

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293092

研究課題名(和文) 病原体媒介節足動物コンピテンシーを制御するレジスタンス・トレランス機構

研究課題名(英文) Dissecting tolerance and resistance mechanism regulating vectorial competency of pathogen-transmitting vectors

研究代表者

嘉糠 洋陸 (KANUKA, HIROTAKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50342770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：デング熱、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、黄熱や日本脳炎等は、節足動物によって媒介されるウイルス感染症である。これらの節足動物種が不顕性感染や潜伏感染を示す状態であることに着目し、病原体媒介蚊を対象にレジスタンス・トレランスのメカニズムの解明を試みた。ネッタイシマカ体内では、感染後のウイルス増殖は抑制されていること、しかしながら低レベルのウイルス増殖を許容している状態であることを見出した。また、その抑制には、Dicer-2などによるRNA干渉システムが寄与していることが明らかになった。これら結果は、節足動物側からのウイルス媒介のコントロール法開発の研究基盤となり得るものである。

研究成果の概要(英文)：Blood-sucking arthropods, including mosquitoes transmit numerous virus diseases during blood feeding. Using a virus infection model in *Drosophila* and *Aedes* mosquito, we uncovered genetically encoded resistance of vector mosquito to virus infection as measured by the extent to which survival rate decreased via increasing virus burden. These results suggest that anti-virus responses of vector mosquito are not restricted to its survival but rather can be applied to capacity to employ virus mutualism during the disease transmission.

研究分野：衛生動物学

キーワード：トレランス レジスタンス 蚊 感染症 節足動物 ウイルス 免疫応答

## 1. 研究開始当初の背景

デング熱、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)、黄熱や日本脳炎等は、節足動物媒介ウイルスによる新興感染症または再興感染症であり、世界的に大きな脅威となっている。これらのウイルス性疾患の多くは、その病原体保有動物が家畜や野生動物であることから、節足動物によって橋渡しされる新しいカテゴリーの人獣共通感染症として注目されている。これらのウイルスの感染拡大の可能性は否定できず、それらに関わる基盤研究の重要性は年々増している。

節足動物媒介性ウイルスは、ヒトへの感染経路として節足動物を利用する。そのため、節足動物媒介性ウイルス症の対策の一つとして、節足動物側からのコントロールが従来考えられている。近年、節足動物媒介性の感染症の一つであるマラリアにおいて、遺伝子組換え技術を用いたマラリア原虫を媒介できない節足動物の作出が脚光を浴びている。同様の狙いがウイルスにおいても達成されれば、他の節足動物媒介性感染症への応用の可能性が高まることを意味し、新興感染症や再興感染症の基盤研究として重要対象と考えられる。しかしながら、このためには、節足動物体内におけるウイルスとの相互作用の知見が極めて重要である。

## 2. 研究の目的

この病原体媒介節足動物を生物学的に俯瞰すると、極めて興味深い生命現象が見出される。それは、病原性微生物を体内に有するにも拘わらず、自身は病気になるという点である。宿主も節足動物も同じ真核細胞で構成されていることを考えれば、この明確な差異は極めてユニークである。なぜウイルスなどの病原体が媒介節足動物の免疫などの生体防御反応から逃れ、またその病原体を持つベクター自身が病気になるのか、長らく不明のままであった。ヒトや節足動物の感染防御応答は大きく二種類の異なる性質に分類される。一つは、病原体を積極的に排除するための「レジスタンス」、もう一方は、感染個体に与えられる病原体によるダメージを制御するための「トレランス」である (図1)。ウイルスを媒介する節足動物では、このトレランス機能が他の動物よりも優れていると予想されるため、逆にこのトレランス能力を人為的に減弱させることに成功すれば、

病原体の伝播をコントロールすることが可能になると考えられる。

本研究は、ベクターが不顕性感染や潜伏感染を示す状態であることに着目し、デング熱媒介蚊を対象にトレランスのメカニズムを解明することより、今までブラックボックスになっていた「病原体媒介節足動物がウイルスを媒介する理由」、すなわち病原体媒介性の生物学的意義とその起源に迫る一面を持ち合わせている。上記のように純生物学的な学問的性質を持ちつつ、それらの解明が節足動物媒介性ウイルスのコントロールにおける重要な手法の確立に直結する、極めてユニークな研究である。これらの研究から得られる知見をもとに、節足動物側からのウイルス媒介のコントロール法開発の研究基盤とすることを試みた。

