

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13701

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0192

研究課題名（和文）最先端イメージング技術を活用した狂犬病ウイルス野外株の末梢感染機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of neuroinvasive mechanism of rabies street viruses by using cutting-edge imaging techniques

研究代表者

伊藤 直人 (Ito, Naoto)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20334922

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、狂犬病ワクチンを補助・代替する予防薬の開発をゴールとして、狂犬病ウイルス野外株の末梢感染におけるP蛋白質アイソフォームP2-5の重要性・役割の解明を試みた。野外株の1088株および小松川株の遺伝子操作により、それぞれのP2-5欠損株を作出し、増殖性・病原性（末梢感染性）を検討した。1088株の欠損株が増殖性、病原性が共に低下したのに対し、小松川株の欠損株ではこれらに顕著な変化は見られなかった。生体イメージング用の1088株の欠損株の作出を試みたが、原因不明の問題により著しい増殖性の低下が確認された。uDISCO法による3D組織イメージングについても詳細な条件検討が課題として残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成績は、今後、より詳細な検討が必要ではあるものの、狂犬病ウイルス野外株の病原性（末梢感染性）におけるP2-5アイソフォーム重要性はウイルス株ごとに異なることが示唆された。このことより、P2-5アイソフォームを標的として、どんなウイルス株にも対応可能な狂犬病予防薬を開発することは困難である可能性が高い。今後は、別のウイルス蛋白質を標的とした予防薬の開発にリソースを注ぐことが望ましいと判断できた。

研究成果の概要（英文）：In this study, with the goal of developing a prophylactic agent, which can supplement or replace rabies vaccine, we aimed to elucidate the importance and roles of rabies virus P protein isoforms P2-5 in the peripheral infection of the field strains. We generated P2-5-deficient strains of the 1088 and Komatsugawa strains, respectively, by viral gene manipulation and examined their propagation and virulence (peripheral infectivity); the 1088-deficient strain showed decreased propagation and virulence, whereas the Komatsugawa-deficient strain showed no significant changes in these properties. Generation of the 1088 strain for in vivo imaging was attempted, but a significant decrease in its growth was observed due to an unexplained problem. Detailed examinations to optimize conditions for 3D tissue imaging using the uDISCO method also will be needed.

研究分野：獣医学

キーワード：狂犬病ウイルス 野外株 末梢感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は、重篤な神経症状、ほぼ 100% の致死率を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。狂犬病ウイルスは、感染動物による咬傷から体内に侵入後、筋肉細胞での増殖を経て神経系に感染し、脳炎を発症させる。現在、本病に対する有効かつ確実な治療法は存在しない。その結果として、ワクチン不足が深刻な発展途上国を中心に、毎年 5.9 万人が狂犬病により死亡している。これは約 10 分間に 1 人が本病の犠牲となっていることを意味する。長年続くワクチン不足の問題は、現在も解決の糸口が見えない。このような状況を打開するため、ワクチンを代替・補助するような狂犬病予防薬を開発が望まれるものの、その基盤となる狂犬病ウイルスの末梢感染機序に関する情報が不足しているため実現には至っていない。

狂犬病ウイルスの自然免疫回避において重要な役割を担う P 蛋白質には、5 種類のアイソフォーム (P1-5) が存在する。P 遺伝子 mRNA には 5 つの開始コドンがあり、1 番目から P1 が、5 番目から P5 が翻訳される [文献 1] 特に、P2-5 は、プロフェッショナルな IFN アンタゴニストとして自然免疫の回避に関与する。以前、研究代表者らは、主に *in vitro* の成績に基づき、狂犬病ウイルス実験室株の P2-5 が、IFN アンタゴニスト活性により筋肉細胞でのウイルス増殖を促すことで、末梢神経の感染を促進していることを示唆した [文献 2] 一方、野外株の病原性における P2-5 の重要性、実際の体内での感染動態において P2-5 が果たす役割は不明である。

