

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21256004

研究課題名（和文） アフリカとアジアにおいてデング出血熱の重症化を規定するウイルス遺伝子多型性の研究

研究課題名（英文） Study to identify viral genomic factors for severe dengue virus infections in Asia and Africa

研究代表者

森田 公一 (MORITA KOUICHI)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：40182240

研究成果の概要（和文）：

デング出血熱の重症化に関わるウイルス側因子を探索するため、アジアとアフリカで患者から血液検体を採取してウイルス学的、免疫学的解析を実施した。一次感染で重症化する成人が多数確認され抗体依存性感染増強現象（二次感染）以外の重症化機序の存在が確認された。患者血清中に存在するデングウイルスは多様であり、1 アミノ酸の変化で標的細胞を変更できることが明らかになった。現在、ウイルス遺伝子の変異と重症度との相関を解析している。

研究成果の概要（英文）：

To identify viral genomic factors for severe dengue virus infections, we conducted field surveys in Asia and Africa. A number of severe dengue cases were confirmed among adult patients with primary infections, suggesting additional mechanism of severity on top of the antibody-dependent infection theory. Viral quasispecies were analyzed and showed different target cell tropism even with a single amino acid alternation on E-protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2010年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2011年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
年度			
年度			
総計	35,600,000	10,680,000	46,280,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：デング出血熱・熱帯病・蚊媒介性・病原性・デングウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

熱帯地域におけるデング熱の流行は古くから比較的軽症で予後の良い急性熱性疾患として知られており、17世紀にはすでにオランダ人医師によりインドでのデング熱の流行が記載されている。しかし致命率の高い重症の『デング出血熱』は1953年、フィリピンのマニラ、ついで1954年にタイ国のバンコクで突如出現した新興感染症であり、その後急速に周辺の熱帯アジア諸国に拡大し1990年

代には中南米の国々へ侵入して、現在では熱帯地域において最重要の蚊媒介性ウイルス感染症となった。さらに近年、台湾や中国の香港、マカオ、広東省でもデング熱、デング出血熱の流行が発生するなど、地球温暖化によりデングウイルス活動域は確実に北上して我が国も無関心ではいられない国際感染症となっているが、いまだに重症化の機序は完全には解明されていない。

重症型デング感染は血管からの急速で大

量の血漿漏出によるショックと、播種性血管内凝固（DIC）による大量出血により特徴づけられる。従来からこの重症化の要因に関して 1) ウイルスの病原性、2) 患者の遺伝的素因、3) デングウイルスの2次感染説の3つが提唱されてきた。特に3) の2次感染説については、2回目の感染で発生する種々の免疫学的反応につき多種多様な研究が展開されてきた。

一方、本研究者は、アジア各国でデング熱・デング出血熱患者の血液からウイルスを分離しその遺伝子解析と分子疫学分析をしたところ、同じ地域で同時期に採取したデングウイルスは重症度と相関して遺伝子型が異なっている事を確認し、加えて同一患者から異なる感染性・増殖性を示す複数の株（準種）が分離され、遺伝子レベルでもその差異を確認した。これらのことから本研究では従来、軽視されていたデングの重症度に関与するウイルス側の要因を探求することがデング重症化因子を同定する上で必要であると考えに至った。また、従来から知られていることであるが、奇妙なことにアフリカではデング熱の流行は発生しているがデング出血熱の流行は報告されていない。本研究では調査地域を従来から研究されているアジアからアフリカに拡大することで、よりウイルス側の変異（差異）と重症度との関連を鮮明にすることが可能であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究ではデング出血熱の発症メカニズムについてウイルス側の要因を同定することを目的として、1) デング出血熱が流行を繰り返す東南アジアとデング熱は流行するが出血熱の少ないアフリカにおいて、患者血清から多種の培養細胞を用いてデングウイルスを分離し、過去にこの地域で分離され当研究所に保管されているウイルスもあわせてウイルス遺伝子を解析し地理的、年代的な変異を明らかにする、2) 分離した東南アジアとアフリカのデングウイルス株の分子レベルでの変異（遺伝子多型性）と患者の重症度を比較して重症化に関連する遺伝子型を明らかにする、3) 分離されたウイルス株のヒト培養細胞（特に単核球系細胞）に対するウイルス感染性、増殖性およびサイトカイン刺激性を調べ、その差異とウイルス遺伝子型との相関を明らかにする、4) 異なる遺伝子型のウイルスに感染した細胞の分泌液がヒト血管内皮細胞の細胞間隙を開裂するか否かを試験管内皮血管系を用いて検証する、さらに、5) リバースジェネティクスの手法等を用いて、検出した血管透過性亢進に関係するウイルス側因子の遺伝子、アミノ酸レベルでの特定を行う。