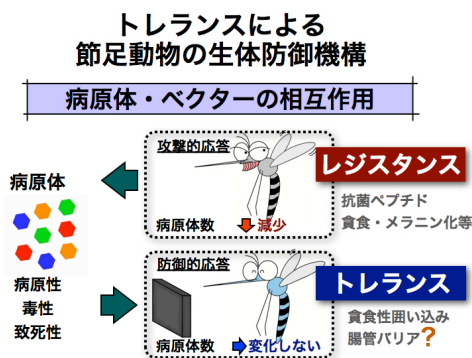


図1病原体媒介節足動物におけるレジスタンス・トレランス

## 3. 研究の方法

(1) 媒介性・非媒介性節足動物の抗ウイルス性状の比較解析

病原体媒介生のネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) と非媒介生のショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を対象に、これらの種が全く相反する挙動を示す可能性を検討するため、以下の実験をおこなう。植物を含めた広範な生物種に感染する能力を持つフロックハウスウイルス (FHV) を用いる。このウイルス感染による致死性およびウイルス増殖効率において、ショウジョウバエとネッタイシマカの体内において FHV の挙動を定量・観察する。抗 FHV ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作成し、それらの抗体を用いてウエスタン法および免疫染色法により節足動物体内の FHV の定量化をおこなう。植物や脊椎動物の抗ウイルス反応機構として、RNA 干渉が注目されている。RNA 干渉による抗ウイルス反応はウイルスの RNA ゲノムを短い RNA へ分解するのが特徴である。節足動物体内において FHV 遺伝子が分解されているかを調べるため、FHV を構成する RNA 断片 (RNA1 および RNA2) の cDNA プローブを

用い、ノーザン法により節足動物体内における **FHV RNA** の分解活性を測定する。上記のように節足動物体内の **FHV** の定量化と感染組織の同定を多角的におこない、ネッタイシマカとショウジョウバエにおけるウイルスの挙動を比較し差異を検討する。

#### (2) ネッタイシマカにおける抗ウイルス反応の機能的解析

抗ウイルス反応遺伝子の候補群について、ネッタイシマカにおける機能解析をおこなう。ネッタイシマカではハマダラカに次いで2007年に全ゲノム情報の整備が完了し、他種遺伝子のホロモジ解析が一段と容易となった。ネッタイシマカ-FHV 感染実験系において、抗ウイルス反応の実体を解明するために、**RNA 干渉法**を用いた遺伝子機能減衰実験(ノックダウン法)をおこなう。**dicer-2**をはじめとする抗ウイルス反応遺伝子のネッタイシマカホモログをクローニングし、これら遺伝子の二本鎖 **RNA (dsRNA)** を作成する。この **dsRNA** をネッタイシマカ腹腔に直接注入し、ターゲット遺伝子の機能を低下もしくは無効にさせる。この処置を施したネッタイシマカに **FHV** を感染させ、その個体における抗ウイルス反応(致死性・ウイルス増殖能・ウイルス遺伝子分解能等)への影響を調べる。

