

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05991

研究課題名（和文）高病原性新興ボルナウイルスの感染リスク評価と病原性に関する研究

研究課題名（英文）Risk assessment and pathogenicity of highly pathogenic emerging bornavirus

研究代表者

牧野 晶子（Makino, Akiko）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：30571145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトに致死性脳炎を引き起こすリス由来新型ボルナウイルス(カワリリスボルナウイルス:VSBV)は、新しい脅威となる人獣共通感染症の病原体である。本研究では、同ウイルスの病原性発現機構の解明を目的とした。VSBVと遺伝的に近縁であり、ヒトに低病原性と考えられるボルナ病ウイルス(BoDV)の組換え技術を応用し、高病原性のVSBVとのキメラウイルスを人工合成して、ラットにおける病原性を評価した。VSBVのX/P遺伝子を持つキメラBoDVは、野生型のBoDVと比較した高い致死率を示し、脳内ではサイトカインの発現上昇が観察された。VSBVはBoDVよりも高い病原性を持つ可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにとって脅威となる新興感染症は、ヒトと動物との間で伝播感染する人獣共通感染ウイルスによって引き起こされる。特定地域に限局していたウイルスの流行はグローバル化社会においては容易に国境を超え、世界を標的に広がる大流行へと変容する。我が国で脅威となっているダニ媒介性ウイルスSFTSVのように、新興ウイルスの自然宿主である野生動物や節足動物でのウイルス制御は困難であり、その発生と流行を予測することは極めて難しい。そのため、早期に新興感染症の感染リスクを把握することの重要性は明白である。本研究で新興人獣共通感染症の一つであるVSBVの病原性を明らかにしたことは公衆衛生上意義深いと言える。

研究成果の概要（英文）：The novel squirrel-derived bornavirus (VSBV), which causes lethal encephalitis in humans, is a new threatening zoonotic pathogen. In this study, we applied the recombinant technology of Borna disease virus (BoDV), which is genetically closely related to VSBV and considered to be less pathogenic to humans, to artificially synthesize a chimeric virus with highly pathogenic VSBV and evaluate its pathogenicity in rats. The chimeric BoDV with VSBV's X/P gene showed higher lethality than the wild-type BoDV and increased expression of cytokines in the brain, indicating that VSBV may be more pathogenic than BoDV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

ヒトにとって脅威となる**新興感染症**は、鳥インフルエンザやジカウイルス、そしてダニ媒介性ウイルス感染症などのように、その多くはヒトと動物との間で伝播感染する**人獣共通感染ウイルス**によって引き起こされる。特定地域に限局していたウイルスの流行はグローバル化社会においては容易に国境を超え、世界を標的に広がる大流行へと変容する。我が国で脅威となっているダニ媒介性ウイルス SFTSV のように、**新興ウイルスの自然宿主である野生動物や節足動物でのウイルス制御は困難であり、その発生と流行を予測することは極めて難しい。そのため、早期に新興感染症の感染リスクを把握することの重要性は明白である。**

2015年にドイツで、原因不明の急性脳炎または髄膜脳炎を起こして亡くなった男性3名の検体の網羅的な塩基配列解読により、**カワリリスボルナウイルス (VSBV)**が発見された (Hoffmann B et al., N Engl J Med, 2015)。死亡患者は3名とも中米原産のカワリリスを飼育しており、VSBVはこのリスが保有していたウイルスが伝播したものと考えられた。VSBVはヒトへ高い病原性を示す新興人獣共通感染症の病原体である。一方、最近の報告によりアジア産のリスも高い割合でVSBVを保有していることが報告されている。しかしながら、VSBVの分離例は少なく、またその拡散状況や病原性に関する研究はほとんどないのが現状である。

VSBVと遺伝的に近縁である**ボルナ病ウイルス (BoDV)**は、ヒツジやウマに中枢神経性の疾患を引き起こすが、VSBVとは異なり、ヒトへの病原性は低いと考えられている。申請者はこれまでに、VSBVの遺伝子を人工合成して、各遺伝子の培養細胞での機能をBoDVと比較した。その結果、ウイルスの複製複合体の構成因子であるP遺伝子の自然免疫の抑制機能に違いがあることを明らかにしている。BoDVのP遺伝子には、強い自然免疫抑制作用があるが、VSBVにはそれが見られない。P遺伝子はBoDVの病原性に関与することが報告されており、申請者が明らかにした機能の違いがBoDVとVSBVのヒトへの病原性の差異に関与する可能性も考えられた。

