

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04591

研究課題名(和文)ブタにおけるニパウイルス病原性発現機序の解析と予防法の開発

研究課題名(英文) Analysis of pathogenicity of nipah virus in porcine and vaccine development.

研究代表者

米田 美佐子 (YONEDA, MISAKO)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：40361620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの我々の研究により、ニパウイルスの病原性に強く関与することが示されたアクセサリータンパクと相互作用する宿主因子の探索を行った結果、それぞれのタンパクについて相互作用する因子を見いだすことができた。  
in vivoでの感染伝播をEGFP発現組換えニパウイルスを用いてサルで観察したところ、経口経鼻投与2日後から経時的に広がる様子を観察することができた。  
ニパウイルスGタンパク発現組換えブタヘルペスウイルスワクチンの作出に成功した。本ワクチンを2度摂取したブタでは非免疫群と比較し、臨床症状が軽減しウイルス排出量の低下も認められた。これらの結果から、本ワクチンの有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニパウイルスは人獣共通感染症として、畜産業にも人にも甚大な被害を及ぼす重要な病原微生物である。またニパウイルスのような新興感染症は、本来の自然宿主から動物種を超えて感染伝播し出現することが知られている。本研究により、ニパウイルスの病原性発現の分子機序の一端を明らかにすることができた。また、ニパウイルスに対する感受性が高く、実際に大きな被害を出したブタにおけるワクチンの開発も行い、その有効性を明らかにすることができた。これらの成果は、ニパウイルスの基礎的研究として重要な知見を得られたのみならず、畜産業界にも貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated cellular factor interacting with nipah virus accessory proteins which had been shown to have key role in pathogenicity of nipah virus. As the result, we could find some cellular factors interacting with the accessory proteins.  
We examine the in vivo propagation of nipah virus using EGFP expressing recombinant nipah virus. We could observed the propagation from 2 dpi temporally.  
We succeeded to rescue the recombinant pseudorabies virus expressing nipah virus G protein. The pigs vaccinated this vaccine twice showed more slight clinical symptoms and virus shedding.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ニパウイルス ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

ニパウイルスは、1998年にマレーシアに初めて出現し、105名を死亡させたエマージングウイルスである。自然宿主はオオコウモリで、その排泄物等に濃厚接触したブタに流行が広がり、ブタからヒトへ伝播した。本ウイルスは致死率の高さからBSL4に分類されている。ヒトにおけるニパウイルス感染は、主に中枢神経症状を引き起こし、数日から数ヶ月のうちに死亡する。それに対し、ブタでは、症状は急性呼吸器症状のみが多く、致死率は低いが感染率が極めて高い。この特徴が、ブタでの感染が流行を拡大させる要因となっている。ニパウイルスの動物種による病態の違いは何に起因するのか、ウイルスに対する宿主の自然免疫機構、およびウイルス側がそれを回避する機序等の基礎的な疑問は全く解明されていない。

#### 2. 研究の目的

ニパウイルス感染症はヒトにおいても致死率の高い重要な感染症であるが、出現当時の感染経路がブタを経由してヒトに伝播したため、畜産業にも甚大な被害をおよぼしたことから、獣医畜産領域における重要な研究課題である。本研究では、既に申請者が発見した病原性発現の鍵となるウイルス側蛋白について、その関与機序を総合的に解析し、動物個体での感染成立・伝播、免疫応答の詳細を解析することにより、動物種により異なる病原性発現機構の解明を目指す。また、ブタでの防御法の開発は畜産領域にとって急務であるため、ブタにおける新型ワクチン開発も目的とする。

#### 3. 研究の方法

##### 1) 病原性発現機序に関わるウイルス側因子の役割

申請者が発見した病原性発現に鍵的役割を担うC、V蛋白について、病原性誘発機能を解明する。

##### 2) in vivo での感染成立と伝播機序・免疫応答

既に作出しているEGFP発現NiV(rNiV-EGFP)を用いて、感染後の動物体内伝播様式の詳細を明らかにし、比較解析する。

##### 3) ブタでのニパウイルス感染症に対するワクチンの開発

i)ブタの重要感染症ウイルスのブタヘルペスウイルス(偽狂犬病:Pseudorabies virus(PRV))ベクターを用いた組換え2価ワクチンの開発と、ii)弱毒化組換えNiVワクチンの開発とを目指す。

#### 4. 研究成果

##### 1) 病原性発現機序に関わるウイルス側因子の役割

ニパウイルスのアクセサリタンパクであるV、C、Wタンパクと相互作用する宿主因子の探索を、GST-pull down および yeast-two-hybrid法を用いて行った。その結果それぞれに候補因子が得られ、直接結合の確認を行った。C、Wタンパクについては、宿主の抗ウイルス免疫応答に対する新規の機能について示唆する結果を得られた。また、Vタンパクがある宿主因子と相互作用し、宿主細胞内でのウイルス複製効率を上げていることが明らかとなった。これは、同属のウイルスにおいて初めての知見である。

##### 2) in vivo での感染成立と伝播機序・免疫応答

アフリカミドリザルへ rNiV-EGFP を経口および経鼻投与を行い、その伝播を経時的サンプリングにより解析した。感染2日後では、嗅球、気管、扁桃で蛍光が観察され、その後2週間に