#### (3) 遺伝子改変ハマダラカ等を用いたウイルス増殖の人為的調節

媒介性節足動物のウイルス増殖システムのコントロールの可能性を検討するため、遺伝子改変ハマダラカの作成を実施する。蚊の吸血メカニズムの精巧さは良く知られている。宿主動物にほとんど痛みを与えることなく **1 μl** 以上の血液を吸い出すと同時に、血液凝固抑制因子などを含んだ唾液を唾液腺から分泌し、宿主体内に効率よく送り込む。蚊が吸血の際に宿主に注入するこの唾液に着目し、唾液成分とともに自律増殖能を持たないウイルス(シュード型ウイルス)を宿主体内に注入する系を構築する。シュード型水泡性口内炎ウイルス(シュード型 **VSV**)は、宿主細胞への侵入に必須な **VSV-G** 遺伝子を欠損しているため、そのままでは宿主組織中において増殖ができない。そこで蚊の一種であるハマダラカ(*Anopheles stephensi*)の唾液腺特異的遺伝子 **aapp** のプロモーターを用いて、**VSV-G** 遺伝子を唾液腺のみに発現するトランスジェニック蚊(TG 蚊)を作成する。この TG 蚊では、シュード型 **VSV** が存在すると、唾液腺細胞でのみウイルスの増殖が期待される。この遺伝子改変ハマダラカ系統において、**VSV** の感染実験をおこなう。ウエスタン法、ノーザン法、プラークアッセイ法等を用いて、ハマダラカ体内における **VSV** の挙動を多角的に評価し、本研究の重要仮説である「ウイルスの侵入に対して、節足動物はウイルス増殖のバランスに依って対抗している」可能

性を検証する。

#### 4. 研究成果

(1) 非媒介性と媒介性昆虫では感染後のウイルス増殖様式に顕著な差が認められる

分子遺伝学的解析が可能なネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)-フロックハウスウイルス(**FHV**)感染実験系を確立した。ネッタイシマカは、黄熱やデング熱の重要な媒介節足動物として知られている。これまで、ウイルスと節足動物の相互作用に関して、培養細胞を用いた細胞学的研究がほとんどである。そのため、節足動物体内におけるウイルス増殖に関わる分子生物学的知見はごく僅かである。その大きな理由として、研究を進める上で取扱いが安全なモデルウイルスが少ないということが挙げられる。

そこで、西ナイル熱やデング熱などの危険性の高い節足動物媒介性ウイルスの代替えとして、フロックハウスウイルス(以下 **FHV**)を使用した。一般的に、節足動物媒介性ウイルスは、宿主動物である哺乳類や鳥類に病原性を示すが、節足動物を死滅させることはない。**FHV** は、昆虫、植物、線虫と生物界を超えて感染する。さらに、**FHV** はヒトや哺乳類に対し病原性を示さないため、実験上極めて安全性が高い。また、ほとんどの節足動物媒介性ウイルスの核酸は、一本鎖 **RNA (+)** で構成されており、**FHV** も同様である。つまり、両者は多くの共通点を持っており、**FHV** のゲノム情報もすでに解明されているため、実験モデルとして最適である。

ネッタイシマカの抗ウイルス反応機構を効率よく探索するために、実験動物昆虫であるショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)を導入した。利点として、ショウジョウバエは優れた遺伝学的手法を駆使することのできる生物であり、短期間に遺伝子間の相互作用や機能の解析を可能とする。また、ショウジョウバエはウイルス“非媒介性”節足動物である。この利点を最大限に活用し、ショウジョウバエにおいて抗ウイルス反応機構を探索し機能解析を行い、その情報をネッタイシマカにフィードバックすることで迅速な解析が可能となる。

これらの節足動物の体腔に **FHV** を微量注入し、感染実験をおこなった。その結果、**FHV** の人為的感染は、“媒介性”節足動物であるネッタイシマカに対してはその生存率に何ら影響が無いが、ショウジョウバエは高い致死性を示すことが明らかとなった。また同時に、ショウジョウバエ体内における **FHV** の増殖が、ネッタイシマカよりも迅速且つ急激であることを明らかにした(図2)。この現象は、ネッタイシマカがウイルスの増殖を抑制している重要な証拠であり、媒介性のネッタイシマカと非媒介性のショウジョウバエにおいてウイルス感染に対する反応性が異なることが明らかとなった。

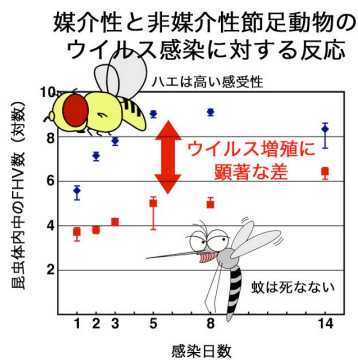


図2 非媒介性のショウジョウバエと媒介性のネッタイシマカにおける体内 FHV 増殖

(2)蚊の RNA 干渉経路は抗ウイルス反応の重要な要素である

媒介節足動物においてウイルスに対する感受性が低い原因について解析を実施した。これまでの研究から、ショウジョウバエにおいてウイルスに対する感受性を制御する遺伝子として、*dicer-2* が明らかになっている。これらの遺伝子に着目し、ネッタイシマカ-FHV 感染実験系へフィードバックすることにより、分子遺伝学的手法を駆使し、ウイルスと節足動物の相互作用の解明を目指した。

