

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月4日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22380161
 研究課題名（和文） インフルエンザ抵抗性ブタの開発モデルとしての可溶性 Siglec 発現マウスの作出
 研究課題名（英文） Generation of transgenic mice expressing soluble forms of Siglecs as a model for influenza-resistant pigs
 研究代表者
 小野 悦郎（ONO ETSURO）
 九州大学・医学研究院・教授
 研究者番号：00160903

研究成果の概要（和文）：新型インフルエンザウイルスの産生場所として重要なブタに生まれながらにインフルエンザウイルス感染抵抗性を付与すること目的に、インフルエンザウイルスの細胞への吸着とウイルスの放出を阻害することが期待される可溶性シアル酸結合蛋白を培養細胞に発現させることで細胞にインフルエンザウイルス感染抵抗性を付与することに成功したが、可溶性シアル酸結合蛋白を発現するよう作製したマウスでは感染抵抗性を付与することができなかった。

研究成果の概要（英文）：To confer the antiviral potential against influenza virus to pigs as a mixing vessel for creating a “new” influenza virus, we investigated the ability of Siglecs to inhibit influenza virus infection *in vitro* and *in vivo* by using Madin-Derby canine kidney (MDCK) cells and transgenic mice expressing a soluble form of human Siglec molecules. The transformed MDCK cells showed a significant resistance, but not the transgenic mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：インフルエンザ、トランスジェニックマウス、ウイルス、抗病性動物、Siglec、感染症

1. 研究開始当初の背景

これまでに出現した新型インフルエンザウイルスは、カモの腸内ウイルスが家禽を経て、あるいは、さらにブタの呼吸器でヒトのウイルスの遺伝子を獲得した遺伝子再集合体であると考えられている。現実には、東南アジアでは、ブタとアヒルを同じ場所で飼育す

る農家が多く、インフルエンザウイルスの遺伝子再集合体を生じやすい環境にある。このように開発途上国等の地域においては、家禽が屋外飼育されており外部環境からのウイルスの侵入を防御できないこと、さらに家禽、ブタとヒトが密接に接触しながら生活していることなどがあり、新型インフルエンザ対

策を困難にしていると考えられる。現在も猛威を奮っている H1N1 亜型の豚インフルエンザは、正にインフルエンザウイルスの mixing vessel として重要なブタで産生され、メキシコから急速に世界中に拡散した。新型インフルエンザウイルス対策の重要性が叫ばれて久しいが、野生のカモがすべての HA と NA 亜型のインフルエンザウイルスを保有し、常に家禽へ導入される環境がある限り、カモ→アヒル（家禽）→ブタ→ヒトの新型ウイルスの導入経路を断つことは不可能である。

このような背景のもと、近代的な施設で衛生的に家禽やブタを飼育管理することが困難な地域においては、生まれながらに抵抗性を付与されたブタの導入が最も有効であるという着想に至った。インフルエンザウイルスのブタにおけるレセプターはガラクトースに $\alpha 2-3$ あるいは $\alpha 2-6$ 結合するシアル酸であり、この両方に結合するシアル酸結合レクチンに着目した。即ち、可溶性シアル酸結合レクチンを動物に発現させることで、インフルエンザウイルスの HA による細胞への吸着と NA によるウイルスの放出を阻害することで動物に抵抗性を付与できるという仮説を立てた。これを証明するために、本研究を開始した。

2. 研究の目的

新型インフルエンザウイルス対策は、人類にとって最重要課題である。しかし、カモ→アヒル（家禽）→ブタ→ヒトの新型ウイルスの導入経路を断つことは不可能である。この導入経路を遮断するには、インフルエンザウイルスの mixing vessel として重要なブタに生まれながらに抵抗性を付与することが最も有効であるという着想に至った。本研究の最終目的は、インフルエンザ抵抗性ブタの開発であるが、今回の計画では、その基礎的研究として、抵抗性遺伝子（可溶性シアル酸結合レクチン遺伝子）を導入することで、トランスジェニックマウスにインフルエンザウイルス感染抵抗性を付与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 可溶性 Siglec 発現細胞のインフルエンザウイルスに対する感染抵抗性の解析

①可溶性 Siglec 遺伝子

インフルエンザウイルスのレセプターである $\alpha 2-3$ および $\alpha 2-6$ でガラクトースに結合するシアル酸の両方に結合するシアル酸結合レクチンのヒト Siglec5 及び Siglec9 の細胞外ドメインとヒト IgG の Fc 領域のそれぞれの cDNA 断片を結合させ、可溶性シアル酸結合レクチン cDNA を構築した。プロモーターにはニワトリの β -アクチンプロモーター (CAG) を使用し、ネオマイシン耐性遺伝子