## 3. 研究の方法

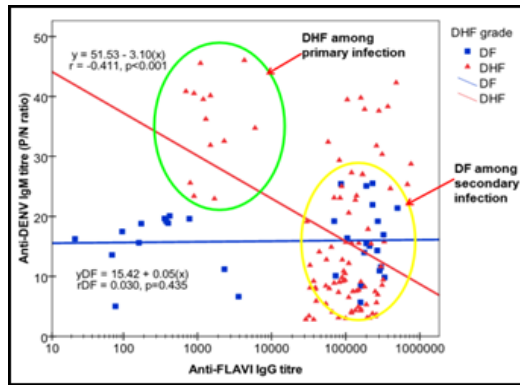
デング出血熱の発症メカニズムについてウイルス側の要因を同定するため、アフリカとアジアの研究拠点において、軽症および重症のデング熱、デング出血熱患者から血液を採取して、1) 遺伝子増幅検出法によりデングウイルスの新鮮感染を確認する。2) 陽性検体については血液中にあるデング感染細胞を同定するため、デング特異的標識抗体や細胞識別抗体を用いたフローサイトメトリー解析を実施する。3) さらに血清から蚊培養細胞と種々の単核球系培養細胞を用いてウイルス分離を実施する。4) 分離したウイルスは長崎大学熱帯医学研究所に搬送し、細胞特異性や増殖性を確定する。5) 生物学的特徴づけが完了したウイルス株についてウイルス遺伝子の全塩基配列を決定する。6) この情報にもとづき系統樹解析を実施して、ウイルス間の近縁度やウイルスが分離された患者の臨床症状との相関を検討する。7) これらのウイルスのうち重症化に関与すると想定される遺伝子上の特徴を持つウイルス株について、このウイルス感染単核球細胞からの既知のサイトカインが分泌されているか否かを調べるとともに、8) 試験管内での血管内皮細胞に対する影響を観察して未知の血管透過性因子の検出を試みる。9) ウイルスの単核球系細胞への感染性や増殖性、さらにはサイトカイン刺激性に関与すると考えられる遺伝子変異について、その変異を感染性デングウイルスcDNAクローンに組み換えてその変異を有する人工ウイルスを作製しその生物学的性質を確認して最終的な確認とする。10) 以上の結果を総合的に判断して、デング出血熱に関与すると考えられるウイルス遺伝子変異を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) サンプル採取、重症度と抗体価の相関。

平成21年度～平成23年度に実施した調査において、ベトナム、フィリピン、バングラデシュ、ミャンマー、ネパール、ケニアにおいて1500検体をこえる患者サンプルを採取し、研究計画に従ってデングウイルスの分離、免疫学的解析と遺伝子解析を実施した。

1次感染と2次感染とを簡便に血清検査で識別する定量的手法を開発し(Inoue, 2010)、サンプルを解析した結果、一次感染でも多くの重症例が発生していることを確認した。さらに一次感染で重症化する患者では高い特異的IgM抗体を有することが明らかになった(図1、投稿中)。このことは高い増殖を示す、あるいはIgM抗体産生を強く刺激するウイルス群と重症化の関連を示唆するとともに考えられ現在、ウイルス遺伝子との相関を解析している。