近年、自然免疫しか持たない節足動物や植物の抗ウイルス反応として、RNA 干渉が注目されている。昆虫媒介性ウイルスの研究を進めるにあたり、分子遺伝学解析が可能で安全性の高いネッタイシマカ (*Aedes aegypti*)-フロックハウスウイルス (FHV) 感染実験系を用いた。このネッタイシマカに対し、RNA 干渉の重要なコンポーネントである *dicer-2* の機能阻害を施したところ、FHV の増殖が有意 (~100 倍) に亢進した (図3)。これらの結果から、ウイルス媒介昆虫はその媒介能を保証するために、ウイルスの増殖を適切な範囲に調節している可能性が示唆された。

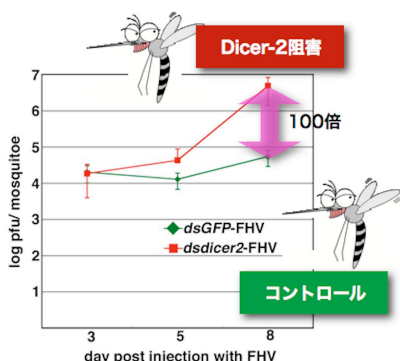


図3 ベクターの RNA 干渉システム阻害による FHV 増殖促進効果

(3)シュードタイプウイルスを用いた蚊体内での人為的ウイルス増殖制御

水泡性口炎ウイルス VSV (Vesicular stomatitis virus) は、昆虫から哺乳類まで実に

多様な宿主細胞に感染することができることが知られている。そこで、ショウジョウバエ体内において、VSV が増殖可能か検証した。その結果、感染初期(感染後 5 日まで)には直線的にウイルスが増殖することが示され、感染後期(感染後 5 日以降)にはウイルス量がピークに達した後、減少することが明らかになった。この VSV 感染により、ショウジョウバエが致死に至る傾向は見られなかった。

シュード VSV をショウジョウバエ体内で増殖させるため、VSV-G タンパク質を発現する遺伝子組換えショウジョウバエを作成した。シュード型ウイルスはエンベロープタンパク質をコードする遺伝子を人為的に欠損させているため、多段階感染が不可能なウイルスである。これらのウイルスを増殖させるためには、ウイルスのエンベロープタンパク質を発現した細胞を作成する必要がある。そこで、このシュード VSV の生体内での増殖を試みた。作成した *da>VSV-G* 系統の個体に、シュード VSV を感染させた。本研究に用いたシュード VSV が感染した細胞は、GFP を発現する。感染後 5 日経過したショウジョウバエ体内においてこれらシュード型ウイルスの増殖が観察された。また、感染後 4 日経過した個体のウイルス量を、ショウジョウバエ S2 細胞を用いて測定したところ、*da>VSV-G* 系統においてウイルスの増殖が確認された。これらの結果から、節足動物におけるシュード VSV の人為的増殖は可能であることが明らかとなった。

次に、蚊の一種であるハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の唾液腺特異的遺伝子 *aapp* のプロモーターを用いて、VSV-G 遺伝子を唾液腺のみに発現するトランスジェニック蚊 (TG 蚊) を作成した。この TG 蚊では、シュード型水泡性口炎ウイルスが存在すると、唾液腺細胞でのみウイルスの増殖が期待される。そこで、シュード型ウイルスを蚊体腔内に微量注入したところ、野生型蚊ではウイルスが全く検出されないのに対し、TG 蚊ではウイルス数の顕著な増加が観察された。それにも関わらず、唾液腺細胞の形態は保持されており、ウイルス増殖による細胞変性や細胞死などは観察されなかった (図4)。すなわち、媒介性節足動物において、ウイルス増殖と病原性発揮はメカニズムとして分離できる可能性が示され、節足動物におけるウイルス増殖機構の一端が明らかとなった。