従来、体内での感染動態を評価するため、ウイルスを実験感染させたマウス等を用いた病理組織学的検討が行われてきた。しかし従来法では、限定された領域の組織切片を観察するため、切片以外の領域に発生した重要な現象を見逃すリスクがある。また、組織の採取のためにマウスを安楽死させるため、同一個体中の感染動態を検討することはできない。しかし、生体イメージング法および uDISCO 法を用いることで、このような従来法の問題点を解決できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ワクチンを代替・補助する狂犬病予防薬の開発をゴールとして、狂犬病ウイルス野外株の末梢感染機序を解明することを目的とする。本採択課題では、特に、IFN アンタゴニストである P2-5 の役割を明らかにする。以前の研究のほとんどが、野外株を実験動物や培養細胞で連続継代することで樹立された実験室株を用いてきた。しかし、実際の狂犬病の原因となる野外株の性状は、実験室株と大きく異なる。複数の野外株を用いて P2-5 の重要性を検討することで、予防薬開発のための基盤情報の精度を格段に高めることができる。

3. 研究の方法

(1) 本研究で使用した狂犬病ウイルス株

本研究では、狂犬病ウイルス野外株の 1088 株および小松川株を使用した。なお、1088 株および小松川株は、それぞれアメリカのウッドチャックおよび日本の犬から分離された株である。なお、uDISCO 法および従来法の比較には、実験室株である西ヶ原株を使用した。

(2) 狂犬病ウイルス野外株、小松川株の遺伝子操作系の樹立および性状解析

次世代シーケンス解析により小松川株のゲノム全長の塩基配列を決定した後で、決定した配列に基づき、同株の完全長ゲノムプラスミドを作成した。このプラスミドは、常法に従い、T7RNA ポリメラーゼによりプラス鎖ゲノム RNA を発現するように構築された。その際、遺伝子マーカーとして、ゲノム塩基番号 3,962 および 5,083 位の塩基をそれぞれ A C および T A (プラス鎖 cDNA として表示) への塩基置換を導入した。前者は G 遺伝子アミノ酸コード領域における同義置換であり、後者は G-L 遺伝子間非コード領域に制限酵素 SpeI の認識配列が出現するように導入された置換とした。既報の方法 [文献 3] により、上記の完全長ゲノムプラスミドから感染性ウイルスを回収した。また、RT-PCR 法により G 遺伝子-L 遺伝子の一部を含む cDNA (3,566 bp) を増幅し、塩基配列決定あるいは SpeI 切断により、上記 2 種類の遺伝子マーカーの存在を確認した。

回収されたウイルス (Koma 株) をマウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞に感染多重度 (moi) 0.001 で接種することで増殖性を検討した。また、NA 細胞における Cell-to-Cell 感染能を評価する目的で、同細胞におけるフォーカスの平均面積を比較した。さらに、病原性を検討するため、 10^2 および 10^3 フォーカス形成単位のウイルスを 6 週齢 ddY マウスの大腿筋に接種した。21 日間の観察後、マウスの死亡数に基づき 50% 致死量 (LD₅₀) を算出した。

(3) 遺伝子操作系を用いた P2-5 欠損株の作出

1088 株の遺伝子操作系 [文献 4] および上記で樹立した小松川株の本系を用いて、P2-5 欠損

株を作出した。具体的には、P 遺伝子上に存在する P2-5 の開始コドン (AUG、プラス鎖 RNA として表示) のそれぞれを AUA に置換した。得られたウイルスを 1088ΔP2-5 株および KomaΔP2-5 株と命名した。なお、in vivo における 1088ΔP2-5 株の動態を生体イメージングにより検証する目的で、G-L 遺伝子間領域に赤色ホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入した 1088ΔP2-5/RFLuc 株も作出した。

(4) P2-5 欠損株の増殖性の評価

NA 細胞に 1088 株および 1088ΔP2-5 株、あるいは Koma および KomaΔP2-5 株を moi=0.001 にて接種することで各株の多段階増殖を比較した。

