

令和元年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18791

研究課題名(和文)新規ダニ媒介性フレボウイルスの探索とSFTSウイルスの病原性獲得メカニズム

研究課題名(英文) Screening of novel tick-borne phlebovirus and virulence factor of SFTS virus

研究代表者

松野 啓太 (MATSUNO, Keita)

北海道大学・獣医学研究科・特任講師

研究者番号：40753306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：重症熱性血小板減少症(SFTS)ウイルスは、ダニ媒介性フレボウイルスの中でもヒトに対する病原性が高く、日本を含む東アジアで問題となっている。本研究では、SFTSウイルスに近縁なダニ媒介性フレボウイルスを比較解析することで、SFTSウイルスがヒトに対する病原性を獲得するに至った進化の過程を解き明かすことを目的とした。日本国内外の様々な地域でマダニ中から複数の新規フレボウイルスを発見し、野生動物がこれらのウイルスに感染していることを明らかにした。また、ダニ媒介性フレボウイルスはマダニと共進化しており、病原性獲得にNSsと呼ばれるタンパク質遺伝子を獲得することが重要である可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、日本国内外のダニ媒介性フレボウイルスの浸潤状況が明らかとなった。これらのウイルスはヒトや動物に対する病原性は不明だが、さまざまウイルスが発見されたことで不明熱の診断の一助となるかもしれない。野生動物がこれらのフレボウイルスに感染していることも分かったため、今後、どのような動物がフレボウイルスに感染するかを調べ、病気との関連を研究することができる。また、西日本で問題となっているSFTSウイルスが病気を起こすためには、NSsと呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子が必要であることが示唆された。ウイルスの進化と病原性獲得を議論する上で重要な知見となる。

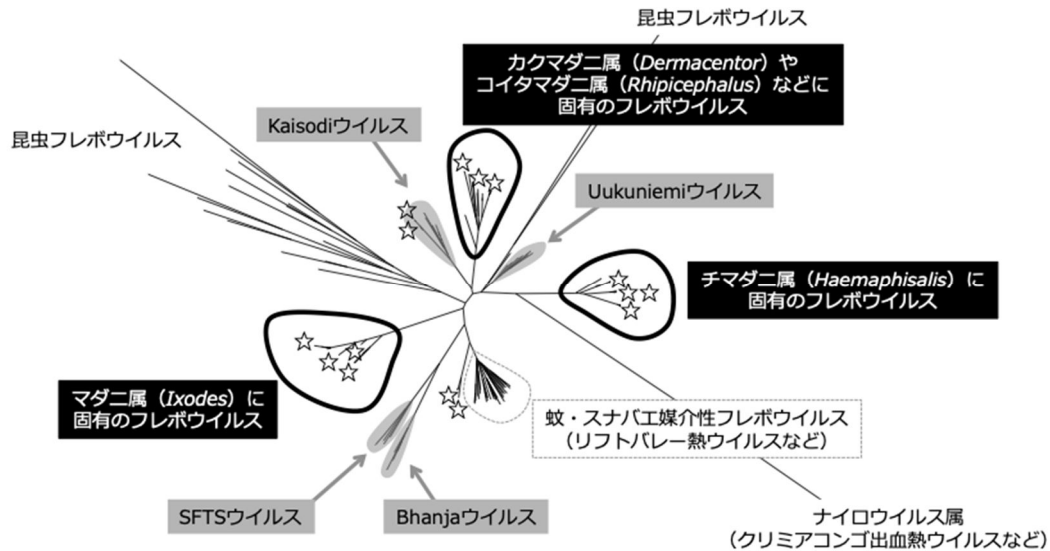
研究成果の概要(英文)：Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus causes fatal febrile illness in humans and has obtained lots of attention in Eastern Asia, including Japan. In the present study, the present study aims to reveal the evolutionary process in which SFTS virus increases its virulence to humans by comparing tick-borne phleboviruses closely related to SFTS virus. Novel tick-borne phleboviruses were identified in Japan and also in abroad, and wild animals were suggested to be infected with these viruses. Tick-borne phleboviruses seem to coevolve with ticks, and acquisition of NSs gene could be associated with SFTS virus virulence.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ダニ媒介性ウイルス 病原性獲得