を選択マーカーとする可溶性シアル酸結合レクチン発現プラスミドを構築した。

②可溶性 Siglec 発現細胞

可溶性 Siglec5 を発現するプラスミドを MDCK 細胞に導入し、G418 で遺伝子が導入された細胞株を選択樹立した。各細胞株について可溶性 Siglec5 の発現をウエスタンブロットで確認し、発現量の多い細胞株をウイルス抵抗性試験に使用した。可溶性 Siglec9 についても、同様に樹立した可溶性 Siglec9 発現細胞株を使用した。

③可溶性 Siglec 発現細胞の感染抵抗性の検討

樹立した細胞株に高病原性の H5N1 型ウイルスを含む抗原亜型の異なる複数のウイルス株を感染させ、各抗原亜型に対する細胞の抵抗性について検討した。

(2) 可溶性 Siglec 発現トランスジェニックマウスの作製と系統化

可溶性 Siglec 発現細胞の樹立に使用したプラスミドから transgene として用いる DNA 断片を精製し、C57BL/6 マウス受精卵前核にマイクロインジェクション法で注入し、トランスジェニックマウスを作製した。導入遺伝子の確認は、マウス尾から抽出した DNA を用いて PCR で確認した。また、遺伝子発現はマウス血清を用いて、ウエスタンブロット解析で確認した。野生型マウスと交配し、導入遺伝子が子孫マウスに伝達されることを確認して、可溶性 Siglec5 及び可溶性 Siglec 9 発現トランスジェニックマウスを系統化した。

(3) 可溶性 Siglec 発現トランスジェニックマウスの感染抵抗性の検討

高病原性 H5N1 型ウイルスおよびマウスが感受性を示す H1N1 型ウイルスを使用し、これらウイルスを鼻腔内接種した。マウスの生死によって、感染抵抗性について検討した。

(4) トランスジェニックマウスの表現型解析

一般状態の観察、解剖学的、組織学的並びに病理学的解析を行った。可溶性 Siglec 発現の組織特異性は、免疫組織染色で行った。また、免疫学的機能解析で、マクロファージの鈍機能、脾臓細胞の増殖、T リンパ球サブセットマーカー発現について解析した。

(5) 可溶性 Siglec9 発現トランスジェニックマウスの腫瘍細胞増殖抵抗性

上皮性癌患者の生体内でムチンは、未熟樹状細胞に発現する Siglec9 と結合し、IL-12 の産性能を抑制することで、癌細胞の腫瘍免疫からの回避に機能することが報告されている。可溶性 Siglec9 が腫瘍細胞のムチンに結合

することにより、ムチンの腫瘍免疫回避機能を抑制する可能性を検討するため、MM46-MUC1腫瘍細胞を可溶性Siglec9発現トランスジェニックマウスに移植し、マウスの生死によって、腫瘍細胞増殖抵抗性について検討した。

4. 研究成果

(1) 可溶性 Siglec 発現細胞のインフルエンザウイルスに対する感染抵抗性の解析

インフルエンザウイルスのレセプターである $\alpha 2-3$ および $\alpha 2-6$ でガラクトースに結合するシアル酸の両方に結合するシアル酸結合レクチンのヒト Siglec 5 及び Siglec 9 の細胞外ドメインとヒト IgG の Fc 領域のそれぞれの cDNA 断片を結合させた Siglec 5 及び Siglec 9 の可溶性分子発現細胞 (可溶性 Siglec 発現細胞) を用いて、H1N1、H3N2 および H5N3 の抗原亜型の異なるインフルエンザウイルスに対する抵抗性について検討し、抗原亜型に関係なく広く A 型インフルエンザウイルス感染に抵抗することを明らかにした (図 1)。

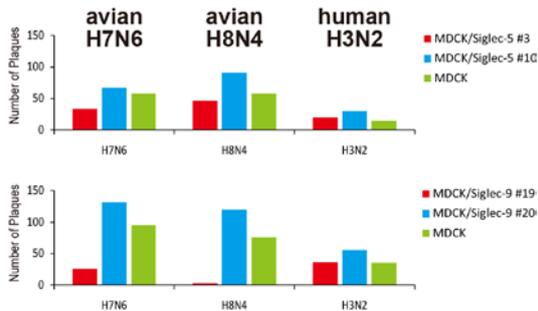


図 1. 可溶性 Siglec 発現細胞の異なる亜型ウイルスに対する感染抵抗性

また、可溶性 Siglec5 及び Siglec 9 発現細胞は、国内で分離した高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 型) を感染させた場合にも抵抗性を示した (図 2)。

