの感染動物による解析などからエボラウイルスの主要標的臓器である肝臓でのウイルス増殖や宿主応答が病態に重要であることが示唆されていた。我々の解析でも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の感染でも死亡するマウスが確認されるなど、マクロファージでの感染初期増殖は重要であるが、同時にその他の因子の重要性も示唆された。さらにマクロファージで増殖したウイルスがどのように標的臓器に感染し、宿主因子を誘導しているかについても不明である。そこで本課題では、高いウイルス増殖が観察され、重篤な病変の観察される主要標的臓器に着目し、マクロファージや樹状細胞特異的に増殖が抑制さ

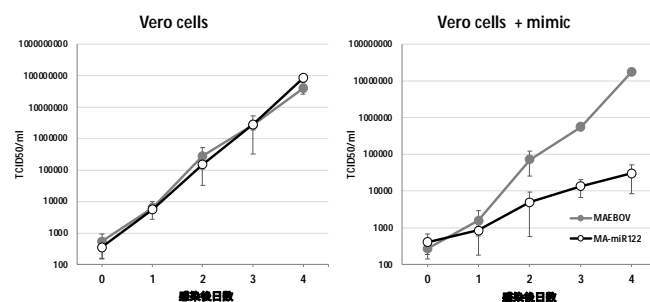
れたウイルスだけでなく、細胞特異的に増殖を抑制したウイルスを作出し、これらの細胞および臓器でのウイルス増殖が病態発症にどのように関わっているのか解析することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでにマクロファージや樹状細胞で主に発現する miRNA 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ウイルス増殖を抑制した組換えエボラウイルス、げっ歯類の致死病的病原性に必須の遺伝子変異をそれぞれ組み込んだ組換えエボラウイルスを作出してきた。そこでこの技術を応用し、肝細胞に発現している miRNA122 に対する配列を組み込んだウイルスの作出を試みた。また、C 型肝炎ウイルスの研究などにより汎用されている肝癌細胞株の多くは実際の臓器と異なり miRNA122 の発現が低いことが報告されている。そこで、培養細胞では miRNA-mimic(内在性の成熟 miRNA を模倣した 2 本鎖 RNA 分子)をトランスフェクションにより導入した細胞などを用いることにより組換えウイルスの性状解析を行った。

4. 研究成果

これまでの解析により、マクロファージや樹状細胞でのウイルス増殖を抑制するために、マクロファージや樹状細胞で発現する miRNA のターゲット配列を組み込んだエボラウイルスを感染させたマウスにおいて、病原性が減弱することが確認された。また、感染細胞について詳細に解析したところ、miRNA のターゲット配列を組み込んだエボラウイルスの感染では、エボラウイルスの感染部位である腹腔内マクロファージでのウイルス増殖は、感染初期には抑制されるものの、遅れて感染が広がっていることが確認された。一方で、重要な標的臓器である肝臓では、miRNA のターゲット配列を組み込んだエボラウイルスの感染は、コントロールウイルスと比較して、感染後期においても感染が抑制されていることがわかった。そこで、まず肝臓で発現することが報告されている microRNA122 を、肝細胞でのウイルス増殖抑制のターゲット候補とし、microRNA122 に対応する遺伝子配列を組み込んだ組換えエボラウイルスの作出を試みた。本研究では、マウスモデルを用いた感染実験を想定し、マウス純化株を用いたウイルスの作出を試み、親株と同様に増殖するウイルスの作出が確認された。続いて、作出したウイルスが、実際に増殖抑制されているか培養細胞を用いて検証した。Vero細胞とVero細胞にmicroRNA122の miRNA-mimicを発現させた細胞に、microRNA122のターゲットとなる配列を組み込んだウイルス(MA-miR122)、コントロールとして親株のマウス順化型エボラウイルス(MAEBOV)、および前述のマクロファージに発現する miRNA のターゲット配列を組み込んだウイルスをそれぞれ感染させて、経時的にウイルス増殖を解析した。その結果、microRNA122 に対応する遺伝子配列を組み込んだエボラウイルス(MA-miR122)は、microRNA122の miRNA-mimicを発現したVero細胞で増殖が抑制される傾向にあることが確認された(右図)。一方で、コントロールウイルスは、共にどちらの細胞でも同様の増殖曲線を示し、microRNA122発現細胞得意



的にウイルス増殖が抑制されていることが示唆された。今後は作出した組換えウイルスを用いてマウスなどの実験動物でのウイルス増殖と病原性について、解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	森松 組子 (吉松組子) (Morimatsu Kumiko) (90220722)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	国立衛生研究所ロッキーマウンテン研究所		