

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17478

研究課題名（和文）生ワクチン開発に資するSFTSVの弱毒化機構の遺伝子レベルでの解明

研究課題名（英文）Mechanism of attenuated SFTSV strain for live vaccine establishment

研究代表者

朴 ウンシル（Park, Eunsil）

国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官

研究者番号：90750117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の動物を用いた感染実験を通じて明白にした弱毒株のCat#1株と強毒株のSPL010株の病原性の相違に関わる原因遺伝子の解明を目指した。

Reverse geneticsによりCat#1とSPL010のS、M、L分節から構成される8種類のキメラウイルス（rgSFTSV）を作製した。rgSFTSVの動物感染実験の結果、Cat#1株由来のM分節を持つrgSFTSVの感染IFNAR1^{-/-}マウスは100%、SPL010株由来のM分節を持つrgSFTSVの感染IFNAR1^{-/-}マウスは0%の生存率を示し、M分節の病原性への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

弱毒株と強毒株の病原性にはSFTSVのM分節、GPC遺伝子が関与していることが示唆された。GPC遺伝子は膜蛋白質をコードし、宿主の受容体に結合する際に重要な役割を果たす。二つの株のM分節には18カ所アミノ酸が異なり、Cat#1株の18カ所アミノ酸をそれぞれSPL010株へ置換したrgSFTSVを作製した。現在、感染実験を通じて、原因遺伝子を解明する予定である。原因遺伝子が解明できれば、中和抗体等ウイルスに対する免疫を誘導する弱毒化生ワクチンへの応用が可能になる。

研究成果の概要（英文）：The difference of pathogenicity between attenuated strain (Cat#1) and virulent strain (SPL010) of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) has been shown through animal studies. In this study, the cause of the difference of pathogenicity was explored in the level of virus genome.

Chimera virus (rgSFTSV) consisting of S, M, L segment of Cat#1 and SPL010 was prepared by reverse genetics. All of IFNAR1 knockout mouse (IFNAR1^{-/-}) infected with rgSFTSV containing M segment of Cat#1 were survived, showing a survival rate of 100%. All of IFNAR1^{-/-} infected with rgSFTSV containing M segment of SPL010 were dead, showing a survival rate of 0%. As a result, it is thought that M segment of SFTSV is involved in the pathogenicity.

研究分野：人獣共通感染症、ウイルス

キーワード：SFTSV Reverse genetics 弱毒株 M分節 GPC遺伝子

1. 研究開始当初の背景

SFTS は 2011 年中国で初めて患者が報告されて以来、マダニ媒介性の急性新興ウイルス感染症として、国内では感染症法で四類感染症に指定され対策等が行われてきた。一方、ネコ科動物も SFTSV 感染によりヒトと同様に重篤化し、致死率が 50% を超えることが分かった。また、SFTS 発症動物から飼い主や獣医医療従事者が感染する症例が増え、動物由来感染症としても重要な感染症として認識されるようになった。そこで、動物における SFTS 発症機序解明のために、ネコを用いた感染実験を進めた。その結果、SFTSV がネコに致死感染を起こすことを明らかにした (Park ES, 2019, Sci. Rep.)。また、リンパ組織中、B 細胞系 (形質芽細胞等) が SFTS 抗原陽性細胞であることから、SFTSV の主要な標的細胞である可能性が示唆された。これらの所見はヒトの SFTS 患者の病理組織学的解析と良く一致する。さらに、血液、糞便、尿及び眼瞼ぬぐいから感染性のあるウイルスが分離され、ヒトへの感染源になり得ることが分かった。そこで、SFTS 発症動物からヒトへの感染リスク軽減の観点から、動物のワクチン開発を開始している。一方、動物への SFTSV 感染実験から、SFTSV の株により病原性が異なる結果も得られた。SFTS 患者から分離された SPL010 株、SFTS ネコから分離された Cat#1 株をネコ及び SFTSV に感受性のある IFN α 1 遺伝子欠損 (IFNAR1 $^{-/-}$) マウスに感染させた結果、SPL010 株はネコで致死感染したが、Cat#1 株は不顕性感染した。また、SFTSV に感受性のある IFNAR1 $^{-/-}$ マウスでの LD₅₀ も SPL010 株と比較して Cat#1 株は $>10^5$ と弱毒であった。発症ネコからの分離株である Cat#1 株が弱毒であることは予想に反していたが、分離時に弱毒化に関わる変異が導入された可能性もある。いずれにしても Cat#1 株が生ワクチン候補株としての可能性を示唆する結果が得られた。