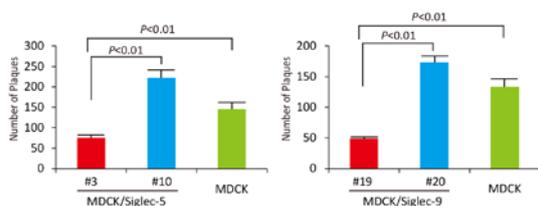


図 2. 高病原性 H5N1 型ウイルスに対する可溶性 Siglec 発現細胞の感染抵抗性

(2) 可溶性 Siglec 発現トランスジェニックマウスの作製と系統化

可溶性 Siglec 発現細胞の樹立に使用したプラスミドから transgene として用いる DNA 断片を精製し、C57BL/6 マウス受精卵前核にマイクロインジェクション法で注入し、トランスジェニックマウスを作製した。可溶性

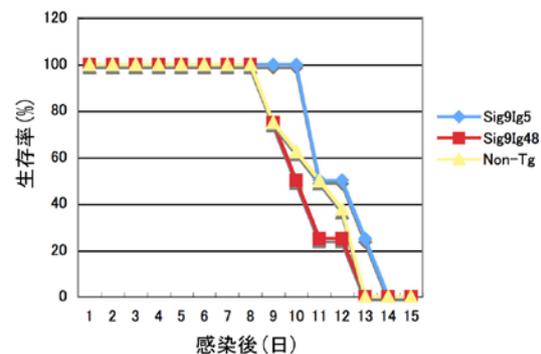
Siglec5 遺伝子導入マウスは、9 系統作出され、そのうち 8 系統で明らかに可溶性 Siglec5 の発現がウェスタンブロット解析で確認された。また、可溶性 Siglec 9 遺伝子導入マウスは、5 系統作出され、そのうち 3 系統で発現が確認された。最終的に、可溶性 Siglec5 発現トランスジェニックマウスについては、5 系統、可溶性 Siglec 9 発現トランスジェニックマウスについても、3 系統の系統化に成功した。

(3) 可溶性 Siglec 発現トランスジェニックマウスの感染抵抗性

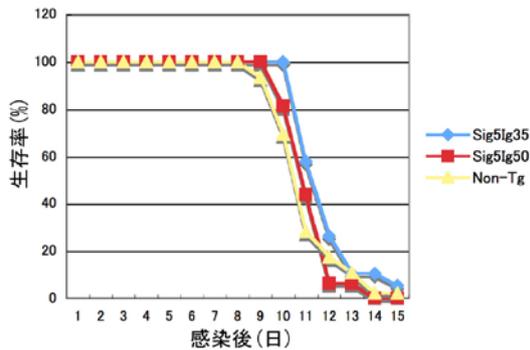
可溶性 Siglec 9 発現トランスジェニックマウスで血液中への発現量が高い 2 系統について、高病原性トリインフルエンザウイルスである A/mountain hawk-eagle/Kumamoto/1/07 (H5N1) 株 (16 および 1.6pfu/匹) および A/Duck/Vietnam/G12/08 (H5N1) 株 (75pfu/匹) を用いて感染実験を実施したが、何れの株に対しても感染抵抗性は示されなかった。

可溶性 Siglec5 発現トランスジェニックマウス 3 で、血液中への発現量が高い 2 系統について、同様に高病原性トリインフルエンザウイルスを用いて感染実験を実施したが、A/mountain hawk-eagle/Kumamoto/1/07 株 (16 および 1.6pfu/匹) および A/Duck/Vietnam/G12/08 株 (75pfu/匹) に対しても感染抵抗性は示されなかった。

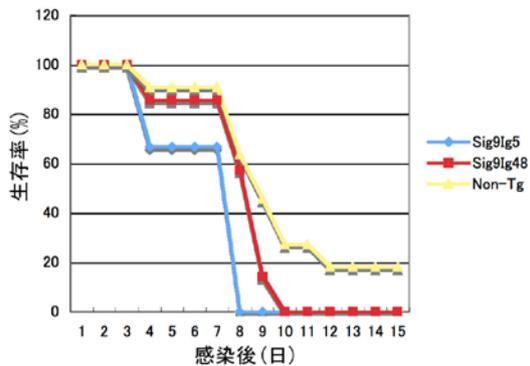
また、マウス順応株でマウスを死亡させる A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) に対しても感染抵抗性は示されなかった。代表的な結果を図 3 に示す。



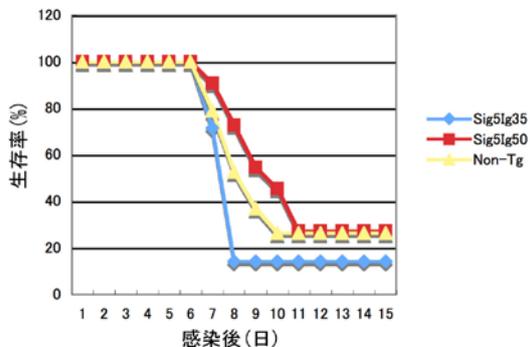
A/mountain hawk-eagle/Kumamoto/1/07 株 (1.6pfu/匹) 感染可溶性 Siglec 9 発現トランスジェニックマウス