1. 研究開始当初の背景

2011年に中華人民共和国で報告された SFTS ウイルスは、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される、ヒトに対して病原性の高いダニ媒介性ウイルスである (Yu XJ et al. NEJM 2011)。SFTS ウイルスの発見までは、主に鳥に付着しているマダニから分離される Uukuniemi ウイルスのみがダニ媒介性フレボウイルスとして知られていた。SFTS ウイルス発見後、世界各地でダニ媒介性フレボウイルスの発見が相次いだ。しかし、SFTS ウイルスと、その近縁種の Heartland ウイルス (McMullan LK et al. NEJM 2012) を除いて、ダニ媒介性フレボウイルスのがヒトや動物に病原性を示すかどうかは不明であった。そこで、ダニ媒介性フレボウイルス遺伝子を広く検出可能な RT-PCR 法を開発した結果、ダニ媒介性フレボウイルスには、マダニと動物の間で生活環が成立しているウイルスと、特定のマダニ種固有のウイルスの 2 つの異なる系統のウイルスが存在すると考えられた (下図)。



この 2 つの系統が互いにどのような関係にあるのか解明すれば、ダニ媒介性フレボウイルスの病原性獲得機構が明らかとなる。また、ダニ媒介性フレボウイルス中には、遺伝的に同じ系統に属するウイルスでも、東アジアに分布する SFTS ウイルスと、それに最も近縁で北米に分布する Heartland ウイルスのように、進化および伝播経路が不明なものも多く存在した。すなわち、ダニ媒介性フレボウイルスにはまだ多くの未発見ウイルス種が存在すると考えられ、そうしたウイルスを発見・性状解析することで、SFTS ウイルスの病原性獲得メカニズムを進化系統学および分子生物学的アプローチにより解明できると考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、日本国内外のマダニにおけるダニ媒介性フレボウイルスの分布、新規ダニ媒介性フレボウイルスの生物学的性状と、既存のウイルスとの系統関係、ダニ媒介性フレボウイルス種間のウイルスタンパク質機能の差異を明らかにし、SFTS ウイルスの病原性獲得メカニズムを進化系統学および分子生物学的アプローチにより解明することを目的とした。

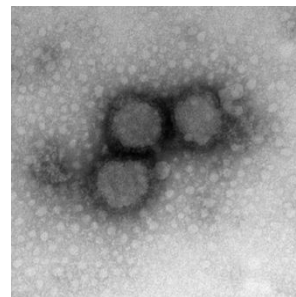
3. 研究の方法

本研究では、野外でのマダニ調査(新規フレボウイルスの探索)、遺伝子系統解析、ウイルスタンパク質の機能解析を行った。遺伝子系統解析により、SFTS ウイルスの病原性決定因子の候補を絞り込んだ。動物モデルにより、SFTS ウイルスの病原性を検証した。また、本研究で発見された新規ダニ媒介性フレボウイルスについて、病原性獲得の可能性を検討した。

4. 研究成果

日本国内各地ならびにザンビア、ミャンマー、フィジー、アメリカ、モンゴルでマダニを採集し、ダニ媒介性フレボウイルス遺伝子を RT-PCR 法 (Matsuno et al. 2014 J Virol) にて検出した。その結果、日本のマダニおよびザンビア、フィジー、アメリカで採集したマダニから多種多様なフレボウイルス遺伝子が検出された。それぞれのウイルスについて、PCR 産物の塩基配列を元に系統解析をしたところ、最低でも 10 種の新規フレボウイルス候補であることが分かった。

Vero 細胞、Huh-7 細胞などの哺乳動物由来細胞と、マダニ由来の ISE6 細胞を用いてこれらのウイルスの分離を試みたところ、Mukawa ウイルス・Kuriyama ウイルスの 2 種のフレボウイルスが分離された(右図: Mukawa ウイルスの電子顕微鏡写真)。これらのウイルスは互いに近縁で、系統樹上では他のフレボウイルスから独立した単一のクラスターを形成する。また、このウイルスはダニ媒介性フレボウイルスとは系統的に離れた位置におり、蚊やスナバエといった吸血昆虫によって媒介されるウイルスと比較的近縁であることが分かった。これらのウイルスが北海道の一部地域のシュルツェマダニに限局して分布している可能性を示す結果を得た。



