

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03127

研究課題名(和文) 高感度の感染細胞検出系を用いた狂犬病ウイルスの末梢感染動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of peripheral infection kinetics of rabies virus by a high-sensitive infection detection system

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、皮下組織に存在する新規の狂犬病ウイルス標的細胞の種類を同定した上で、神経組織への感染伝播経路を解明することを目的とした。マウス皮下組織の標的細胞の検出を試みた結果、類似した形態的特徴を有する複数の細胞が染色された。これらの細胞は形態的特徴から血管内皮細胞であることが推定された。細胞マーカーによる細胞種同定を試みたものの、標的細胞の検出頻度が著しく低く実現できなかった。そこで検出に用いるウイルスの改良を実施したが、問題の解決には至らなかった。一方、狂犬病ウイルスが扁平上皮細胞に高い親和性を示す予備的な成績が得られたことから、皮膚組織にウイルス標的細胞が存在する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

狂犬病ウイルスは末梢組織においてほとんど増殖しないため、標的細胞の検出・同定は極めて困難である。本研究課題は、高感度の細胞検出系の活用により、この困難に挑戦したものである。様々な試みにもかかわらず、ウイルス標的細胞の確定には至らなかったものの、本研究で得られた成果は、今後、このような研究を継続する上で、極めて重要な基礎データとなる。将来、末梢組織におけるウイルス標的細胞が同定され、神経組織への感染経路が明らかとなれば、現在、十分に普及していない狂犬病ワクチンを補助・代替する新規の狂犬病予防法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify a novel rabies virus target cell in subcutaneous tissue and then to elucidate the transmission route to nervous tissue. Attempts to detect target cells in mouse subcutaneous tissue resulted in the staining of multiple cells with similar morphological characteristics. These cells were presumed to be vascular endothelial cells based on their morphological characteristics. We tried to identify cell types by using cell markers, but failed to do so because the detection frequency of target cells was significantly low. So we genetically modified the virus used for detection, but this attempt did not solve the problem. On the other hand, our preliminary results showed that rabies virus has a high affinity for squamous cells, indicating the possibility of the presence of virus target cells in skin tissue.

研究分野：人獣共通感染症学

キーワード：狂犬病ウイルス 標的細胞 末梢感染

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は、長い潜伏期(通常1~数ヶ月)、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(犬等)の咬傷から体内に侵入後、神経系に感染を拡大し、致命的な脳炎を発症させる。現在に至るまで、有効な治療法は存在しない。このような状況から、ワクチン不足が深刻な発展途上国を中心として、毎年5.9万人が犠牲となっている。狂犬病の世界的制圧を達成するため、次世代型ワクチンの開発、治療薬・予防薬の創出が緊急の課題である。しかし、創薬等の基盤となる本病の病態形成機序に関する知見は十分に蓄積されていない。特に、末梢組織でのウイルス感染動態は未解明である。

狂犬病ウイルスは、長い潜伏期の大半、侵入部位周辺の末梢組織に潜伏する。これまで、末梢組織におけるウイルス標的細胞として唯一、筋肉細胞が同定され、ウイルスの潜伏部位である可能性が指摘されている[文献1]しかし、これは動物にウイルスを筋肉内接種して得られた知見であり、自然感染における筋肉細胞の役割は今も不明である。一方、自然感染では、筋肉に達しない浅い咬傷でも感染が成立する事例が知られている[文献2]すなわち、末梢組織に筋肉細胞以外の標的細胞が存在する可能性が高い。しかし、末梢組織でのウイルス増殖効率が著しく低いため、従来の免疫染色法により標的細胞を検出するのは極めて困難である。この制約により、末梢組織でのウイルス感染動態は現在も未解明となっている。