2. 研究の目的

Cat#1 株の弱毒ワクチンとしての可能性がこれまでに示唆されているが、弱毒化の責任遺伝子、弱毒化の遺伝的安定性などウイルス学的性状は未解明である。そこで本研究では、SFTSV の弱毒化に関する責任遺伝子、弱毒化の遺伝的安定性などを reverse genetics 系により明らかにする。Cat#1 株の様な弱毒株は報告されておらず、その弱毒化機構を解明し、より安全で有効なワクチン開発に資する科学的知見を提供することは極めて重要である。

3. 研究の方法

1) Cat#1 株の弱毒化に関わる機構の解明

Cat#1 株を感染させたネコでは中和抗体が高く誘導されることが確認されている。また、細胞を用いた *in vitro* での増殖性試験では SPL010 株と有意差はなかった。つまり、Cat#1 株の弱毒性はウイルスの増殖速度によるものではない。そこで、SPL010 株と Cat#1 株の reverse genetics 系を確立し、病原性に関わる責任遺伝子を解明する。Reverse

genetics 系はグラスゴー大学の Dr. Brennan らの方法 (Brennan et al., 2015, J Virol) を既に導入済みである。 IFNAR1^{-/-}マウスでの病原性を指標に、3 分節よりなるウイルスゲノムの入れ替え、アミノ酸の置換等により弱毒化の原因遺伝子と変異を特定する。

2) Reverse genetics により作出した rgSFTSV を用いた動物感染実験

上記で作製された Cat#1 株の親株及び更に弱毒化された Cat#1 の弱毒化の程度と体内でのウイルス動態及びウイルスの遺伝的安定性を IFNAR1^{-/-}マウスにおいて確認する。特に遺伝的安定性は IFNAR1^{-/-}マウスでの継代感染により確認する。さらに、弱毒化が確認されれば、生ワクチンとしての有効性も検証する。

3) 点変異の導入による弱毒化の原因遺伝子解明

上記 1), 2)により確認された原因遺伝子に Cat#1 から SPL010 へ、又は、SPL010 から Cat#1 への点変異を導入し、更なる原因遺伝子の解明を目指す。

4. 研究成果

1) Cat#1 株の弱毒化に関わる機構の解明

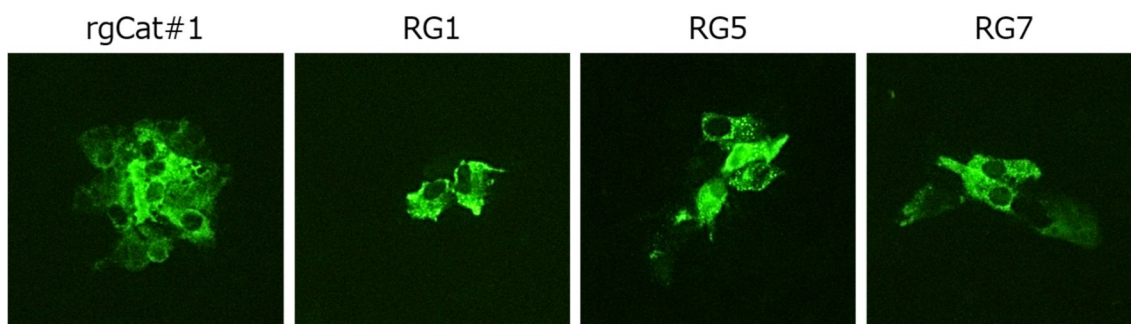


図 1 作出した rgSFTSV の一部

Cat#1 株及び SPL010 株の S, M, L 分節のゲノムを発現するプラスミドをそれぞれ作製した。それらを用いて、reverse genetics により、それぞれの三分節を持つ 8 種類のキメラウイルス(rgSFTSV)を作出した。こちらの rgSFTSV の力価を測定し、SFTSV の致死モデルである IFNAR1^{-/-}マウスに感染実験を実施した。