(5) P2-5 欠損株の病原性の評価

各株の病原性(末梢感染性)を評価する目的で、6 週齢の ddY マウスの大腿筋に 10⁴FFU の 1088 株および 1088ΔP2-5 株、あるいは Koma および KomaΔP2-5 株を接種した。接種マウスの生存率を 21 日間観察・記録した。

(6) uDISCO 法および従来法の比較

実験室株の西ヶ原株を筋肉内接種したマウスの脳を発症後に採取し、4%パラフォルムアルデヒド-リン酸緩衝液内で固定した。同一マウスの右脳、左脳を使用して uDISCO 法および従来法によりウイルス感染細胞の分布を比較した。uDISCO 法による検討については、ドイツのフリードリヒ・レフラー研究所のステファン・フィンケ博士に材料を送付し、実施を依頼した。

4. 研究成果

(1) 狂犬病ウイルス野外株、小松川株の遺伝子操作系の樹立と性状解析

小松川株のゲノム cDNA をクローン化した完全長ゲノムプラスミドを、ウイルス N、P および L 蛋白質発現プラスミドと同時に T7 RNA ポリメラーゼ恒常発現 BHK 細胞に導入した結果、感染性ウイルスの回収に成功した(図 1)。回収されたウイルスの G-L 遺伝子の一部を含む cDNA を RT-PCR 法により増幅した上で、増幅 cDNA を制限酵素 SpeI により切断した結果、プラスミドから回収されたウイルスに由来する cDNA の切断が確認された(図 2)。また、同 cDNA の塩基配列の決定により、ゲノム塩基番号 3,962 および 5,083 位に人為導入した遺伝子マーカーの存在も確認できた。以上より、完全長ゲノムプラスミドから感染性を有する Koma 株が回収されたことが明らかとなった。

NA 細胞を用いた検討により、Koma 株の増殖性および Cell-to-Cell 感染能は、野生型の小松川株と同等であることが明らかとなった。また、6 週齢マウスへの筋肉内接種により、Koma 株は小松川株と同様に致死的な感染を引き起こすことが確認された。Koma 株の LD₅₀ は 4.8x10² FFU と小松川株 (6.8x10² FFU) と同等であることが明らかとなった。

(2) P2-5 欠損株の作出

狂犬病ウイルス野外株の 1088 株および小松川株の遺伝子操作により、両株の P2-5 欠損株、それぞれ 1088ΔP2-5 株および KomaΔP2-5 株を作出することに成功した。いずれの株についても 10⁵ FFU 以上の感染価のウイルス保存液を調整することができたため、以下の実験に使用した。

一方、赤色ホタルルシフェラーゼを発現する 1088ΔP2-5/RFLuc 株については、その作出に成功したものの、通常のウイルスよりも顕著に増殖性が低く、十分な感染価のウイルス保存液を得

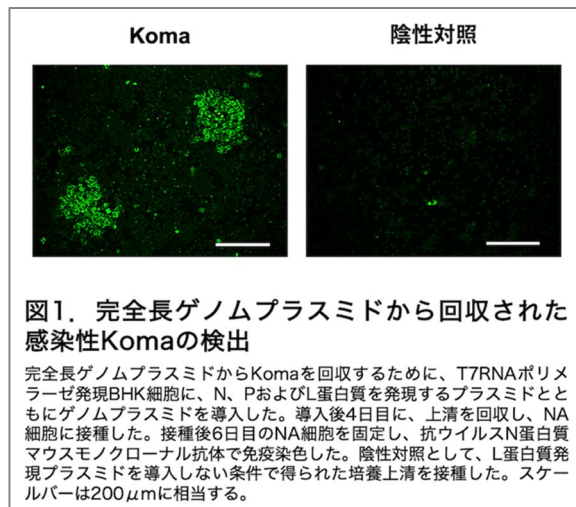


図1. 完全長ゲノムプラスミドから回収された感染性Komaの検出

完全長ゲノムプラスミドからKomaを回収するために、T7RNAポリメラーゼ発現BHK細胞に、N、PおよびL蛋白質を発現するプラスミドとともにゲノムプラスミドを導入した。導入後4日目に、上清を回収し、NA細胞に接種した。接種後6日目のNA細胞を固定し、抗ウイルスN蛋白質マウスモノクローナル抗体で免疫染色した。陰性対照として、L蛋白質発現プラスミドを導入しない条件で得られた培養上清を接種した。スケールバーは200μmに相当する。