以前、申請者らは、ウイルスおよびマウスの遺伝子改変技術の併用により、*in vivo*のウイルス標的細胞の検出系を確立した。Cre-loxP組換え反応を応用した本系は、従来法よりも高感度に、かつウイルスが最初に感染する一次標的細胞のみを検出する。本系を用いて、自然感染に近い皮下接種により感染実験を行った結果、未知の一次標的細胞が皮下組織に存在することが確認された。一方で、同細胞の種類の特異性やウイルス感染経路への関与の検討は行っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢組織における狂犬病ウイルスの感染動態を解明し、狂犬病の暴露後予防薬・次世代型ワクチンの創出、早期診断法の確立のための基盤を確立することである。本申請課題では、すでに皮下組織に存在が確認された新規のウイルス標的細胞の種類を特定し、同細胞が末梢組織における感染経路に関与するかを検討する。さらに、同細胞がウイルス潜伏部位である可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 皮下組織に存在する狂犬病ウイルス標的細胞の検出と同定

申請者らが以前に確立したウイルス標的細胞の高感度検出系(図1)を用いて、皮下組織に存在する標的細胞の検出と同定を試みた。その際に使用するCreリコンビナーゼ発現感染拡大能欠損ウイルスについては、狂犬病ウイルス実験室株のRC-HL株または西ヶ原株の遺伝子操作により作出した。同ウイルスに供給する

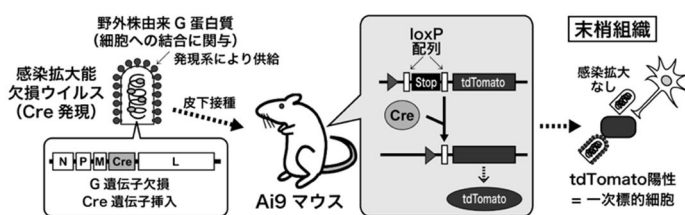


図1. 申請者らによって確立されたウイルス標的細胞の高感度検出系

G蛋白質として西ヶ原株または野外株1088株由来のものを使用した。具体的には、 1.0×10^4 FFUの同ウイルスを、Cre-loxP依存的に赤色蛍光蛋白質(tdTomato)を発現するAi9マウスの背部に皮下接種した後、翌日に同様の条件のウイルス接種を繰り返した。初回接種から9日後に接種部位の皮下組織を採材した上で、赤色蛍光蛋白質に対する抗体を用いて免疫染色を実施した。また、標的細胞が検出された組織切片の一部については、常法に従いHE染色を実施した。

(2) 感染拡大能欠損ウイルスのCreリコンビナーゼ発現能の確認

感染拡大能欠損ウイルスのCreリコンビナーゼ発現能を確認する目的で、マウス神経芽細胞腫由来NA細胞に同ウイルスを接種した後、4日目に細胞を溶解した。なお、接種に用いたNA細胞には、予めRC-HL株G蛋白質を発現するプラスミドを導入した。これにより、ウイルスに一時的な感染拡大能を付与した。上記で得られた細胞溶解液中のCreリコンビナーゼを、抗Cre抗体を用いたウエスタンブロット法(WB法)により検出した。なお、その際の陽性対照として、Creリコンビナーゼ発現プラスミドを導入したNA細胞の溶解液を用いた。

(3) ウイルス標的細胞の検出効率改善を目的とした感染拡大能欠損ウイルスの改良

感染拡大能欠損ウイルスの Cre リコンビナーゼ発現能を増強する目的で、ゲノム上に 2 コピーの Cre 遺伝子を保有する G 遺伝子欠損ウイルスを RC-HL 株の遺伝子操作系により作出した。Cre リコンビナーゼの発現能の検討については、前項目と同じ方法により実施した。

(4) 野外株（小松川株）の遺伝子操作系の確立

野外株の遺伝学的背景を有する感染拡大能欠損ウイルスを作出できるようにすることを目的として、1940 年代に東京の犬から分離された小松川株の遺伝子操作系を、常法にしたがって樹立した。本系を用いてクローン化 cDNA から回収された組換えウイルス（rKoma 株）の生物学的性状を検討し、親株の小松川株（wtKoma 株）と比較した。

(5) 扁平上皮癌由来培養細胞に対する狂犬病ウイルスの感染性の検証

犬の扁平上皮癌の症例から申請者らが樹立した細胞株に、各種の狂犬病ウイルス株を接種した後、6 日目に細胞を固定し、ウイルス N 蛋白質を認識する抗体により免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 皮下組織に存在する狂犬病ウイルス標的細胞の検出と同定