これまでに検出された新規フレボウイルスのうち、培養細胞での分離ができなかったウイルスについては、ウイルス RNA を含むマダニ total RNA をシーケンスし、ウイルスの全長遺伝子配列を得た。これらのウイルス遺伝子配列を既存のフレボウイルスと比較したところ、一部のフレボウイルスは非構造タンパク質である NSs の ORF を欠くことが明らかとなった。また、これらの NSs 欠損フレボウイルスは M 分節 RNA も欠いていることを示唆する結果が得られ、NSs 遺伝子および M 分節(膜タンパク質をコードしている)がダニ媒介性フレボウイルスの病原性規定因子である可能性が考えられた。そこで、NSs について、さまざまなダニ媒介性フレボウイルス間で機能を比較したところ、ヒトに病気を起こすことが報告されているウイルスでは NSs の抗自然免疫作用、特にインターフェロン産生抑制作用が強いということが明らかとなった。しかし、インターフェロン産生抑制と、SFTS ウイルス NSs とインターフェロン産生シグナル因子である TBK1 との結合は、さまざまな動物種由来の TBK1 でも見られたことから、NSs だけでは動物種間の病原性の違いについては説明できないことが分かった。

ダニ媒介性フレボウイルス調査の一環として、動物園で死亡したチーターの検査を行い、SFTS ウイルス感染が死因であることを突き止めた。

また、SFTS ウイルスの病原性の分子基盤を明らかにするため、免疫不全マウスにウイルスを感染させ、死亡時におけるウイルス抗原陽性細胞を病理学的に探索した。その結果、幼若 B 細胞およびマクロファージが主にウイルスに感染していることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Torii Shiho, Matsuno Keita, Qiu Yongjin, Mori-Kajihara Akina, Kajihara Masahiro, Nakao Ryo, Nao Naganori, Okazaki Katsunori, Sashika Mariko, Hiono Takahiro, Okamatsu Masatoshi, Sakoda Yoshihiro, Ebihara Hideki, Takada Ayato, Sawa Hirofumi. (2019) Infection of newly identified phleboviruses in ticks and wild animals in Hokkaido, Japan indicating tick-borne life cycles. *Ticks Tick-borne Dis* 査読有、10: 328-335. doi: 10.1016/j.ttbdis. 2018.11.012
2. Matsuno Keita, Kajihara Masahiro, Nakao Ryo, Nao Naganori, Mori-Kajihara Akina, Muramatsu Mieko, Qiu Yongjin, Torii Shiho, Igarashi Manabu, Kasajima Nodoka, Mizuma Keita, Yoshii Kentaro, Sawa Hirofumi, Sugimoto Chihiro, Takada Ayato, Ebihara Hideki. (2018) The Unique Phylogenetic Position of a Novel Tick-Borne Phlebovirus Ensures an Ixodid Origin of the Genus *Phlebovirus*. *mSphere* 査読有、3: e00239-18. doi: 10.1128/mSphere. 00239-18
3. Matsuno K, Nonoue N, Noda A, Kasajima N, Noguchi K, Takano A, Shimoda H, Orba Y, Muramatsu M, Sakoda Y, Takada A, Minami S, Une Y, Morikawa S, Maeda K. (2018) Fatal Tickborne Phlebovirus Infection in Captive Cheetahs, Japan. *Emerging Infect Dis* 査読有、24: 1726-1729. Doi: 10.3201/eid2409.171667
4. Nakao R, Matsuno K, Qiu Y, Maruyama J, Eguchi N, Nao N, Kajihara M, Yoshii K, Sawa H, Takada A, Sugimoto C. (2017) Putative RNA viral sequences detected in an *Ixodes scapularis*-derived cell line. *Ticks Tick Borne Dis* 査読有、8: 103-111. doi: 10.1016/j.ttbdis. 2016.10.005
5. Matsuno K, Orba Y, Maede-White K, Scott D, Feldmann F, Liang M, Ebihara H. (2017) Animal Models of Emerging Tick-Borne Phleboviruses: Determining Target Cells in a Lethal Model of SFTSV Infection. *Front Microbiol* 査読有、8: 104. doi: 10.3389/fmicb. 2017.00104

[学会発表](計 10 件)

1. Keita Mizuma, Keita Matsuno, Masatoshi Okamatsu, Ayato Takada, Yoshihiro Sakoda. In-depth analysis of viral and host RNAs interacting with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) nucleoprotein N. 日本ウイルス学会北海道支部 平成 30 年度 夏季シンポジウム. 2018.

