

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19208025

研究課題名（和文） モノネガウイルスの病原性発現決定因子の解析と制御法の開発

研究課題名（英文）

Analysis of factors implicated in pathogenicity of mononegaviruses and development of a vaccine candidate.

研究代表者

甲斐 知恵子（ KAI CHIEKO ）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：10167330

研究成果の概要（和文）：

本研究は、モービリウイルスの病原性発現に関わる因子の同定とその機序の解明、およびニパウイルス感染症のワクチン開発を目的として行なった。その結果、モービリウイルス感染において、細胞種により宿主因子への影響が異なることを発見した。またウイルス主要構成蛋白である N 蛋白が IFN- α/β 、 γ 共に阻害活性をもつことという新たな知見を得た。またニパウイルスに関しては、アクセサリ蛋白が病原性に強く関与することが明らかとなり、さらに組換え麻疹ウイルスを用いたワクチンが優れたワクチン候補となることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the key factors in pathogenicity of morbilliviruses, and developed a vaccine for Nipah virus infection. For morbilliviruses, it was discovered that MV induced different cellular responses in a cell-type specific manner, and viral nucleocapsid protein had inhibitory potency for IFN- α/β and γ signaling. For Nipah virus, we showed that accessory proteins play key roles in its pathogenicity. We have also showed that our established recombinant measles virus expressing Nipah virus protein effectively protected hamsters from NiV infection.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------------|------------|
| 2007 年度 | 13,700,000 | 4,110,000 | 17,810,000 |
| 2008 年度 | 12,400,000 | 3,720,000 | 16,120,000 |
| 2009 年度 | 11,700,000 | 3,510,000 | 15,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 37,800,000 | 11,340,000 | 49,140,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：モノネガウイルス、モービリウイルス、病原性、組換えウイルス、宿主因子

1. 研究開始当初の背景

モノネガウイルス（マイナス・一本鎖・RNA ウイルス）目は、エマージングウイルス感染症の原因ウイルスを多数含んでいる。しかし、新興感染症出現の原因である自然宿主から他の動物種に種を越えて伝播する機序

や、高い病原性発現機構は未だ解明されていない。我々は、この目に属するパラミクソ科モービリウイルス属（牛痘ウイルス（RPV）、イヌジステンパーウイルス（CDV）、麻疹ウイルス（MV））を対象に長年研究を積み重ねてきた。モービリウイルス属はそれぞ

れの宿主に対して高い致死率を示し、激しい免疫抑制や、神経病原性、持続感染など多様で激しい病原性を示す重要ウイルスとされており、その病態発現機序の解明や防御法の研究は重要課題である。また、宿主特異的病原性発現機序解明の有用なモデルでもある。我々はこれまでに、これら3種のウイルスにおいて、病態を再現する優れた動物感染実験モデル系を確立し、また reverse genetics 系(遺伝子から感染性ウイルスを作出する技術)を、この3種のウイルスで開発することに成功し、ウイルス性状、増殖機構や病原性発現機構、持続感染機構などの基礎研究や新型組換えワクチン開発の研究を行ってきた。特に、病原性発現に関わる因子として、侵入の成立以外に必須の因子があること、ウイルスのポリメラーゼ複合体の構成蛋白は重要な役割を果たすこと、既知のレセプター以外の侵入経路が存在することなどを示すなど、数多くの新しい重要な知見を蓄積している。

一方、モービリウイルスと近縁のニパウイルス(NiV)は、1998年にマレーシアに初めて出現して100名以上の死者を出したウイルスであるが、畜産にも多大な被害を及ぼした。その後も散発的流行を起こし、致死率は70%以上におよび、研究の緊急性と重要性は増している。我々はモービリウイルスでの経験を生かして、NiVの reverse genetics 系の開発に世界に先駆けて成功した(PNAS, 2006)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの研究成果の蓄積を元に、モノネガウイルスの病原性発現に関わる因子を同定してその機序を解明し、ニパウイルス感染症ではワクチン開発を目指すことである。具体的には以下の項目を目的とした。

- 1) これまでの成果から動物個体での病原性発現に重要な役割を担うことが示唆されたP蛋白について相互作用する因子の探索し、病原性に関与する宿主因子を解析する。
- 2) モービリウイルスのアクセサリ蛋白(V, C)の機能の解析: 近年他のウイルスからアクセサリ蛋白のIFN応答経路の抑制機能が示され、病原性発現にも関与することが示唆されている。そこで、V, C蛋白を欠損させたモービリウイルスを用いて、アクセサリ