Cre リコンビナーゼ発現感染拡大能欠損ウイルスを Ai9 マウスに接種した結果、接種部位の皮下に複数の RFP 陽性細胞が確認された（図 2）。いずれのシグナル陽性細胞も形態的に類似した構造（リング状）を有していた。なお、Cre リコンビナーゼの代わりに、ホタルルシフェラーゼを発現する感染拡大能欠損ウイルスを接種した場合、このような陽性細胞は確認できなかった（データ未掲載）。

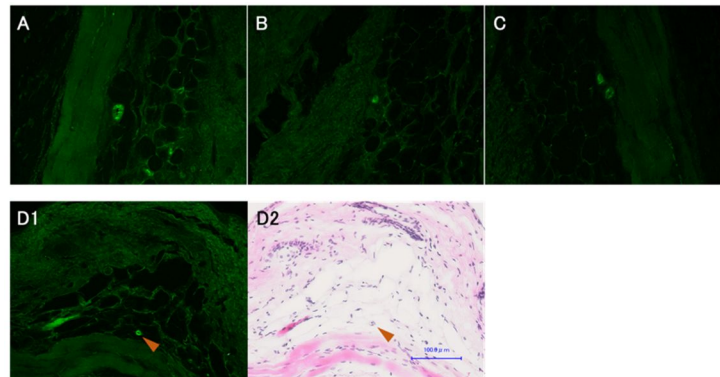


図2. Ai9マウス皮下組織に検出された狂犬病ウイルス標的細胞

A~C, D1: 抗RFP抗体による免疫染色における陽性細胞
D2: D1の組織切片のHE染色像、矢頭は同一の細胞を示す。

シグナル陽性細胞を含む組織切片をひとつ選択し、HE 染色を実施した結果、陽性細胞は、形態的に、皮下脂肪組織中に存在する血管内皮細胞であると推定された。

当初の計画では、細胞マーカーの活用により RFP 陽性細胞の種類の同定を試みる計画であったものの、シグナル陽性細胞の検出効率が著しく低いことが制約となり、実施は困難であると判断した。したがって、検出効率の向上を目的として実験条件の再検討を行うこととした。

(2) 感染拡大能欠損ウイルスの Cre リコンビナーゼ発現能の確認

感染拡大能欠損ウイルスが機能的な Cre リコンビナーゼを発現することは予備試験により確認済みであった一方で、その発現量については検討を実施していなかった。そこで WB 法により同ウイルスの Cre リコンビナーゼの発現能の検討を行った（図 3）。その結果、Cre 発現型感染拡大能欠損ウイルスの感染細胞において、陽性対照（Cre 発現プラスミド導入細胞）に認められたものと同じ移動度を示すバンドが確認された。なお、ルシフェラーゼ発現型のウイルスでは、このようなバンドは確認されなかった。すなわち、感染拡大能欠損ウイルスが Cre リコンビナーゼ発現能を有することが確認された。しかし、バンドのシグナル強度に注目すると、同ウイルス感染細胞において確認された Cre リコンビナーゼの発現量は、Cre 発現プラスミド導入細胞のものよりも著しく低いことが明らかとなった。以上より、感染拡大能欠損ウイルスによる Cre リコンビナーゼ発現能が低いことが標的細胞の検出効率に悪影響を及ぼしている可能性が考えられた。

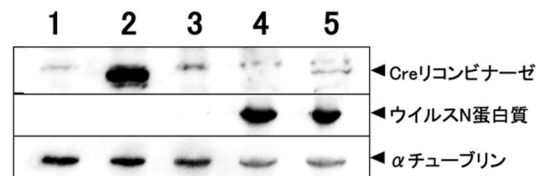


図3. WB法による感染拡大能欠損ウイルスのCre発現能の検討

レーン1: 空プラスミド導入細胞、レーン2: Cre発現プラスミド導入細胞
レーン3: 非感染細胞、レーン4: ルシフェラーゼ発現感染拡大能欠損ウイルス感染細胞
レーン5: Cre発現感染拡大能欠損ウイルス感染細胞

