

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14599

研究課題名（和文）ジカウイルス受容体の網羅的探索とモデル動物における病原性発現機構解析の新展開

研究課題名（英文）Development of animal model of Zika virus infection and identification of Zika virus receptors

研究代表者

谷口 怜（Taniguchi, Satoshi）

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：60734465

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）：2016年のジカウイルス感染症の流行は、胎児における小頭症の発生やギランバレー症候群との関係性が疑われ、また性行為による感染の可能性により社会的インパクトを与えた。本研究ではジカウイルスの胎児における病原性発現機構の解析のため、マーモセットを用いて、妊娠感染モデル動物の確立及びその病態解析をおこなった。その結果、妊娠マーモセットにジカウイルス感染が生じると流産が惹起され、その妊娠に関連した母体及び胎仔組織では非常に多いウイルス遺伝子が検出されることが明らかとなった。また、その他にCas9恒常発現細胞を作製した。今後、ジカウイルス等のウイルス受容体の網羅的探索のためのツールとなると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスを用いたジカウイルスの妊娠感染モデルは多く報告されているが、より詳細な解析を行う上では、よりヒトに近い霊長類の妊娠感染モデルの確立が好ましい。旧世界ザルを用いた感染モデルの報告もあるが、一度に多くの感染動物を扱えないこと、妊娠期間が長期に及ぶこと、妊娠適齢個体を用意することの難しさから適切な動物モデルとは言い難い。その点、マーモセットは小型で取り扱いが容易であり、妊娠期間も他の霊長類と比較して短いことからマーモセットを用いたジカウイルスの妊娠感染モデルが確立されたことは意義深い。また、様々な種のCas-9恒常発現細胞を作製したことは今後のウイルス受容体研究に非常に役に立つと考えている。

研究成果の概要（英文）：A widespread epidemic of Zika fever, caused by Zika virus, occurred in South America in 2016. The evidence that Zika virus infection to pregnant woman can cause microcephaly in the fetus has been reported. Besides, it has been reported that Zika virus infection in adults can result in Guillain-Barre syndrome. To understand Zika virus pathogenicity, non-human primate pregnant animal model using common marmoset was established and analyzed. The results suggested that Zika virus infection caused miscarriage to maternal marmosets in first trimester pregnancy and Zika virus propagated in organs such as uterus and placenta. Besides, Cas9-expressing cell lines were established to analyze the entry mechanism of Zika virus. These cell lines will help us to identify new entry receptors of Zika virus and other viruses in the future study.

研究分野：獣医学、ウイルス学

キーワード：モデル動物 ジカウイルス 妊娠 マーモセット

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) デング熱、ジカウイルス感染症、ダニ媒介脳炎、重症熱性血小板減少症候群など、近年多くのアルボウイルス感染症が公衆衛生上問題視されてきている。2016年、ジカウイルス感染症の南米における流行では、胎児における小頭症の発生やギランバレー症候群との関係性が疑われ、また性行為による感染の可能性により社会的インパクトを与えた。
- (2) ジカウイルスのモデル動物としてはマウス、アカゲザルが報告されている(Morrison TE et al., *J Virol*, 2017)。特にマウスを用いた研究では、妊娠モデルにおいて小頭症の発生が再現され、オスマウスでは精巣の萎縮や精子への感染も報告されている。申請者の所属部署ではジカウイルス 2 株 (MR766 株、PRVABC59 株) を新世界ザルであるマーモセットに接種しジカウイルス感受性を確認していた。特に PRVABC59 株を接種したマーモセットではウイルス血症が持続し、感染 2 週間後においてもウイルスゲノムが尿中から検出されヒトにおける感染例と似た傾向がみられた。
- (3) ウイルスの細胞侵入機構の解明は抗ウイルス薬の開発、ウイルスの宿主における病原性発現機構を明らかにするといった面で非常に重要な知見をもたらす。フラビウイルスの中でも特にデングウイルスでは詳細な解析がなされており、CD14、DC-SIGN、HSP70/HSP90、Fc-receptor など多くの宿主因子が受容体として報告されている (Boldescu V et al., *Nat Rev Drug Discov*, 2017)。その一方でジカウイルスの細胞侵入機構は、Axl や TIM1 の関与が報告されているものの、未だに不明な点が多い(Meertens L et al., *Cell Rep*, 2017, Hamel R, et al. *J Virol*, 2015)。