蛋白の感染細胞内での機能を明らかにし、病原性への関与についても解析する。

- 3) NiVのアクセサリ蛋白3種類(V, C, W)について、それらの欠損組換えウイルスを reverse genetics系を用いて作出し、病原性の変化が起こるかをin vitroおよびin vivoで解析する。これにより、アクセサリ蛋白の病原性発現への関与機序を解析する。

- 4) 3)で病原性の著しく低い組換えNiVが得られた場合には、動物に免疫し、その組換えウイルスのワクチン効果を解析する。

- 5) モービリウイルスの組換えウイルス作製技術を用いて、NiVの抗原蛋白遺伝子を挿入し、NiVに対するワクチンとしての有効性を解析する。

3. 研究の方法

- 1) P蛋白と結合する宿主因子の探索と解析: P遺伝子を yeast 発現プラスミドに組み込み、 yeast two-hybrid 法を用いて細胞 cDNA ライブラリーからスクリーニングを行ない、増殖したクローンから遺伝子を増幅した。また、P蛋白をバキュロウイルスベクターで発現させ、発現蛋白と細胞抽出液とを反応させて結合宿主蛋白を検索する共沈法も同時に行ない、2種類で得られる結合蛋白を比較検討した。得られた候補蛋白は MALDI-TOF-MS により解析した。

- 2) モービリウイルスのアクセサリ蛋白解析: モービリウイルス, MV, RPV それぞれのアクセサリ蛋白(V, C)をそれぞれ欠損させた組換えウイルスを reverse genetics によって作出した。これらを用いて、ウイルス感染後の宿主因子の遺伝子転写動態をマイクロアレイによって包括的に解析し、親ウイルスとの差を比較した。特に、モービリウイルスの主要ターゲットである上皮系細胞と血球系細胞での転写動態を比較し、アクセサリ蛋白の細胞種特異的な機能発現の有無を検索した。また、アクセサリ蛋白は細胞への単独発現系では IFN 応答シグナルを抑制すると報告されているため、アクセサリ蛋白欠損ウイルスの感染細胞でのその機能を確認した。すなわち、レポーター遺伝子を ISRE (IFN signaling responsible element) の下流に結合させた plasmid を各種細胞に transfection し、ウイルス蛋白を発現した場合と組換えウイルスを感染させた場合での IFN 応答抑制作用を検索した。

3) NiV のアクセサリ蛋白の病原性への関与機序：アクセサリ蛋白 3 種類 (V, C, W) をそれぞれ欠損した組換えウイルスを、我々が確立した reverse genetics 系 (PNAS, 2006) を用いて作出した。アクセサリタンパクは全て P 遺伝子から作られるため、P 遺伝子に改変を加えた。作出された組換えウイルスを用いて、蛋白の単独発現と比較しつつ、上記のレポーター遺伝子解析を行った。また、感染実験モデルであるハムスターに感染させて、病原性の強さが変化するかを親株と比較して解析した。

4) 組換えニパウイルスによる NiV に対するワクチン開発：MV の reverse genetics を用いて NiV の膜蛋白である G 遺伝子を挿入したウイルスを作出した。このウイルスについて増殖性などの性状を解析後、動物モデルであるハムスターに接種して、抗体価上昇を検索する。その後、BSL4 施設で同様に本ウイルスを免疫し、NiV の攻撃試験を行い、防御効果を非免疫群と比較検討する。

4. 研究成果

1) 組換えバキュロウイルス発現 P 蛋白を用いて結合する候補宿主因子が複数あげられた。しかし、機能を解析した結果、いずれもウイルスの増殖性等に影響を与えるものではなかった。そこで、ウイルス感染後に転写動態の変化する宿主因子群をマイクロアレイによる網羅的な解析を行った。その結果、MV を感染させた上皮系細胞では感染初期から type I IFN を始めとする抗ウイルス応答が誘導されること、また感染後期には様々なシグナル活性化による遺伝子発現上昇に加え、ハウスキーピング遺伝子群の発現低下が起こることがわかった。また、血球系細胞でもマイクロアレイ解析を行ったところ、上皮系細胞で観察された発現動態の変動がほとんど起きないことが観察された。この現象は、MV が細胞種によって感染後の宿主因子に及ぼす影響に違いがあるという新たな知見である。

