

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2016～2019
課題番号：15KK0274
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（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Analysis of nipah virus pathogenicity in swine and vaccine development(Fostering Joint International Research)

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） 10,800,000円
渡航期間： 1ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、ニパウイルスのVタンパクについて相互作用する宿主因子を同定し、Cタンパクについてはその核内移行シグナル領域を同定した。ブタにおけるアクセサリータンパクの解析はカナダにおいて行い、Vタンパクがブタの免疫細胞において、IFN alphaおよびbetaの発現誘導を阻害することを明らかにした。ブタ用のワクチン開発研究では、PRVベクターにニパウイルスのG遺伝子を組み込んだ2価ワクチンを作出した。ブタでの有効性試験においてワクチン群での明らかな増殖ウイルス量の減少が認められた。このことから、本組換え2価ワクチンはブタのニパウイルス感染症に対し有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニパウイルスは1998年に出現した新興ウイルス感染症であり、致死率は70%以上に上る。世界に広く分布するオオコウモリが自然宿主であるが、現在までの主な流行発生地は東アジア地域である。日本においても当該のオオコウモリは沖縄、奄美地方に生息することが確認されており、流行発生の危険性は否定できない。本研究成果は、ニパウイルスの高い病原性発現の機序を明らかにすることにより学術的に貢献し、またワクチン開発を行うことで今後の流行発生に備えた予防法を社会に提案することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified UBX domain-containing protein 1 (UBXN1), a negative regulator of RIG-I-like receptor signaling, as a host protein that interacts with NiV V. Further, we focused on NiV-C trafficking in cells and found that it localizes predominantly in the cytoplasm but partly in the nucleus, and determined that amino acids 60-75 and 72-75 were important for nuclear localization of NiV-C. In the study of role of the accessory proteins in swine cells, it was shown that NiV protein prevents induction of type I IFN and is important for production of infectious virus. We developed new recombinant vaccine for swine NiV infection. We constructed attenuated PRV virus expressing NiV G protein, and performed safety and efficacy tests in Canadian BSL4. The results showed that the virus preparation in vaccinated pigs apparently suppressed compared with unvaccinated pigs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ニパウイルス 病原性 ワクチン

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。その後マレーシアでは流行は起きていないが、パングラディシュやインドで散発的に発生しており、致死率は70%に及んでいる。この流行では、オオコウモリからの直接感染やヒト間での感染も起きていることから、本感染症の脅威は増している。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

本研究は、ニパウイルスの病原性発現機序の解明および動物種により異なる病態発現の機序の解明を目指す。また、本感染症の防御は獣医畜産領域においては急務であることから、ブタにおけるワクチン開発も目的とした。

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

多くのパラミクソウイルス科のウイルスでは、アクセサリー蛋白が、I型インターフェロン(IFN)発現を抑制することが報告されている。申請者はアクセサリー蛋白を欠損させたウイルス(rNiV- C, - V, W)を作出することにより、感染細胞ではアクセサリー蛋白1種の単独欠損ではIFN応答系抑制作用は維持されることを示した。また、申請者は、動物感染実験により rNiV- C, - V の病原性が著しく低下したことを発見した(*PLoS ONE*,2010)。すなわち、C,V蛋白はin vivoでの強い病原性発現に必須の働きをするが、その作用機序はINF応答阻害機能によるものではなく、これまで全く知られていない機序の存在を示唆する。そこで、この未知の機能を解明することを目的とし、C,V蛋白と相互作用する宿主因子をプルダウンや、yeast-two-hybrid法により探索する。得られる候補因子について細胞への強制発現やsiRNAによるノックダウンによって機能を検索する。

2) ブタにおけるアクセサリータンパクの免疫応答に対する機能の探索

アクセサリー蛋白の病原性発現能は、異なる病態を示すブタにおいても同様に作用するかは未だ解析されていない。そこでアクセサリータンパク欠損ウイルスをブタに感染させ、その病原性を解析する。

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

ニパウイルス感染症に対して実用化されているワクチンはまだない。そこで、ブタの重要感染症であるブタヘルペスウイルス(PRV)を用いた2かワクチンの開発を計画した。既に、PRV遺伝子全長を組み込んだbacmidを用いて、PRV自体の病原性を減弱するために、PRV遺伝子中のチミジンキナーゼ(TK)遺伝子領域を相同組換えにより欠損させたrPRVを作出し、マウスで病原性を示さなくなったことを確認した。また、免疫誘導抗原としての有用性を確認しているNiVのG蛋白を発現する組換えPRV(rPRV-NiVG)の作