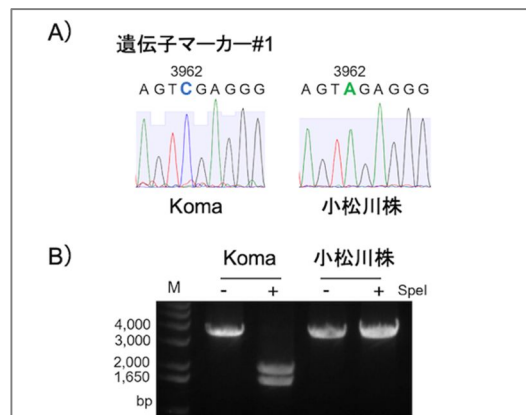


図2. Komaゲノム中の遺伝子マーカーの検出

A) Komaおよび小松川株のRT-PCR産物は、精製後、通常のサンガー法による塩基配列決定に供した。Koma遺伝子の遺伝子マーカー#1は、ヌクレオチド配列上に表示されている。B) Komaと小松川株の増幅されたcDNA断片を制限酵素SpeIで消化した後、電気泳動を行った。

ることができなかつた。本株を回収するための完全長ゲノムプラスミドの塩基配列の確認を行ったが特に異常は発見できず、増殖性低下の原因を特定することはできなかつた。

(3) P2-5 欠損株の増殖性

NA 細胞における多段階増殖曲線を比較した結果、1088ΔP2-5 株の増殖性は、その親株の 1088 株よりも顕著に低いことが示された (図 3A)。対照的に、KomaΔP2-5 株とその親株の Koma 株の増殖性の間には明瞭な差は認められなかつた (図 3B)。以上の成績より、ウイルス株によっては、P2-5 の発現を欠損することで増殖性が著しく低下することが示唆された。ただし、P2-5 を欠損させるためにそれぞれの開始コドン (AUG) を AUA に変更しているため、P 遺伝子の最上流の開始コドンから翻訳される P1 蛋白質に存在する 4 つの Met がすべて Ile に置換している。このことを考慮すると、上記の Met から Ile への 4 変異が 1088 株の P1 蛋白質の機能性に悪影響を及ぼし、その結果として 1088ΔP2-5 株の増殖性が低下した可能性は否定できない。

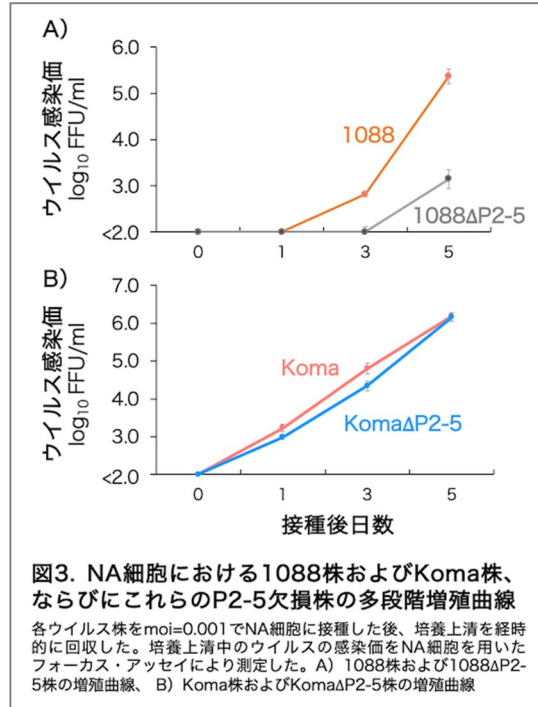


図3. NA細胞における1088株およびKoma株、ならびにこれらのP2-5欠損株の多段階増殖曲線

各ウイルス株をmoi=0.001でNA細胞に接種した後、培養上清を経時的に回収した。培養上清中のウイルスの感染価をNA細胞を用いたフォーカス・アッセイにより測定した。A) 1088株および1088ΔP2-5株の増殖曲線、 B) Koma株およびKomaΔP2-5株の増殖曲線