2) モービリウイルスのアクセサリ蛋白の機能解析：IFN シグナル伝達阻害活性を持つことが報告されている V 蛋白を欠損する MV を作出して、上記と同様に感染後のマイクロアレイ解析を行ったところ、親ウイルス同様の遺伝子誘導を起こすことが観察された。すなわち、これまで単独発現で証明されてきた

V 蛋白の IFN シグナル伝達阻害活性は、ウイルス感染時には発現しないことが明らかになった。すなわち、個体での感染時において、V 蛋白の IFN 応答阻害活性が病原性発現に関与することはないと示唆された。

3) 病原性に関与するその他のウイルス蛋白の解析：ウイルス主要構成蛋白である N 蛋白の機能解析を行った。その結果、N 蛋白も IFN- α/β 、 γ 共に阻害活性をもつことという新たな知見を得た。さらに、N 蛋白の核移行によって活性化 STAT の核移行が阻害される新規メカニズムを同定した。

4) NiV のアクセサリ蛋白の機能解析：アクセサリ蛋白 3 種類 (V, C, W) をそれぞれ欠損した組換えニパウイルスを、reverse genetics 系を用いて作出する事に成功した。これらウイルスの増殖曲線を測定したところ、C 欠損 NiV で若干の増殖低下を示したもののどのウイルスも高い増殖効率を示した。これらのウイルスを感染させた培養細胞の IFN シグナル伝達をみたところ、全てのウイルスで IFN シグナル伝達の阻害が確認され、*in vitro* ではアクセサリ蛋白 1 種のみを欠失させた場合には、IFN シグナル阻害活性は保たれることがわかった。そこでこれらウイルスを用いた感染実験を行った。これらの組換え NiV を様々なウイルス力価でハムスターに接種したところ、W 欠損 NiV は親ウイルスと同等の病原性を示したのに対し、V 欠損および C 欠損 NiV は、ハムスターに対して全く病原性を示さないことが明らかになった。すなわち、V, C 蛋白は個体での病原性発現に重要な役割を担っていることが、その機序は IFN 応答系阻害活性によるものではないことが明らかになった。

5) MV の reverse genetics によって NiV の膜蛋白を発現する組換え MV を作出した。このウイルスをハムスターに感染させたところ、病原性は全く示さずに、NiV-G に対する抗体価が上昇した。そこで本ウイルスを免疫したハムスターに NiV の親株を接種する実験を行ったところ、極めて強い防御効果を示した。このことから、本組換えウイルスは NiV に対する優れたワクチン候補となると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

1. Imai, C., Fujita, K., Shimizu, F., Sugai, A., Yoneda, M. and Kai, C. Comparative and mutational analyses of promoter regions of rinderpest virus. *Virology*, 396: 169-177, 2010.
2. Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Terao-Muto, Y., Sato, H., Kai, C. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J. Virol.*, 84 (9), 4183-4193, 2010.
3. Inoue, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Yoneda, M., Sato, H. and Kai, C. Inhibition of host protein synthesis in B95a cells infected with HL strain of measles virus. *Comp. Immunol. Microb.*, 32: 29-41, 2008.
4. Hagiwara, K., Sato, H., Inoue, Y., Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Fujita, K., Fukuda, H., Takamura, C., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Sugano, S., Ohmi, S. and Kai, C. Phosphorylation of measles virus nucleoprotein upregulates the transcriptional activity of minigenomic RNA. *Proteomics*, 8, 1871-1879, 2008.
5. Sato, H., Honma, R., Yoneda, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Ikeda, F., Seki, T., Watanabe, S., Kai, C. Measles virus induced cell-type specific changes in gene expression. *Virology*, 375, 321-330, 2008.
6. Terao-Muto, Y., Yoneda, M., Seki, T., Watanabe, A., Tsukiyama-Kohara, K., Fujita, K. and Kai, C. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. *Antiviral Res.*, 80: 370-376, 2008.
7. Kobune, F., Ami, Y., Katayama, M., Takahashi, M., Tuul, R., Korukluoglu, G., Kiyohara, T., Miura, R., Sato, H., Yoneda, M. and Kai, C. A novel monolayer cell line derived from human umbilical cord blood cells shows high sensitivity to measles virus. *J. Gen. Virol.*, 88, 1565-1567, 2007.
8. Sato, H., Kobune, F., Ami, Y., Yoneda, M. and Kai, C. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp. Immunol. Microb.*, 31(1), 25-35, 2008. Epub 2007 May 21
9. Fujita, K., Miura, R., Yoneda, M., Shimizu, F., Sato, H., Muto, Y., Endo, Y.,