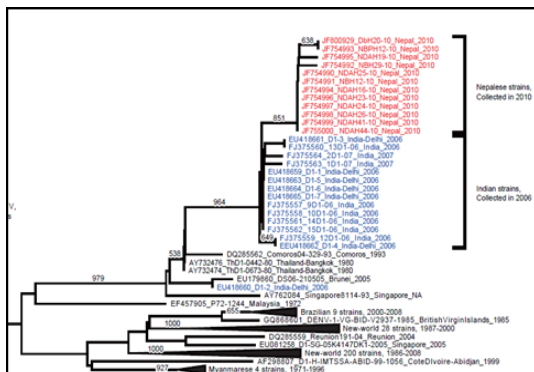
(図1) IgM抗体価と一次感染患者での重症度との相関(投稿中)、IgG:20,000以下は一次感染患者と判定される。

(2) デング感染細胞の探索。

フローサイトメトリーを用いたデング感染細胞の解析では、フィリピンにおけるデング1型と3型の流行においてCD19陽性細胞にデングウイルス感染が確認され、デングウイルスが感染する単核球系の細胞のうちB細胞も感染の標的となりうることを示された(Michael O Baclig, 2010)。その他、ベトナムにおける調査では、赤芽球系細胞やNK細胞に抗原陽性細胞を認め、デングウイルス標的細胞の多様性を示す結果が得られた。

(3) ウイルス分離と遺伝子解析結果。

ベトナム、フィリピン、ミャンマー、ネパール、バングラデシュ、ケニアの患者血清から多くのウイルス株を分離し、遺伝子解析をした(株数が多く解析は現在も継続中)。系統樹解析については解析結果を現在投稿中である。これらの結果から、デングウイルスはそれぞれの地域で独自に進化(変化)を続けていることが示されたが、ネパールにおける2010年の流行ではインドから陸路、有史以来初めてカトマンズまで感染が拡大したことが判明した(図2)。重症度と遺伝子変異の相関は現在解析中である。



(図2) 2010年のネパール(カトマンズ)でのデング流行はインドから陸路拡大した。赤字(ネパール株)、青字(インド株)

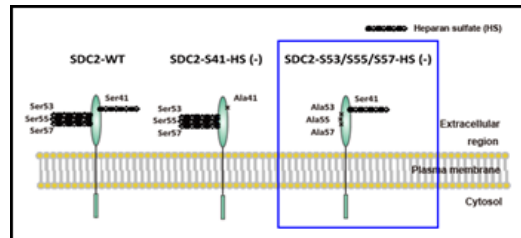
(4) ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を用いた透過性亢進の定量化システムの構築。

ヒト内皮細胞を用いてin vitroで血管の透過性亢進を検査する系を構築して、重症デング患者から分離したウイルスを単核球系の細胞に感染させた感染上清に血管透過性亢進を起こさせる因子があるか否かについて検証した。いくつかの株については弱い透過性亢進効果が観察された。現在、常法にしたがって亢進物質の同定作業へ進んでいる。またウイルス遺伝子多形との関連も検索している。

本研究の途中、ウイルス株により血管内皮細胞へ直接感染している株と感染しない株が存在するという予期しない結果を得た。これについては次項、(5)のデングウイルス受容体の多様性を示す一例とも判断し、現在ウイルス遺伝子多形との関連を検索中である。

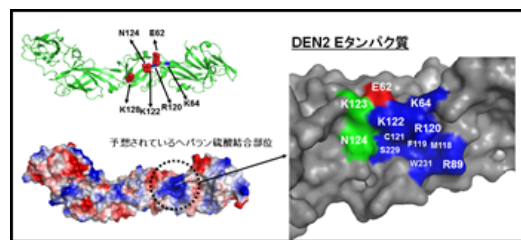
(5) 感染細胞特異性と新規レセプターの同定。

今回の調査により、各国で流行しているデングウイルスは種々の細胞に感染することが示され、またウイルス準種により感染細胞特異性も異なることが示された。現在、それぞれの細胞におけるウイルス受容体を同定する作業を進めている。たとえば、デング出血熱患者から分離された赤芽球系細胞に感染性を持つウイルス株については細胞表面のSDC2分子が受容体として働くことを同定した(Okamoto 2012)。またこの結合はSDC2分子のSer41に結合する糖鎖を介することが明かになった(図3)。