VSBVはドイツおよびオランダの飼育施設にいる *Sciurinae* 亜科と、*Callosciurinae* 亜科のリスの3.5%から検出されている。本邦に生息するリスのうち上述の亜科に分類されるのは、ニホンリス、キタリス、エゾリス、クリハラリスである。クリハラリスは愛玩用に飼育されていた動物が野生化して爆発的に繁殖し、特定外来生物に指定され、神奈川県では年間2000-4000頭が殺処分されている。クリハラリスはヒトの生活圏にも広く生息し本州に点在して分布する。しかしながら、これら本邦のリスにおけるVSBVの感染状況は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究における「**問い**」は、**VSBVはなぜヒトに高い病原性を示すのか、そして本ウイルスはわが国で新しい脅威となるのか、**の2点である。この問い答えるため、VSBVの**日本国内における感染拡大リスクの評価と同ウイルスの病原性発現の分子基盤の解明**を目的として研究をおこない、**同病原体の早期制御による蔓延阻止**を目指す。

3. 研究の方法

有害捕獲されたクリハラリスは、神奈川県横須賀三浦地域県政総合センター環境部みどり課から提供される。検体の脳、腎臓、胸腺、糞便からRNAを抽出し、VSBV配列特異的なプライマーセットによるRT-PCR法を用いてVSBVの検出をおこなう。

1-1. VSBVの分離および塩基配列解読

VSBVのRNAが検出された検体について、Vero細胞を用いてウイルス分離をおこなう。ウイルス接種1ヶ月後に、免疫染色法およびRT-PCR法によりウイルスタンパク質とRNAの検出をおこなう。申請者は抗BoDV抗体がVSBV抗原に交差することをすでに明らかにしているため、同抗体をウイルス検出用の免疫染色に使用する。分離したウイルスの塩基配列をサン

ガー法により決定する。

1-2. VSBV の実験動物への感染実験

1-2 で分離した VSBV を新生仔ラットおよびマウス、またはアカゲザルの成体に接種することで病原性を評価する。ウイルスは 10^3 感染単位を脳内投与する。接種後 1 ヶ月間の体重および体温と生存率を測定する。ウイルス接種後 24-72 時間の感染個体の末梢血を採取してサイトカインを定量することで、感染個体中の自然免疫応答を評価する。ウイルス接種 1 ヶ月後にすべての動物を安楽殺して脳、胸腺、糞便におけるウイルス RNA およびタンパク質の検出、病理解析をおこなう。さらに BoDV 排除に効果があるファビピラビルが VSBV に対して抗ウイルス作用を持つかを評価する。

2-1. VSBV リバースジェネティクス法の確立

ウイルス RNA を発現するプラスミドとウイルスのポリメラーゼ複合体を発現するヘルパープラスミドを細胞に導入することで、任意の配列を持つウイルスを作製するリバースジェネティクス法が BoDV において確立されている。申請者は VSBV のリバースジェネティクスに必要なプラスミドの作製に成功しており、本研究ではそれを用いてキメラウイルスおよびレポーター発現ウイルスを人工的に作製する。

2-2. BoDV と VSBV のキメラウイルスの病原性評価

低病原性 BoDV と高病原性 VSBV における P 遺伝子の自然免疫誘導抑制機能の違いが病原性の差異に関与するかを明らかにするため、両ウイルス間で遺伝子のキメラウイルスを作製する。作製したキメラウイルスを新生仔ラットおよびマウス、または成体アカゲザルへ接種することで、病原性を評価する。病原性評価は 1-2 に記載した方法に従う。さらに P 以外の遺伝子を組換えたキメラウイルスも作製することで、VSBV の病原性発現に関与するウイルス遺伝子を同定する。