2) Reverse genetics により作出した rgSFTSV を用いた動物感染実験

作出した 8 種類の rgSFTSV を 10^3 TCID₅₀ を SFTSV の致死モデルである IFNAR1^{-/-}マウスに感染させ、体重変化及び生存率を確認した。その結果、Cat#1 株由来の M 分節を持つ rgSFTSV 感染マウス(図 2、赤系列)はすべて生存し、100%の生存率を示した。一方、SPL010 由来の M 分節を持つ rgSFTSV 感染マウス(図 2、青系列)は 0~40%の生存率を示した。更に、Cat#1 由来の M 分節を持つ rgSFTSV 感染マウス中一部は PBS

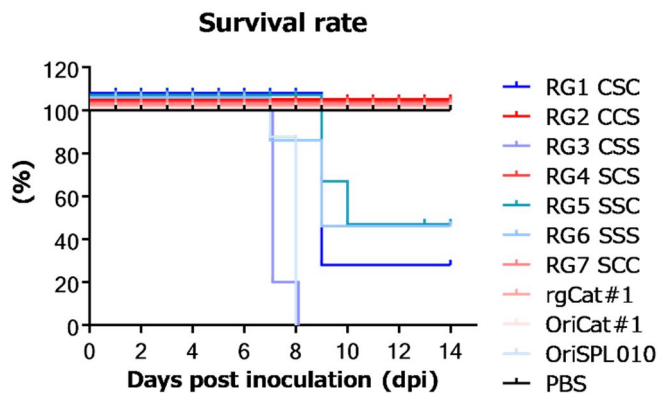


図 2 rgSFTSV 感染マウスの生存率

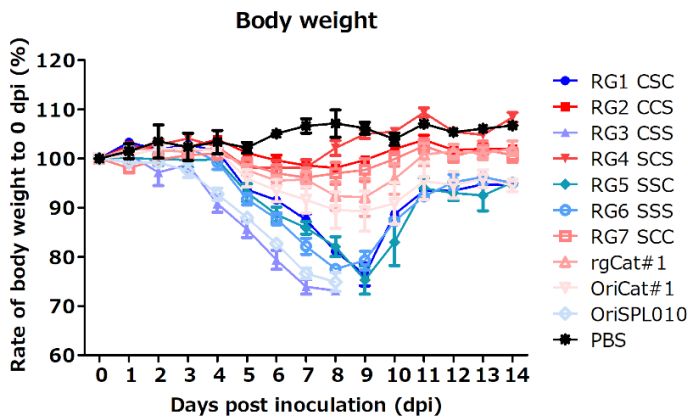


図 3 rgSFTSV 感染マウスの体重変化

接種マウスと同様の体重変化を示し、更に弱毒化された可能性が示唆された(図3)。

これらの結果から、Cat#1 株の弱毒化には M 分節、GPC 遺伝子が関与している可能性が示唆された。

3) 点変異の導入による弱毒化の原因遺伝子解明

上記の結果から M 分節が病原性に関わっていることが分かった。Cat#1 と SPL010 の M 分節、GPC 遺伝子には 18 カ所アミノ酸の差が存在する。そこで、Cat#1 の M 分節に SPL010 への点変異を導入した 18 種類の rgSFTSV を作出した。現在、これらの rgSFTSV を用いた IFNAR1-/-マウス感染実験を予定している。

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 朴ウンシル
2. 発表標題 日本国内の動物から分離された重症熱性血小板減少症候群ウイルスの病原性検討
3. 学会等名 日本衛生動物学会
4. 発表年 2022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
---------	---------