### 2. 研究の目的

以下の 2 項目を研究目的とした。

- (1) モデル動物におけるウイルスの病原性発現機構の解析を行う。
- (2) ジカウイルスの細胞侵入時の新規受容体を同定する。

### 3. 研究の方法

- (1) ジカウイルスの病態の特徴として小児における小頭症が挙げられる。そこでマーモセットを用いた妊娠モデルの確立を目指した。マーモセットの妊娠期間は 144 日である。妊娠前期のマーモセット 3 頭 (#5375, #5376, #5377)、妊娠後期のマーモセット 1 頭 (#5421) にジカウイルス PRVABC59 株を  $1 \times 10^6$  PFU 背部皮下に接種した。また、コントロールとして妊娠後期のマーモセット 1 匹 (#5423) に培地を接種した。それぞれ接種後、観察、血液、咽頭スワブ、尿の回収を行った。また、感染マーモセットは感染後 8 日目、9 日目に剖検、各種臓器、胎仔試料を採材し、ウイルス学的解析を行った。
- (2) ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 システムを用いて網羅的にジカウイルスの新規受容体、感染に必須な宿主因子を探索することを目指した。組換えレンチウイルスを作製、種々の細胞株に感染させることで各種 Cas9 恒常発現細胞株を樹立、CRISPR ガイド RNA ライブラリーを導入し、ジカウイルスを感染、感染耐化した細胞のノックアウト遺伝子を探索することでジカウイルスの感染に必須な宿主因子が明らかになると考えた。

### 4. 研究成果

- (1) 妊娠前期のマーモセット 3 頭のうち 1 頭 (#5376) は感染後 2 日目に流産を生じた。また、別の 1 頭 (#5375) は感染 8 日目に流産を生じた。残りの 1 頭 (#5377) は妊娠を維持していたが、エコーにより胎仔を観察した結果、心音が微弱となっている事が観察された。#5375, #5377 を 8 日目に剖検、各種主要臓器、胎仔試料、胎盤等を採材した。ウイルス学的解析、病理学的解析を行ったところ、子宮内膜、子宮、胎盤で非常に高いウイルス遺伝子量が検出された (図 1)。また、#5375 の子宮残留物、#5377 の子宮からジカウイルス抗原が検出された (図 2)。接種後、経時的に採材した血清 (図 3)、咽頭スワブ、尿からもウイルス遺伝子が感染 8 日目の剖検時まで検出された。また、#5377 の胎仔 2 頭からも非常に高いウイルス遺伝子量 ( $4.8 \times 10^8$  /g 及び  $3.7 \times 10^7$  /g) が検出され、羊水中からもウイルス遺伝子が検出された ( $1.8 \times 10^5$  /ml)。妊娠後期に感染させたマーモセット (#5421) は感染 9 日目に剖検を行い、妊娠前期マーモセットと同様の解析をおこなった。接種後、経時的に採材した血清、咽頭スワブ、尿からもウイルス遺伝子が感染 9 日目の剖検時まで検出された (図 4)。母体の主要臓器からは脳をのぞいてウイルス遺伝子が検出され、特にリンパ節、腸管、妊娠関連臓器 (子宮、胎盤等) で高いウイルス遺伝子量が検出された (図 4)。さらに採材された 3 頭の胎仔 (A-C) について剖検、臓器ごとのウイルス遺伝子検出を試みた。その結果、胎仔血清、羊水はウイルス遺伝子陰性であつ

たが、大脳、小脳、肝臓等の臓器からウイルス遺伝子が検出された(図5)。また、臍帯から非常に高いウイルス遺伝子量が検出されたが、臍帯血、血清からのウイルス遺伝子検出は1頭のみであった。妊娠初期、後期ともに感染8 or 9日目には子宮及び胎盤組織を中心に高いウイルスゲノムコピー数が検出された。妊娠初期の胎盤組織ではウイルス抗原が検出されていることから胎盤はジカウイルスの増殖の場であると考えられる。妊娠後期の母体から採材された胎仔の血清中からはウイルスゲノムが検出されないが、臓器からはウイルスゲノムが検出された。このことは胎仔においてウイルス血症が終了したが各臓器にウイルスが感染した可能性を示唆している。親マーモセットの小腸、大腸、腸間膜リンパ節から高いウイルスゲノム量が検出されたことはこれらの組織がウイルス増殖の場である可能性を示唆している。