2. Ryo Nakao, Gohta Kinoshita, Ayumi Saito, Yongjin Qiu, Keita Matsuno, Chihiro Sugimoto, Ken Katakura. Complete mitochondrial genome analysis of ticks. 14th International Congress of Parasitology. 2018.
3. Kasajima N, Matsuno K, Torii S, Hiono T, Okamatsu M, Ebihara H, Sakoda Y. Suppression of PKR signaling pathway by nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017.
4. Keita Matsuno, Masahiro Kajihara, Syun-ichi Urayama, Ryo Nakao, Miho Hirai, Yongjin Qiu, Takuro Nunoura, Aaron S Mweene, Bernard M Hang'ombe, Martin Simuunza, Masatoshi Okamatsu, Yoshihiro Sakoda, Hirofumi Sawa, Ayato Takada. Discoveries of novel viruses in ticks and fruit bats by using FLDS method and MinION sequencer. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017.
5. 松野 啓太. 2 つの現場から:ダニ媒介性ウイルスの網羅的探索と鳥インフルエンザの診断. 第 6 回生命医薬情報学連合大会. 2017.
6. Shiho Torii, Keita Matsuno, Masahiro Kajihara, Ryo Nakao, Naganori Nao, Yongjin Qiu, Manabu Igarashi, Akina Mori-Kajihara, Mieko Muramatsu, Kentaro Yoshii, Chihiro Sugimoto, Ayato Takada, Hirofumi Sawa, Hideki Ebihara. Discovery and characterization of novel tick-borne phleboviruses in ticks collected in Hokkaido. 第 16 回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2017.
7. 松野 啓太, 笠島 和, 野々上範之, 野田亜矢子, 南 心司, 宇根有美, 前田 健. 動物園におけるダニ媒介性ウイルス感染症によるチーターの死亡. 第 63 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会. 2017.
8. Keita Matsuno, Masahiro Kajihara, Nodoka Kasajima, Ryo Nakao, Shiho Torii, Hiroshi Shimoda, Ken Maeda, Ayato Takada, Hideki Ebihara, Hirofumi Sawa. Genetic diversity among phleboviruses identified in ticks; implication of distinct evolutionary pathways of phleboviruses. 第 16 回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2017.
9. 松野 啓太, 下田 宙, 鳥居 志保, 邱 永晋, Brandi Williamson, 中 尾 亮, 梶原 将大, 岡松 正敏, 迫田 義博, 奥村 敦, 高田 礼人, 澤 洋文, Tom Schwan, 前田 健, 海老原 秀喜. マダニ中に見られるフレボウイルスの遺伝的多様性. 第 24 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー. 2016.
10. Keita Matsuno, Yasuko Orba, Kimberly Maede-White, Dana Scott, Friederike Feldmann, Hirofumi Sawa, Hideki Ebihara. The animal models for the emerging tick-borne phleboviruses: identification of target cells in a lethal model of SFTSV infection. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016.

[その他]

1. 産経新聞. マダニ感染でチーター 2 匹死ぬ 広島、動物公園で 重症熱性血小板減少症候群か. 2017 年 8 月 18 日. <https://www.sankei.com/west/news/170818/wst1708180047-n1.html>
2. 朝日新聞. チーター 2 頭、マダニ媒介の感染症で死ぬ 広島の動物園. 2017 年 8 月 18 日. <https://www.asahi.com/articles/ASK8L53PQK8LP1TB00L.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：梶原 将大
 ローマ字氏名：Masahiro Kajihara

研究協力者氏名：海老原 秀喜
 ローマ字氏名：Hideki Ebihara

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。