Tsukiyama-Kohara, K. and Kai, C. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: involvement heparin-like molecule in CDV infection. *Virology*, 359, 324-335, 2007.

10. Sato, H., Masuda, M., Kanai, M., Tsukiyama-Kohara, K., Yoneda, M. and Kai, C. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *J. Virol.*, 81(21), 11569-11576, 2007.

〔学会発表〕 (計 27 件)

- 1) 米田美佐子, 佐藤宏樹, 藤田賢太郎, 寺尾由里, 池田房子, 小見美央, 甲斐知恵子。ニパウイルスアクセサリ蛋白の病原性への関与。第 56 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月。
- 2) 渡邊彰, 米田美佐子, 佐藤宏樹, 池田房子, 甲斐知恵子。麻疹 N 結合宿主蛋白の同定と機能解析。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2009 年 10 月 25-27 日。
- 3) 佐藤宏樹, 米田美佐子, 本間玲子, 池田房子, 渡邊慎哉, 甲斐知恵子。モービリウイルスアクセサリ C 蛋白による宿主遺伝子群発現維持機構の解明。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2009 年 10 月 25-27 日。
- 4) 小見-古谷美央, 米田美佐子, 池田房子, 甲斐知恵子。蛍光融合蛋白を用いたニパウイルス N 蛋白の P 蛋白相互作用領域の解明。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2009 年 10 月 25-27 日。
- 5) 黄明珠, 佐藤宏樹, 萩原恭二, 渡邊彰, 池田房子, 秦裕子, 尾山大明, 米田美佐子, 甲斐知恵子。ニパウイルスヌクレオ蛋白のリン酸化部位の同定及びリン酸化の意義。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2009 年 10 月 25-27 日。
- 6) 高山郁代, 佐藤宏樹, 甲斐知恵子。麻疹ウイルス N タンパク質のインターフェロンシグナル伝達経路への関与。第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2009 年 10 月 25-27 日。
- 7) 佐藤宏樹, 米田美佐子, 本間玲子, 渡邊

- 慎哉、甲斐知恵子。Analysis of comprehensive downregulation of housekeeping genes triggered by morbillivirus infection. 第32回日本分子生物学会、岡山、2009年12月9-12日。
- 8) 高山郁代、佐藤宏樹、甲斐知恵子。The nucleocapsid protein of morbillivirus blocks host interferon response. 第32回日本分子生物学会、岡山、2009年12月9-12日。
- 9) Takayama, I., Kubo, M., Takenaka, A., Fujita, K., Sugiyama, T., Arai, T. Yoneda, M., Sato, H., Yanai, T. and Kai, C. Pathological and phylogenetic features of prevalent canine distemper virus in wild masked palm civets in afukushima prefecture. 1st Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE -Ancient Scourges and Modern Perspectives. Tokyo, February 10th, 2009.
- 10) Watanabe, A., Yoneda, M., Sato, H., Ikeda, F. and Kai, C. Identification of a host factor binding to measles virus nucleoprotein. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 8-11, 2009.
- 11) Huang, M., Sato, H., Hagiwara, K., Watanabe, A., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Yoneda, M. and Kai, C. Analysis of phosphorylation residues on Nipah virus nucleoprotein. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 8-11, 2009.
- 12) 寺尾由里、渡辺彰、米田美佐子、甲斐知恵子。新規麻疹ウイルスN結合宿主蛋白の機能解析。第31回日本分子生物学会、神戸、2008年12月9-12日。
- 13) Kai, C. Molecular determinant of Nipah virus pathogenicity. Symposium: "Emerging Infections: A tribute to the One Medicine, One Health Concept". Manhattan KS, U. S. A. November 13-14, 2008. (Invited speaker)
- 14) 寺尾(武藤)由里、渡辺彰、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹N結合宿主蛋白の同定。第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。
- 15) 渡辺彰、米田美佐子、佐藤宏樹、池田房子、寺尾(武藤)由里、甲斐知恵子。上皮系細胞における麻疹ウイルス侵入経路の解析。第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。
- 16) 藤田賢太郎、今井千恵子、米田美佐子、甲斐知恵子。牛疫ウイルスの promoter 領域の解析。第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。
- 17) Fujita, K., Imai, C., Yoneda, M. and Kai, C. Comparative and mutational analysis of promoter regions of rinderpest virus. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 7-11, 2008.
- 18) Terao-Muto, Y., Yoneda, M., Watanabe, A., Fujita, K. and Kai, C. Inhibitory effect of heparin on infection of SLAM-negative cells with measles virus. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 7-11, 2008.
- 19) Yoneda, M., Gillaume, V., Sato, H., Georges-Courbot, M-C., Takayama, I., Ikeda, F., Wild, F. and Kai, C. The function of Nipah virus accessory protein as virulence factors in vivo. XIVth Int. Cong. Virol. Istanbul, Turkey, August 11-15, 2008.
- 20) Hagiwara, Sato, H., Inoue, Y., Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Fujita, K. and Kai, C. Phosphorylation of measles virus nucleoprotein upregulates the transcriptional activity of minigenomic RNA. XIVth Int. Cong. Virol. Istanbul, Turkey, August 11-15, 2008.
- 21) Inoue, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Fujita, K., Hagiwara, K., Sato, H.,