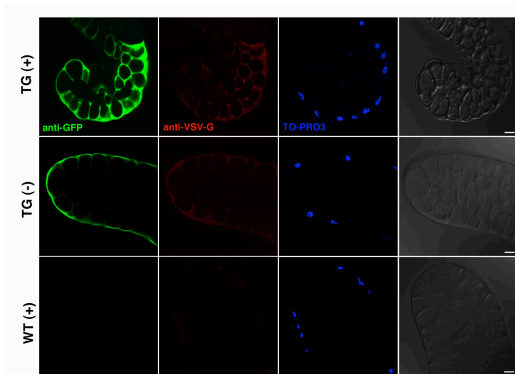


図4 *aapp-VSV-G* 系統の蚊の唾液腺におけるシュールド VSV (緑および赤色) の増殖

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計14件)

① 嘉糠洋陸「Generation of transgenic mosquito harboring pseudotype virus」2017 International conference on Dengue and Dengue prevention 2017.3.7(台湾(台南))

② 嘉糠洋陸「トランスジェニック蚊を用いたウイルス生ワクチン産生の試み」第24回分子寄生虫学ワークショップ／第14回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 2016.8.21(帯広)

③ 嘉糠洋陸「マダニ刺咬症と感染症のリスクを知る」第115回日本皮膚科学会 2016.6.3(京都)

④ 嘉糠洋陸「The role of gut in pathogen-transmitting insects: barrier or gate?」The 1st International Symposium for Infectious Diseases: Vector-borne Disease 2016.5.31(中国(深セン))

⑤ 山地佳代子、下島昌幸、西條政幸、嘉糠洋陸「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスのマダニ内伝播メカニズムの解析」第68回日本衛生動物学会 2016.4.15(栃木)

⑥ 嘉糠洋陸「Insect and pathogen interaction: friend or enemy?」第5回モデル生物丸ごと一匹学会 2015.12.19(大阪)

⑦ 嘉糠洋陸「The role of gut in pathogen-transmitting mosquito: barrier or gate?」第36回台湾昆虫学会 2015.10.30(台湾)

⑧ 横山卓也、池田愛、浅野和仁、渡邊直熙、友安慶典、嘉糠洋陸「中間宿主甲虫の小形条虫に対する感染コンピテンシー」第23回分子寄生虫学ワークショップ／第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 2015.8.30(帯広)

⑨ 岡戸清、佐久間知佐子、山地佳代子、青沼宏佳、嘉糠洋陸「Non blood-sucking vectors: Odor-based mechanical transmission of bacteria by fly feces」EMBO 国際会議 Molecular and population biology of mosquitoes and other disease vectors 2015.7.24(ギリシャ)

⑩ 岡戸清、佐久間知佐子、山地佳代子、青沼宏佳、嘉糠洋陸「Odor-based mechanical transmission of bacteria by fly feces」Keystone 国際会議 The Arthropod Vector: The Controller of Transmission 2015.5.12(米国)

⑪ 山地佳代子、下島昌幸、西條政幸、青沼宏佳、嘉糠洋陸「Evidence of vertical transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in field-collected ticks」Keystone 国際会議 The Arthropod Vector: The Controller of Transmission 2015.5.12(米国)

⑫ 横山卓也、日向綾子、山地佳代子、浅野和仁、渡邊直熙、友安慶典、嘉糠洋陸「中間宿主甲虫の小形条虫に対する感染コンピテンシー」第84回日本寄生虫学会 2015.3.21(東京)

⑬ 嘉糠洋陸「マダニ媒介性感染症～感染症が運ばれるリスクを知る～」第63回感染症学会 東日本地方会 2014.10.29(東京)

⑭ 嘉糠洋陸「The role of gut in pathogen-transmitting insects: barrier or gate?」第87回日本生化学会 2014.10.15(京都)

[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://jikei-tropmed.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

嘉糠洋陸 (KANUKA HIROTAKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50342770

(2) 研究分担者

案浦 健 (ANNOURA TAKESHI)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

研究者番号: 90407239