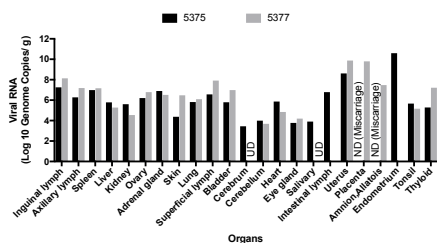


図1: 妊娠前期感染マーモセットの各臓器におけるウイルス遺伝子量

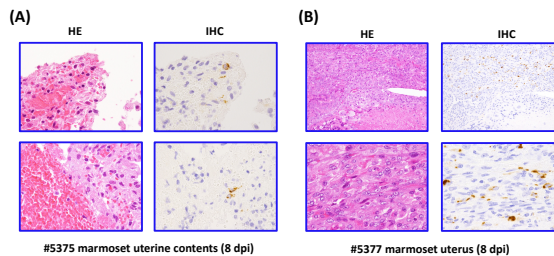


図2: 妊娠前期感染マーモセットの子宮および子宮内容物における病理学的解析 (A) #5375の子宮内容物。(B) #5377の子宮。

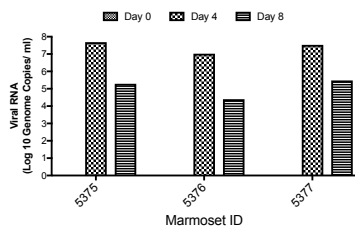


図3: 妊娠前期感染マーモセットの血清におけるウイルス遺伝子量

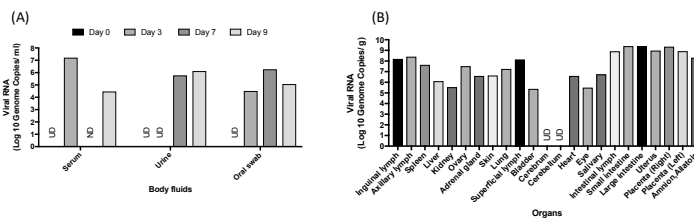


図4: 妊娠後期感染マーモセットにおけるウイルス遺伝子量 (A) 血清、尿、唾液におけるウイルス遺伝子量。(B) 各種主要臓器におけるウイルス遺伝子量。

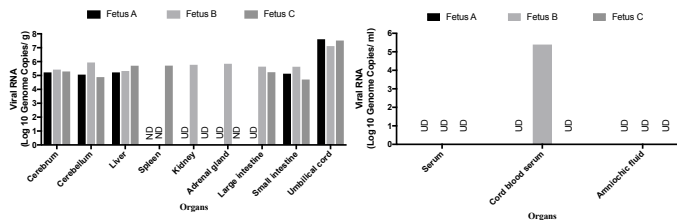


図5: 妊娠後期感染マーモセットの胎仔におけるウイルス遺伝子量 (A) 胎仔の主要臓器におけるウイルス遺伝子量。(B) 各胎仔の血清、臍帯血、羊水におけるウイルス遺伝子量。