(4) P2-5 欠損株の病原性

6 週齢 ddY マウスに筋肉内接種することで各株の病原性 (末梢感染性) を評価した結果、10⁴ FFU の 1088 株を接種したマウスでは全個体が死亡したのに対し、1088ΔP2-5 株接種マウスでは 60% のマウスのみが死亡した (図 4)。1088ΔP2-5 株接種マウスについては死亡個体についても生存期間の延長が確認された。すなわち、1088ΔP2-5 株の病原性は 1088 株よりも減弱していることが明らかとなった。ただし、1088ΔP2-5 株の増殖性が 1088 株よりも低下していることで病原性が低下した可能性は否定できない。

同様の実験により Koma 株および KomaΔP2-5 株の病原性を比較した結果、10⁴ FFU の両株を筋肉内接種したマウスの生存曲線に顕著な違いは認められなかつた (図 5)。また、ウイルス量を 10³ FFU および 10² FFU に変更した場合でも明瞭な違いは確認できなかつた (データ未掲載)。これらの成績より、Koma 株および KomaΔP2-5 株の病原性は同等であることが示された。すなわち、小松川株の P2-5 は病原性の発現に大きく寄与していないことが明らかとなった。

上記の成績は、増殖性低下の影響など、考慮すべき点は存在するものの、野外株においては、病原性における P2-5 の重要性はウイルス株ごとに異なることが示唆された。

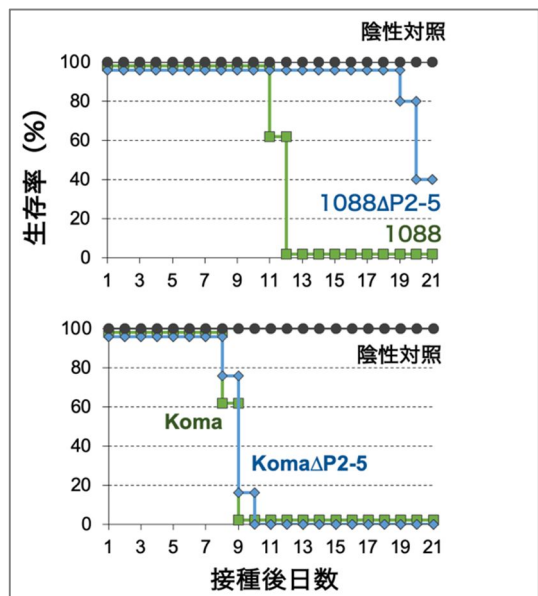


図4. 6週齢マウスにおける1088株およびKoma株、ならびにこれらのP2-5欠損株の病原性

各株の病原性 (末梢感染性) を評価する目的で、6週齢ddYマウスの大腿筋に10⁴FFUの1088株および1088ΔP2-5株 (A)、あるいはKomaおよびKomaΔP2-5株 (B) を接種した。接種マウスの生存率を21日間観察・記録した。

(5) uDISCO 法および従来法の比較

実験室株である西ヶ原株を筋肉内接種後、発症したマウスの脳を採取し、uDISCO 法および従来法の比較に用いた。具体的には、ウイルス N 蛋白質に対する抗体を用いて免疫染色を実施し、両法で得られた画像を比較した。その結果、uDISCO 法による免疫染色では、従来法によるものよりシグナル陽性を示す細胞の数が顕著に少ない傾向が認められた。その原因としては、何らかの理由で透明化した脳組織に十分な量の抗体が浸透しなかつた可能性などが考えられた。今後、その原因を解明した上で、最適な条件を検討していく必要がある。