(図3) SDC2のSer41に修飾された糖鎖がデング2型ウイルス株16681株の感受性に重要)

さらにこのレセプターのウイルス側結合部位はEタンパク質上の塩基性アミノ酸集中する立体構造上のポケットであることが予測され、この部位の1アミノ酸置換(Eタンパクの62 K→E)によってウイルスの結合性が失われることも明らかになった(図4)。



(図4、ウイルスEタンパク上のリセプター結合が予想される部位、1アミノ酸の変異により結合性が消失する。)

#### (6) その他の成果

本調査においては多数のウイルス株が分離され、デングウイルス以外のウイルスも分離された。このため、質量分析計(nLC-MS/MS)を用いた簡便な網羅的アルボウイルス同定法を開発した(Okamoto 2010)。また、デングウイルス感染を迅速に検出するため、1チューブでデングウイルス遺伝子を高感度に検出できるRT-LAMP法による迅速診断法(投稿準備中)を実用化した。

#### (7) 総括

今回の調査期間中にケニアでのデング流行が2011年からソマリア国境で始まったため、サンプル採取に時間を要しアフリカ株の解析は現在も進行中でありアジア、アフリカ株の総合比較解析にはまだ多少の時間を要するが、予定した解析は今後も継続し完了する。

本調査研究において、現時点で明らかになった事柄として、1) アジアでは成人でも1次感染において多数の出血熱患者が発生していることがあげられる。この事実から2次感染における抗体依存性感染増強現象による重症化とは別の、1次感染における重症化メカニズムが存在することは明らかである。2) 1次感染における重症化例ではデングウイルス特異的IgM抗体が例外なく高値であった。このことから、ウイルス側因子として高いIgM応答をきたす機序と血管透過性亢進機序との関連を今後追及すべき項目として考慮する必要がある。3) デングウイルスの多様性は1患者の体内から多くの準種ウイルスが分離されたことから明らかである。4) このうちウイルス粒子表面タンパクEの差異により感染標的細胞が変化し重症化に関与する可能性が示唆された。例えばウイルスEタンパクの、62E-Kの変化(1アミノ酸の変異)によりデングウイルスはSDC2を受容体として利用できるようになった。SDC2は血管内皮細胞にも発現しているとされ、同一患者体内で多様に分化して存在しているデングウイルス準種の新規受容体を1つ1つ同定してゆく事は重症化に関わるウイルス側因子を解明するうえで不可欠の作業である。5) ヒト血管内皮細胞を用いた血症漏出検出系は確立できたが、この系を用いてデングウイルス感染単核球から分必されることを予想した血管透過性亢進因子(新規サイトカイン、X因子)の同定は未だ成功していないが、今後デングウイルスを一次感染させる単核球系培養細胞の種類を増やしてX因子の探索を継続する。

最後に本調査に際しては、ベトナム国立衛生疫学研究所、フィリピン・セントルークス医療センター、ネパール Sukra Raj 熱帯病・感染症病院、バングラデシュ農業大学、上ミャンマー医学研究所、ケニア国立医学研究所の皆様にお世話になりました。謹んで御礼申し上げます。