陽性対照（Cre 発現プラスミド導入細胞）に認められたものと同じ移動度を示すバンドが確認された。なお、ルシフェラーゼ発現型のウイルスでは、このようなバンドは確認されなかった。すなわち、感染拡大能欠損ウイルスが Cre リコンビナーゼ発現能を有することが確認された。しかし、バンドのシグナル強度に注目すると、同ウイルス感染細胞において確認された Cre リコンビナーゼの発現量は、Cre 発現プラスミド導入細胞のものよりも著しく低いことが明らかとなった。以上より、感染拡大能欠損ウイルスによる Cre リコンビナーゼ発現能が低いことが標的細胞の検出効率に悪影響を及ぼしている可能性が考えられた。

(3) ウイルス標的細胞の検出効率改善を目的とした感染拡大能欠損ウイルスの改良

感染拡大能欠損ウイルスの Cre リコンビナーゼ発現能を増強するため、2 コピーの Cre 遺伝子を保有する G 遺伝子欠損ウイルスを遺伝子操作により作出した。改良型の感染拡大能欠損ウイルスの Cre リコンビナーゼ発現能を WB 法により検討した結果、その発現能に著しい改善が確認された(データ未掲載)。しかし、改良型ウイルスのストックウイルスの調整した際、その増殖能が従来のウイルスの約 1/10 に低下していることが明らかになった。改良型ウイルスは、ウイルス N および P 遺伝子の間に追加の Cre 遺伝子を保有するため、本来のウイルスとは N-P 遺伝子間の距離が異なっている。このことが増殖性の低下につながったと予想された。なお、予備的に改良型の感染拡大能欠損ウイルスを Ai9 マウスに接種した結果、これまでのところ、シグナル陽性細胞の出現頻度に大きな改善は認められていない(データ未掲載)。

(4) 野外株(小松川株)の遺伝子操作系の確立

上記の実験では、感染拡大能欠損ウイルスとして遺伝子改変された実験室株を用いてきた。しかし、このような実験室株の利用が標的細胞の検出効率の低さの原因となっていることも否定できなかった。そこで今後、標的細胞検出用のウイルスを作製することを視野に入れて、野外株の遺伝子操作系の確立を試みた。具体的には、1940 年代に東京において犬から分離された小松川株を用いて本系を確立した。なお、申請者らは、小松川株が代表的な野外株と類似した生物性状(病原性を含む)を維持していることを確認している[文献 3]

小松川株の完全長ゲノム cDNA を保有するプラスミドを構築した上で、同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共に培養細胞に導入した結果、感染性を有する rKoma 株の回収に成功した。神経系培養細胞における rKoma 株の増殖性は、親株の wtKoma 株と同等であり、成熟マウスに対する病原性についても両株の間に顕著な違いは認められなかった(データ未掲載)。以上より、rKoma 株は、wtKoma 株に極めて類似した生物性状を有することが明らかとなった。すなわち、今後、rKoma 株の遺伝子改変により、標的細胞検出用のウイルスを作出することが可能となった。

(5) 扁平上皮癌由来培養細胞に対する狂犬病ウイルスの感染性の検証

犬の扁平上皮癌由来細胞株に当研究室に保有する複数の狂犬病ウイルス株を接種した結果、いずれのウイルス株も同細胞の細胞質に N 蛋白質を含有する封入体を形成していることが確認された。すなわち、様々な狂犬病ウイルス株は、扁平上皮細胞に高い親和性を示す可能性が示唆された。以上の成績より、今後は、末梢組織中に存在する標的細胞の探索場所として、皮膚組織も加える必要があると考えられた。

<引用文献>

- [文献 1] Charlton et al., Acta Neuropathol., 1997.
- [文献 2] Begeman et al., Lancet Infect. Dis., 2018.
- [文献 3] Takahashi et al., Viruses, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1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 日本獣医学会第164学術集会
4. 発表年 2021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	大沢 匡毅 (Osawa Masatake) (10344029)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	
研究分担者	酒井 洋樹 (Sakai Hiroki) (40283288)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	

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		
ドイツ	フリードリヒ・レフラー研究所		