A/mountain hawk-eagle/Kumamoto/1/07 株 (1.6pfu/匹) 感染可溶型 Siglec5 発現トランスジェニックマウス



A/Puerto Rico/8/19347 株 (2,000pfu/匹) 感染可溶型 Siglec9 発現トランスジェニックマウス



A/Puerto Rico/8/19347 株 (2,000pfu/匹) 感染可溶型 Siglec5 発現トランスジェニックマウス

図3. 可溶型 Siglec 発現トランスジェニックマウスの感染抵抗性

(4) トランスジェニックマウスの表現型解析

系統化に成功した可溶型 Siglec5 発現トランスジェニックマウス5系統および可溶型 Siglec9 発現トランスジェニックマウス3系統のうち、血液中への発現量の高い各々の1

系統について、各種の臓器を摘出して組織標本を作製し、抗ヒトIgG抗体を用いて酵素抗体法あるいは蛍光抗体法によって可溶型 Siglec の発現を調べた。調べたすべての臓器において、各々の可溶型 Siglec が発現していることが確認されたが、インフルエンザウイルスの標的臓器の一つである肺での発現は他の臓器に比べて弱かった。上部気道における可溶型 Siglec の発現については、気管の気管上皮、肺の細気管支の上皮や肺胞上皮でシグナルが認められたが、これらはそれほど強いものではなく、インフルエンザウイルスの主要感染部位である気道上皮細胞での発現が弱いという結果となった。

また、免疫学的機能解析で、マクロファージの鈍機能、脾臓細胞の増殖、Tリンパ球サブセットマーカー発現について解析したが、野生型マウスとの間に大きな差異は認められなかった。

(5) 可溶型 Siglec9 発現トランスジェニックマウスの腫瘍細胞増殖抵抗性

ムチン産生MM46-MUC1腫瘍細胞を可溶型 Siglec9 発現トランスジェニックマウスに移植し、マウスの生死によって、腫瘍細胞増殖抵抗性について検討した。Sig9Ig48系統において、生存日数の延長が認められた(図4)

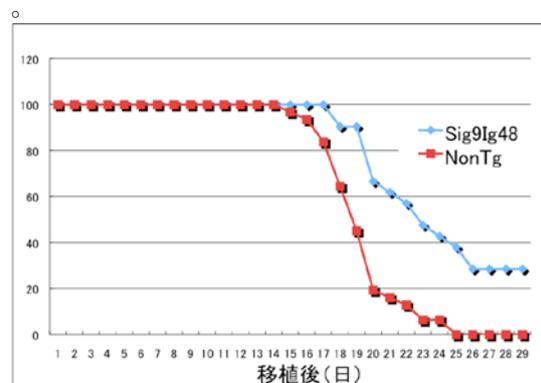


図5. 腫瘍細胞移植可溶型 Siglec9 発現トランスジェニックマウスの生存曲線

(8) 今後の展望

本研究では、可溶型 Siglec の in vitro での抗インフルエンザ作用は、残念ながらトランスジェニックマウスでは再現できなかった。代替方法として、抗原亜型に関係なく広く A 型インフルエンザウイルスに有効と考えられる PB2 に対する抗体や H5N1 型高病原性インフルエンザウイルスに対する中和抗体を産生するトランスジェニックマウスの作製を継続している。これら抗体を複数種類発現する動物は、インフルエンザウイルスに対する感染抵抗性を獲得する可能性が期待さ

れる。

一方、可溶性 Siglec9 発現トランスジェニックマウスにおいて、ムチン産生腫瘍細胞の増殖が抑制され、生存期間が延長されることが判明した。このことは、新たな癌の治療法の開発に繋がる可能性を示した。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tatsufumi Usui, Kinuyo Ozaki, Hiroki Takakuwa, Hiroichi Ozaki, Hiroshi Ito, Toshiyuki Murase, Koichi Otsuki, Toshihiro Ito, Tsuyoshi Yamaguchi and Etsuro Ono

Possible antiviral potential of soluble forms of Siglecs in influenza virus infection

5th Annual Meeting EPIZONE, 2011. 04. 12, Arnhem, The Netherlands

- ②Yoshikazu Fujimoto, Kinuyo Ozaki, Hiroki Takakuwa, Hiroshi Ito, Tatsufumi Usui, Hiroichi Ozaki, Toshiyuki Murase, Tsuyoshi Yamaguchi, Koichi Otsuki, Toshihiro Ito, Hiroshi Kida and Etsuro Ono

Antiviral effects of anti-PB2 monoclonal intrabody inhibiting the viral RNA transcription on influenza virus infections

9th International Congress of Veterinary Virology, 2012. 9. 4, Madrid, Spain

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 悦郎 (ONO ETSURO)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00160903

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

富岡 幸子 (TOMIOKA YUKIKO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：50374674