出にも成功している。そこで平成 26 年度は、rPRV-NiVG 感染細胞での NiVG の発現を定性的および定量的に観察する。次に rPRV-NiV を NiV に感受性のハムスターに感染させ、NiVG に対する免疫誘導能を血清中抗体価の上昇により検索する。

4 . 研究成果

1) ニパウイルスの病原性に関与することが明らかとなった V および C タンパクと相互作用する宿主因子の探索を行った。精製した V タンパクと細胞ライセートを用いた免疫沈降により V タンパクと相互作用する因子、UBXN1 を同定した。さらに、V タンパクは UBXN1 の C 末端に結合することにより UBXN1 を安定化し、インターフェロン応答系を抑制することを明らかにした。C タンパクについては、細胞内で核と細胞質を移行する性質を見出し、その機構について詳細な解析を行った。通常 C タンパクは細胞質内に局在しているが、N 末の 24 アミノ酸あるいは、110 番から 139 番のアミノ酸を欠損させると核内へと移行することを明らかにした。また核内へと移行することができない変異体を用いた実験の結果、C タンパクがもつインターフェロン抑制能が細胞質でその機能を発揮することを示すことができた。

2) ブタにおけるニパウイルスのアクセサリタンパクの機能を解析するため、様々なブタの細胞株に V または W タンパク欠損ウイルスを感染させ解析を行った。その結果、V タンパク欠損ウイルスは野生株と比較して、いくつかの培養ブタ細胞およびブタ PBMC において、顕著な増殖抑制が認められた。またこれらの細胞において、V タンパク欠損ウイルスが感染初期の I 型インターフェロンを強く誘導する、すなわち I 型インターフェロンの誘導が抑制できないことが明らかとなった。W タンパク欠損ウイルスにおいては、このような機能は認められなかった。

3) PRV の TK 遺伝子領域にニパウイルスの G タンパクを欠損させた組換え 2 価ワクチンウイルスを作出した。このウイルスを感染させた細胞における G タンパクの発現を免疫染色により確認した。また、血中抗体価の測定のため、バキュロウイルス発現系を用いて発現、精製したニパウイルス G タンパクを抗原とする ELISA 系の開発を行った。カナダの BSL4 施設において、ブタにこの組換えワクチンを 2 回摂取し、その後ニパウイルスによる攻撃試験を行い、ワクチンの安全性および有効性を検討した。ワクチン接種後 5 週目までにブタが何らかの症状を示すことはなく、ワクチンの病原性は認められなかった。ワクチン後の血中抗 G 抗体価を測定したところ、2 週目から明らかな抗体価の上昇が認められ、5 週目には 1600 倍以上の高い抗体価となった。ニパウイルスによる攻撃試験後の鼻スワブ中のウイルス量を real-time PCR により測定したところ、ワクチン群では非ワクチン群と比較して非常に早期にウイルス排出が消失していることが分かった。また臓器中のウイルス量を比較すると、ワクチン群ではリンパ節、肺等で明らかにウイルス量が減少していた。これらの結果から、本組換え 2 価ワクチンはブタのニパウイルス感染に対し有効であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchida Shotaro, Horie Ryo, Sato Hiroki, Kai Chieko, Yoneda Misako	4. 巻 8
2. 論文標題 Possible role of the Nipah virus V protein in the regulation of the interferon beta induction by interacting with UBX domain-containing protein1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25815-9	査読の有無 有
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 Sugai Akihiro, Sato Hiroki, Takayama Ikuyo, Yoneda Misako, Kai Chieko	4. 巻 91
2. 論文標題 Nipah and Hendra Virus Nucleoproteins Inhibit Nuclear Accumulation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) and STAT2 by Interfering with Their Complex Formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01136-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01136-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Horie, Misako Yoneda, Shotaro Uchida, Hiroki Sato, Chieko Kai	4. 巻 497
2. 論文標題 Region of Nipah Virus C Protein Responsible for Shuttling Between the Cytoplasm and Nucleus	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 294-304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1016/j.virol.2016.07.013	査読の有無 有
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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	羅宇流 (Raoul Herve)	インセルム・Laboratory P4・Director	