(6) 考察

本研究では、ワクチンを代替・補助する狂犬病予防薬の開発をゴールとして、狂犬病ウイルス野外株の末梢感染における P2-5 の重要性について検討を行った。遺伝学的に異なる野外株を

国際共同研究強化（B）4

解析に使用することで P2-5 の役割に関して普遍的な知見が得られると考え、今回、1088 株および小松川株を選択・使用した。それぞれの P2-5 欠損株を作出し、これらの諸性状を検討した結果、1088 株の末梢感染に P2-5 が関与する可能性を示唆するデータが得られたものの、小松川株では関与が確認できなかった。すなわち、狂犬病ウイルス野外株の病原性における P2-5 の重要性はウイルス株ごとに異なる可能性が考えられた。このことは、どのウイルス株にも有効な狂犬病予防薬の開発標的として P2-5 は適切ではないことが初めて明らかとなった。

本研究を実施する過程で、狂犬病ウイルス野外株を用いた研究を実施する上で障害となる様々な問題も経験した。具体的には、赤色ホタルルシフェラーゼを発現する 1088 Δ P2-5/RFluc 株の増殖性が著しく低く、生体イメージングの実施が困難となった点については、その原因は特定できなかった。1088 Δ P2-5 の増殖性が低下した事実から考えると、P 遺伝子に導入した人為変異に加え、ルシフェラーゼ遺伝子の挿入が相乗的にウイルスの増殖性に悪影響をもたらした可能性が高い。

さらに今回使用した野外株の遺伝学的安定性に関連した問題にも遭遇した。具体的には、各ウイルスの増殖性を検討した際に回収した NA 細胞培養液上清の中のウイルスの遺伝子を解析すると、これらの G 蛋白質にそれぞれ異なる変異が確認された。すなわち、今回使用した野外株は NA 細胞で増殖させた場合、人為的に制御できない変異が挿入されることが明らかとなった。各ウイルスの保存液は NA 細胞を用いて作製していることから、予期せぬ変異を有するウイルスがその集団の中に混入している可能性が考えられた。したがって、各ウイルス株の増殖性や病原性に関する上記のデータを評価する際に注意が必要となる。今後、野外株を用いた研究を進展させるためには、馴化変異を可能な限り抑制できるウイルス保存液の調整法を確立する必要があるが、現時点ではそのような技術は確立されていない。

< 引用文献 >

- [1] Chenik et al., J. Virol., 1995.
- [2] Okada et al., J. Virol., 2016.
- [3] Ito et al., Microbiol. Immunol., 2003.
- [4] Isomura et al., J. Gen. Virol., 2017.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takahashi Tatsuki, Inukai Maho, Sasaki Michihito, Potratz Madlin, Jarusombuti Supasiri, Fujii Yuji, Nishiyama Shoko, Finke Stefan, Yamada Kentaro, Sakai Hiroki, Sawa Hirofumi, Nishizono Akira, Sugiyama Makoto, Ito Naoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetic and Phenotypic Characterization of a Rabies Virus Strain Isolated from a Dog in Tokyo, Japan in the 1940s	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 914～914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v12090914	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 龍樹、犬飼 真秀、泉 郁輝、藤井 祐至、西山 祥子、正谷 達膳、杉山 誠、伊藤 直人
2. 発表標題 狂犬病ウイルス小松川株のリバースジェネティクス 法の確立
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋龍樹、犬飼真秀、Supasiri Jarusombuti、藤井祐至、西山祥子、山田健太郎、酒井洋樹、西園晃、杉山誠、伊藤直人
2. 発表標題 由来の異なる狂犬病ウイルス野外株の病原性の比較
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2020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	山田 健太郎 (Yamada Kentaro) (70458280)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	
研究分担者	佐々木 道仁 (Sasaki Michihito) (70609403)	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教 (10101)	
研究分担者	西山 祥子 (Nishiyama Shoko) (90817058)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (13701)	
研究分担者	西園 晃 (Nishizono Akira) (70218155)	大分大学・医学部・教授 (17501)	

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