(2) 293T 細胞にレンチウイルスベクター用プラスミド(pMDLg/pRRE, pMD2.G, pRSV-Rev)およびブラストサイジン、Cas9 の遺伝子をもつレンチウイルス搭載用プラスミド(lenti-Cas9-Blast)をトランスフェクションし上清を回収、Cas9 発現用レンチウイルスを作製した。この Cas9 発現用レンチウイルスを種々のヒト由来培養細胞株へ感染した。その後、薬剤存在下、Cas9 発現細胞を選択、クローニングを行なった。その結果、293T 細胞、A549 細胞、IMR-32 細胞、SK-N-SH 細胞、HTR-8/SVneo 細胞、HeLa229W 細胞でブラストサイジン存在下での培養で細胞の生存が確認され、クローニングに成功した。クローニングを終了した細胞株に対しては抗 Cas9 抗体を用いたウエスタンブロット法を行い、Cas9 タンパク質の発現を確認した。今後これらの細胞に対して CRISPR ライブラリーの sgRNA を保持したレンチウイルスを感染させ、細胞遺伝子にランダムな変異を導入、種々の病原性の異なるジカウイルス株を感染させる予定であり、感染後生存した細胞コロニーにおける遺伝子変異導入部分を同定し新規受容体の同定を行う予定であったが、未だ実施できていない。今後、実施予定である。また、これらの Cas9 恒常発現細胞株はジカウイルスに限らず、その他のウイルスの感染に必須な因子の探索にも用いることができると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kawai Yasuhiro, Nakayama Eri, Takahashi Kenta, Taniguchi Satoshi, Shibasaki Ken-ichi, Kato Fumihiro, Maeki Takahiro, Suzuki Tadaki, Tajima Shigeru, Saijo Masayuki, Lim Chang-Kweng.	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased Growth Ability and Pathogenicity of American- And Pacific-subtype Zika Virus (ZIKV) Strains Compared With a Southeast Asian-subtype ZIKV Strain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0007387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0007387.	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 Taniguchi Satoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Detection of Jingmen Tick Virus in Human Patient Specimens: Emergence of a New Tick-Borne Human Disease?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 18-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2019.04.034.	査読の有無 無
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 Matsui Toshihiro, Kinoshita Noriko, Maeki Takahiro, Kutsuna Satoshi, Nakamura Keiji, Nakamoto Takahito, Ishikane Masahiro, Tajima Shigeru, Kato Fumihiro, Taniguchi Satoshi, Lim Chang-Kweng, Saijo Masayuki, Ohmagari Norio	4. 巻 72
2. 論文標題 Dengue Virus Type 2 Infection in a Traveler Returning from Saudi Arabia to Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 340 ~ 342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2018.537	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 Maeki Takahiro, Tajima Shigeru, Ikeda Makiko, Kato Fumihiro, Taniguchi Satoshi, Nakayama Eri, Takasaki Tomohiko, Lim Chang-Kweng, Saijo Masayuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Analysis of cross-reactivity between flaviviruses with sera of patients with Japanese encephalitis showed the importance of neutralization tests for the diagnosis of Japanese encephalitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 786 ~ 790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.04.003	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 Tajima Shigeru, Shibasaki Ken-ichi, Taniguchi Satoshi, Nakayama Eri, Maeki Takahiro, Lim Chang-Kweng, Saijo Masayuki	4. 巻 5
2. 論文標題 E and prM proteins of genotype V Japanese encephalitis virus are required for its increased virulence in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e02882 ~ e02882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2019.e02882	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 Tajima Shigeru, Taniguchi Satoshi, Nakayama Eri, Maeki Takahiro, Inagaki Takuya, Lim Chang-Kweng, Saijo Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Amino Acid at Position 166 of NS2A in Japanese Encephalitis Virus (JEV) Is Associated with In Vitro Growth Characteristics of JEV	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 709 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12070709	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 Taniguchi Satoshi, Yoshikawa Tomoki, Shimojima Masayuki, Fukushi Shuetsu, Kurosu Takeshi, Tani Hideki, Fukuma Aiko, Kato Fumihiro, Nakayama Eri, Maeki Takahiro, Tajima Shigeru, Lim Chang-Kweng, Ebihara Hideki, Kyuwa Shigeru, Morikawa Shigeru, Saijo Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of the Function of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus S Segment Untranslated Region on Growth Capacity In Vitro and on Virulence In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 896 ~ 896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12080896	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 該当する

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Satoshi Taniguchi, Chang-Kweng Lim, Takahiro Maeki, Shigeru Tajima, Eri Nakayama, Fumihiro Kato, Nor Azila Muhammad Azami, Yasushi Ami, Tadaki Suzuki, Meng Ling Moi, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo
2. 発表標題 Evaluation of vertical infection of pregnant marmosets with Zika virus
3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林昌宏、谷口怜、Nor Azila Muhammad Azami、網康至、鈴木忠樹、モイメンリン、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、前木孝洋、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、西條政幸
2. 発表標題 Evaluation of usefulness of Zika virus infected pregnant marmoset as a Zika virus vertical infection animal model
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口怜、中山絵里、河合康洋、加藤文博、前木孝洋、田島茂、西條政幸、林昌宏
2. 発表標題 Development of animal model for Zika virus vertical infection using embryonic day 9.5 pregnant Ifnar-/- mice
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口怜、Moi Meng Ling、Muhammad Azami Nor Avila、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、高崎智彦、田島茂、林昌宏、西條政幸
2. 発表標題 ジカウイルス感染モデルとしてのコモンマーモセットの有用性の評価
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------