#### 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16件)

- 1) Okamoto K, Kinoshita H, Parquet MC, Raekiansyah M, Kimura D, Yui K, Islam MD, Hasebe F, Morita K, Dengue virus strain DEN2 16681 utilizes a specific glycochain of syndecan-2 proteoglycan as a receptor. *Journal of General Virology*. Vol. 93(4): 761-770. 2012、査読有
- 2) Furuta T., Morita K. (12番目), Watanabe N. (他12名) Association of Mast Cell-Derived VEGF and Proteases in Dengue Shock Syndrome. *PLoSNTD*, Vol.6:e1505. 2012、査読有
- 3) Tran Thi Ngoc Ha, Morita K. (13番目), (他12名) Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *Plos One* 6(10):e25969. 2011、査読有
- 4) Nga PT, Parquet MC, Lauber C, Parida M, Nabeshima T, Yu F, Thuy NT, Inoue S, Ito T, Okamoto K, Ichinose A, Snijder EJ, Morita K, Gorbalenya AE. Discovery of the First Insect Nidovirus, a Missing Evolutionary Link in the Emergence of the Largest RNA Virus Genomes. *PLoS Pathogens* 7 (9) : e1002215. 2011、査読有
- 5) Lyre Anni Espada-Murao and Kouichi Morita. Delayed cytosolic exposure of Japanese encephalitis virus double-stranded RNA impedes interferon activation and enhances viral dissemination in porcine cells. *Journal of Virology*, Vol. 85 (13) : 6736-6749, 2011、査読有
- 6) Wichit S, Morita K (9番目), (他10名), Jampangern W. Dengue virus type 2 recognizes the carbohydrate moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian and mosquito cells. *Microbiol Immunol*. Vol. 55(2):135-140, 2011、査読有
- 7) Michael O Baclig, Leonora TS Gervacio,

- Lady-Anne C Suarez, Corazon C Buerano, Ronald R Matias, Atsushi Kumatori, Shingo Inoue, Kouichi Morita, Filipinas F Natividad and Futoshi Hasebe, Flow Cytometric Analysis of Dengue Virus-infected Cells in Peripheral Blood. Southeast Asian Trop Med Public Health, Vol 41(6): 1352-1358, 2010、査読有
- 8) Kato D., Morita K., (8番目) (他8名) . Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. Antiviral Research Vol. 88:236-243. 2010、査読有
- 9) Nabeshima T, Morita K. Phylogeographic analysis of the migration of Japanese encephalitis virus in Asia. Future Virology. Vol.5(May) 343-351. 2010、査読有
- 10) Okamoto K, Endo Y, Inoue S., Nabeshima T, Nga PT, Guillermo PH, Yu F., Loan DP, Trang BM, Natividad FF, Hasebe F., Morita K. Development of a rapid and comprehensive proteomics-based arboviruses detection system. J. Virol. Meth. Vol.167:31-36. 2010、査読有
- 11) Inoue S., Alonzo M., Kurosawa Y., Reyes J. Dimaano E., Alera M., Saito M., Oishi K., Hasebe F., Matias R., Natividad F. and Morita K. Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. Vector-Borne and Zoonotic Diseases Vol.10(2): 143-150, Mar 2010、査読有
- 12) Kouichi Morita. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in East Asia. Vaccine. Vol. 27:7131-7132, 2009、査読有
- 13) Kinoshita H, Mathenge EG, Hung NT, Huong VT, Kumatori A, Yu F, Parquet MC, Inoue S., Matias RR, Natividad FF, Morita K., Hasebe F. Isolation and characterization of two phenotypically distinct dengue type-2 virus isolates from the same dengue hemorrhagic Fever patient. Jpn J Infect Dis. Vol.62(5): 343-50. 2009、査読有
- 14) Shoko Honda , Shingo Inoue (8番目) , (他10名) Increased Phagocytosis of Platelets from Patients with Secondary Dengue Virus Infection by Human Macrophages. Am. J. Trop. Med. Hyg., 80(5):841-845, 2009、査読有
- 15) 森田公一 ; 蚊媒介性の熱帯性ウイルス疾患-デング出血熱の発症機序をめぐって-; 最新医学 (The Medical Frontline), Vol 64(4), 919-923, 2009、査読無
- 16) 森田公一、木下一美 ; デング熱研究の最前線; 医学のあゆみ (J. Clin. Exp. Med.) Vol.229(4), 241-245 2009、査読無
- [学会発表] (計 33 件)
- 1) Hasebe F.: Characterization of dengue 1 epidemic strains in Hanoi, Vietnam in 2009. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012.
- 2) Morita K.: Rapid and comprehensive identification of virus strains by using LC tandem-MS method. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012.
- 3) Nguyen Tien Huy: Cell-free Circulating DNA: a Novel Biomarker in Dengue Virus Infection. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012.
- 4) Kenta Okamoto: DEN2 strain derived from DHF patient utilizes SDC2 for infection in erythroid cells, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 11-16, 2011.
- 5) Basu Dev Pandey: Emergence of dengue in Kathmandu, Nepal, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 11-16, 2011.
- 6) Mya Myat Ngwe Tun: Dengue primary infections observed among dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in upper Myanmar: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 11-16, 2011.
- 7) Futoshi Hasebe: Characterization of dengue 1 epidemic strains proliferated in Hanoi, Vietnam in 2009. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 11-16, 2011.