4. 研究成果

1. 神奈川県のカリハリリスにおける VSBV 保有状況の調査

カリハリリス 40 頭から脳を取り出し、乳剤から RNA を抽出して、VSBV の N 遺伝子特異的なプライマーで RT-PCR をおこなうことで、同動物の VSBV 保有状況の評価した。その結果、すべての脳においてウイルス RNA は検出されなかった。少なくとも調査したカリハリリスは VSBV に感染していないと考えられたが、入手可能なのが 40 頭であったため、この結果から日本において VSBV は発生しえないと結論づけることはできなかった。VSBV の病原性評価は野生分離株ではなく、人工合成したウイルスを用いることにした。

2. VSBV の人工合成

発見当初に公開された VSBV のゲノム配列情報からそのアンチゲノムの全長 cDNA を人工合成して、pCAGGS に挿入した。作製したプラスミドをヘルパープラスミドとともに 293T 細胞に導入したが感染性のウイルスを得ることはできなかった。そこで 2019 年時点で分離された VSBV26 株の配列をアライメントしコンセンサス配列を得て、その相補的な配列の全長 cDNA を pCAGGS に挿入した。上述と同様の方法でウイルスのレスキューを試みたところ、コンセンサス配列を持つ感染性の組換え VSBV の作出に成功した。組換え VSBV は培養細胞における増殖性は BoDV と比較して著しく低く、

3. BoDV と VSBV のキメラウイルスの病原性評価

BoDV の病原性に関与すると考えられている X/P 遺伝子を VSBV の同遺伝子と置換したキメラウイルスを 2 の方法で作製した。作製したキメラウイルスは培養細胞での増殖性および力価において、組換え BoDV と有意な差を示さなかった。しかしながら、成ラットに組換え BoDV またはキメラウイルスを接種して生存率を評価したところ、BoDV 感染ラットは生存率が 100% であったのに対して、キメラウイルス感染ラットはすべての個体が死亡した。このことから、VSBV の X/P 遺伝子はボルナウイルスの病原性上昇に関与する可能性が示唆された。感染ラット脳内のウイルス力価を測定したところ、キメラウイルスが BoDV と比較して有意に高い力価

を示した。BoDV の P 遺伝子は自然免疫抑制作用がある一方で、VSBV の P 遺伝子はそれを示さない。そこで BoDV またはキメラウイルス感染ラットの脳から RNA を抽出して、ボルナウイルス感染で上昇する免疫関連遺伝子の mRNA を相対的に定量した。その結果、キメラウイルス感染ラットにおいて、CXCL10、IL6 などのサイトカインが BoDV 感染ラットと比較して有意に上昇していた。これらのことから、VSBV の X/P 遺伝子を持つキメラウイルスは野生型の BoDV と比較して生体内での増殖性と病原性が高く、自然免疫抑制作用が減弱していることが明らかとなった。野生型の VSBV の病原性については今後解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yanai M, Kojima S, Sakai M, Komorizono R, Tomonaga K Makino A	4. 巻 94
2. 論文標題 ADAR2 Is Involved in Self and Nonself Recognition of Borna Disease Virus Genomic RNA in the Nucleus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01513-19.	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 Komorizono R, Tomonaga K, Makino A	4. 巻 275
2. 論文標題 Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of parrot bornavirus 4.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 113749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2019.113749.	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Akiko Makino, Chiaki Tanaka, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Pathogenicity of variegated squirrel bornavirus
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Makino, Ryo Komorizono, Madoka Sakai, Mako Yanai, Reiko Soga, Junichi Kamiie, Chinatsu Fujiwara, Naoyuki Aihara, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Outbreak of avian bornaviruses in pet bird breeding facilities in Japan
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Makino, Yutaro Yamamoto, Yuya Hirai, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Translational regulation of Borna disease virus
3. 学会等名 Negative Strand Virus 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Makino, Yutaro Yamamoto, Yuya Hirai, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Borna disease virus utilizes IGF2BP2 for translational regulation.
3. 学会等名 EUROPEAN SEMINARS IN VIROLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Makino, Kan Fujino, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Generation of chimeric mammalian orthobornavirus
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分担 者	朝長 啓造	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授	
	(Tomonaga Keizo)		
	(10301920)	(14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------