- Yoneda, M. and Kai, C. Translation of measles virus nucleocapsid mRNA is upregulated by a host RNA binding protein. XIVth Int. Cong. Virol. Istanbul, Turkey, August 11-15, 2008.
- 22) Watanabe, A., Yoneda, M., Terao-Muto, Y., Sato, H. and Kai, C. A functional entry receptor for measles virus in epithelial cells. XIVth Int. Cong. Virol. Istanbul, Turkey, August 11-15, 2008.
- 23) Arai, T., Terao-Muto, Y., Uema, A., Ikeda, F., Yoneda, M. and Kai, C. Analysis on proteins of measles virus required for neuropathogenesis in mice. XIVth Int. Cong. Virol. Istanbul, Turkey, August 11-15, 2008.
- 24) Kai, C. Nipah virus reverse genetics. 5th Int. Conf. on Emerging zoonoses, Nov. 15-18, 2007, Limassol, Cyprus. (Invited speaker)
- 25) 新井哲郎、武藤由里、上間亜希子、池田房子、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルス齧歯類脳馴化株を用いた組換えウイルスのマウスにおける神経病原性。第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年 10 月。
- 26) 武藤由里、藤田賢太郎、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルス感染における heparin の機能的関与。第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年 10 月。
- 27) 萩原恭二、井上義久、藤田賢太郎、渡辺彰、佐藤宏樹、甲斐知恵子。麻疹ウイルスヌクレオカプシドタンパク質のリン酸化部位の同定。第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年 10 月。

[図書] (計 3 件)

1. 米田美佐子、甲斐知恵子 ニパウイルス、ヘンドラウイルス (特集: 種の壁を越える感染症 -Epidemiology と Epizootiology-)、臨床と微生物、近代出版 37(2):133-138, 2010.
2. 佐藤宏樹、甲斐知恵子 ジステンパーウ

イルス (特集: 動物のウイルス感染症) *Virus Report*, 6, 72-80, 2009.

3. Yoneda, M., Fujita, K., Sato, H. and Kai, C. Reverse genetics of Nipah virus to probe viral pathogenicity. In *Methods in Molecular Biology*, "Viral Applications of the Green Fluorescent Protein", The Humana Press. 329-337, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/jikkendoubutsu/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 知恵子 (KAI CHIEKO)
 東京大学・医科学研究所・教授
 研究者番号 : 10167330

(2) 研究分担者

中山 裕之 (NAKAYAMA HIROYUKI)
 東京大学・農学生命科学研究科・教授
 研究者番号 : 40155891
 (H19→H20 : 連携研究者)

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

佐藤 宏樹 (SATOU HIROKI)
 東京大学・医科学研究所・助教
 研究者番号 : 50418654