渡って、大脳、腸管、腎臓、肝臓へと感染が広がっていく様子が観察された。今後、他の動物種における伝播についても解析を行い、比較する。また、ブタにおけるニパウイルスの病態解析のためにブタ胎児初代培養細胞の作出を試み、脳、腎臓、腸管、肺、リンパ球等の初代培養細胞を樹立することができた。

### 3) ブタでのニパウイルス感染症に対するワクチンの開発

ブタでのニパウイルス感染症に対するワクチンとして、ブタヘルペスウイルスベクターを用いた2価ワクチンを作成した。bacmidに組み込まれたブタヘルペスウイルス遺伝子のうち、TK領域をニパウイルスのGタンパクで置き換えたものを作製し、これを用いてニパウイルスGタンパク発現組換えブタヘルペスウイルスワクチンの作出に成功した。予備実験として、マウスに摂取してGタンパクに対する抗体価の上昇を確認後、ブタでの防御試験を行った。本ワクチンを2度摂取したのちニパウイルスを用いた攻撃試験を行ったところ、ワクチンを摂取したブタでは非免疫群と比較し、体重減少や発熱などの臨床症状が軽減し、さらに鼻スワブ中のウイルス排出量の低下も認められた。これらの結果から、本ワクチンの有効性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

1. Uchida, S., Sato, H., Yoneda, M. and Kai, C. Eukaryotic elongation factor 1-beta interacts with the 5' untranslated region of M in Nipah virus to promote mRNA translation. *Arch. Virol.*, 161(9), 2361-2368, 2016 DOI 10.1007/s00705-016-2903-y7.
2. Horie R., Yoneda M\*, Uchida S., Sato H., and Kai C. Region of Nipah virus C protein responsible for shuttling between the cytoplasm and nucleus. *Virology*, 497, 294-304, 2016.
3. Uchida S, Horie R, Sato H, Kai C, Yoneda M. Possible role of the Nipah virus V protein in the regulation of the interferon beta induction by interacting with UBX domain-containing protein1. *Sci Rep.* 2018 16;8(1):7682.

[学会発表](計 12件)

1. Horie, R., Kai, C. and Yoneda, M. Interaction between the Nipah virus nonstructural C protein and protein phosphatase 2A inhibitor suppresses inflammatory cytokine induction. 16<sup>th</sup> Int Conf on Negative Strand Viruses, June 14-19, 2015. Siene, Italy.
2. Uchida, S., Horie, R., Kai, C. and Yoneda, M. Identification of a novel interacting protein with Nipah virus V protein. 16<sup>th</sup> Int Conf on Negative Strand Viruses, June 14-19, 2015. Siene, Italy.
3. Horie R., Kai C. and Yoneda M. Nipah virus nonstructural C protein modulates proinflammatory cytokine response by increasing of phosphatase activity. 第63回日本ウイルス学会学術集会。2015年11月22-24日、福岡
4. Uchida S., Horie R., Kai C. and Yoneda M. Nipah virus V protein suppresses host interferon induction by stabilizing UBXN1. 第63回日本ウイルス学会学術集会。2015年11月22-24日、福岡
5. Uchida S., Sato H., Yoneda M. and Kai C. Regulatory activities of Nipah virus 5' untranslated regions on viral gene expression. 第64回日本ウイルス学会。2016年10月23-25日、札幌
6. 米田美佐子. BSL-4 施設におけるニパウイルス感染症研究。第16回日本バイオセーフティ学会 2016年11月30日-12月1日、東京(招待講演)
7. Horie R., Uchida S., Sato H., Kai C. and Yoneda M. Nipah virus C protein inhibits inflammatory cytokine induction by interacting with protein phosphatase 2A inhibitor. IUMS 2017, 2017, July 17-21, Singapore
8. Uchida S., Arai T., Sato H., Kai C. and Yoneda M. The highly conserved tryptophan residue in V protein plays a critical role in neurovirulence of measles virus. IUMS 2017, 2017, July 17-21, Singapore
9. Yoneda M, Fujiyuki T, Sato H, Daigo Y, Kai C. A recombinant SLAMblind measles virus is applicable for breast cancer treatment. 11th, International Oncolytic Virus Conference, 2018.4.9-12, Oxford, UK
10. Uchida S, Sato H, Arai T, Ikeda F, Kai C, Yoneda M. Measles virus V protein contributes to the transport of nucleoprotein complexes and efficient viral assembly in neuronal cells. XIX International Meeting on Negative Strand Viruses, 2018.6.17-22, Verona, Italy
11. Horie R, Yoneda M, Uchida S, Yoshida A, Sato H, Kai C. Nipah virus C protein inhibits inflammatory cytokine induction by interaction with phosphatase 2A inhibitor. XIX

International Meeting on Negative Strand Viruses, 2018.6.17-22, Verona, Italy  
12. 内田翔太郎、佐藤宏樹、新井哲郎、池田房子、甲斐知恵子、米田美佐子。Measles virus V protein is required for the efficient viral propagation in neuronal cells. 第66回日本ウイルス学会学術集会。2018年10月30日、京都

〔図書〕(計 1件)

1. 米田美佐子 ニパウイルスとヘンドラウイルス感染症 (特集: 感染症最前線とグローバル・ヘルス)、医学のあゆみ、医歯薬出版 253(1): - , 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。