- 8) 岡本健太：赤芽球細胞への株特異的 Dengue ウイルス感染と感受性受容体の同定. 第 51 回日本熱帯医学会大会、仙台市、2010 年 12 月 3-4 日
- 9) Nguyen Thi Thu Thuy: Dengue fever (DF)/Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) situation in Vietnam. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010, Hanoi Hotel, Vietnam. November 11-12, 2010
- 10) Okamoto K: Variable susceptibility of erythroid cells to DENV strains in an SDC2-dependnt manner. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010, Hanoi Hotel, Vietnam. November 11-12, 2010
- 11) 岡本健太：赤芽球系細胞に対する Dengue 2 型ウイルスの感受性受容体の同定. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 11 月 7-9 日
- 12) Morita K.: Rapid and comprehensive arboviruses detection by using nLC-ESI/ MS/MS, 14<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infections in the Pacific Rim. Penang, Malaysia October 4-6, 2010
- 13) 岡本健太：新規 Dengue ウイルス感受性細胞における感染受容体の同定. 第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会・宮崎市、2010 年 9 月 3-4 日
- 14) Islam M. A., and Morita, K. : Isolation and identification of three sero-types of dengue viruses from the outbreak year 2007 and 2008 in Bangladesh. Emerging Infectious Diseases 2009. Singapore, 2009 年 12 月 8-11 日.
- 15) Pandey B: Serological and molecular study of dengue virus infection in the endemic Terai Region of Nepal. Emerging Infectious Diseases 2009. Singapore, 2009 年 12 月 8-11 日.
- 16) 久保亨：ケニア共和国における黄熱ウイルスならびにその他の蚊媒介性熱帯ウイルス感染症の網羅的血清学的解釈. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京都、2009 年 10 月 25-27 日
- 17) Tran Thi Ngoc Ha, : Role of circulating plasma DNA in severe dengue disease. 第 50 回日本熱帯医学会大会、宜野湾市、2009 年 10 月 22-23 日.
- 18) 長谷部太：Dengue ウイルスと viral quasispecies (ウイルス準種). 第 50 回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009 年 10 月 22-23 日.
- 19) 岡本健太：LC/MS/MS を用いた蚊媒介性ウイルスの迅速的網羅的同定法. 第 50 回日本熱帯医学会大会、宜野湾市、2009 年 10 月 22-23 日.
- 20) Lyre Anni Murao, Kouichi Morita: RNA-dependent regulation of the interferon response by dengue virus. 第 50 回日本熱帯医学会大会・宜野湾市、2009 年 10 月 22-23 日.
- 21) Morita K. Isolation & characterization of two phenotypically distinct dengue type-2 viruses from the same dengue hemorrhagic fever patients. 43<sup>rd</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, Philadelphia, USA, 2009 年 7 月 20-22 日  
(他 12 件)
- 〔図書〕(計 1 件)  
森田公一、Dengue 熱 (p403-406)、感染症事典、感染症事典編集委員会編、オーム社、2012.
- 〔その他〕  
ホームページ  
<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/virology/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
森田 公一 (MORITA KOICHI)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号：40182240
- (2) 研究分担者  
長谷部 太 (HASEBE FUTOSHI)  
長崎大学・国際連携研究戦略本部・教授  
研究者番号：20253693  
井上 真吾 (INOUE SHINGO)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：00346925  
久保 亨 (KUBO TORU)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：50444873  
余 福勲 (YU FUXUN)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：30437842  
早坂 大輔 (HAYASAKA DAISUKE)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：10346926
- (3) 連携研究者  
濱田 剛 (HAMADA TUYOSHI)  
長崎大学・先端計算研究センター・准教授  
研究者番号：00443010