

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25年 6月24日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390093

研究課題名（和文）ウイルス免疫学的解析に基づくデング熱・デング出血熱の病態形成機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of dengue fever and dengue hemorrhagic fever based on viral and immunological analysis

研究代表者

倉根 一郎（KURANE ICHIRO）

国立感染症研究所・副所長

研究者番号：90278656

研究成果の概要（和文）：

デングウイルス感染症は世界で最も重要な蚊媒介性ウイルス感染症である。デングウイルス感染におけるデング出血熱の発症機序の解明のため、マーモセットを用いてデングウイルス感染モデルの確立を行った。マーモセットは感染後高いウイルス血症を示し、また抗体反応、臨床的所見、血液学および生化学的検査所見もヒデング熱患者と同様の変化が見られた。また、マーモセットにおけるT細胞免疫応答の詳細な解析のため、サイトカインや細胞マーカー解析のツールを確立した。

研究成果の概要（英文）：

Dengue virus infection is one of the most important mosquito-borne virus infectious diseases in the world. We developed an animal model to analyze the pathogenesis of dengue fever, using common marmosets. Marmosets demonstrated high levels of viremia after dengue virus infection. Marmosets also demonstrated antibody responses, and hematological and biochemical changes similar to those detected in dengue fever patients. Immunological methods to detect cytokines and cellular markers were developed, in order to precisely analyze T cell immune responses in marmosets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,110,000	6,810,000
2011年度	4,900,000	930,000	5,830,000
2012年度	2,200,000	450,000	2,650,000
年度			0
年度			0
総計	12,800,000	2,490,000	15,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス・感染症・免疫学

1. 研究開始当初の背景

デングウイルス感染症は熱帯地域で最も重要な蚊媒介性ウイルス感染症といえる。年間数千万人のデング熱患者と約50万人のデ

ング出血熱患者の発生が報告されている。一方、温帯に位置する日本にとっては輸入感染症としての重要な感染症でありや、年間約200人の輸入患者が報告されている。ワクチ

ンは実用化されておらず、特異的な治療法も確立されていない。デング熱、デング出血熱の病態形成機序の解明が遅れている理由の一つは、動物モデルが確立されていないことにある。これまで、げっ歯類や霊長類を用いた動物モデルの開発が進められてきたが、ヒトにおける病態を反映するモデルは確立されていない。従って、動物モデルの開発が急務である。

2. 研究の目的

デングウイルス感染におけるデング出血熱の発症機序については、ウイルス側や生体免疫側に立脚した研究でも十分に解明されていない。一部の感染者のみになぜ重篤で致死的な病態が起こるのか、それが生体内のいかなる因子に起因するかを明らかにする事が重要である。デングウイルス感染やデング出血熱の病態形成機構を解明し、効果的な治療、予防法を確立することが目的である。コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*, マーモセット) は代表的な非ヒト霊長類の実験動物であるが、我々はこれまでに、マーモセットがデングウイルスに感受性を有する結果を得ている。本研究においては、コモンマーモセットを用いた動物モデルを確立し、病態形成に関与する T 細胞の解析のための免疫学的開発ツールの開発を行う。そのため主要組織適合性抗原および T 細胞受容体遺伝子を同定するとともに、レパトア解析や次世代大規模シーケンス解析による網羅的解析を確立する。

3. 研究の方法

(1) デングウイルス感染モデルの開発：マーモセットに、デングウイルスを接種しウイルスの各種接種条件において、ウイルス血症とともに、発熱等の症状を啓示的に観察するとともに腎臓病変が複数例で観察された。これらの病態形成を解明するため、デングウイルスの単回接種や他の血清型ウイルスの2回目接種を行い、ヒトにおいて観察されるように再感染において症状が重篤化するかどうか検討する。再感染の接種間隔は接種した血清型以外に対する中和抗体価が10倍まで低下する時期を目安とし、再感染後においても血液学的評価、尿の評価を経時的に行う。

(2) 免疫学的解析用サンプル採取：マーモセット4頭より、脾臓、腸間膜リンパ節、空腸、回腸、結腸、大脳、小脳、脳幹、心臓、肺、肝臓、腎臓を採取した。組織はRNAlaterに浸漬し-80℃で保管した。またマーモセット8頭より採血を行い、白血球を分離した。

(3) 特異的プライマー：各 HKG および免疫

関連遺伝子の特異的プライマーの設計は、ヒトとの比較を行うため、ヒト配列と相同性の高い部分を採用した(表1、表2)。

(4) qPCR：解析機器はBio-Rad CFX96 system (Bio-Rad) を用いた。PCR 反応液は以下のように実施した (SsoFast™ EvaGreen® Supermix : 5 μ L、DW : 3.5 μ L、5 μ M primer mix : 0.5 μ L、cDNA : 1 μ L)。PCR 温度設計は以下のように実施した (初期変性 : 30 sec 95° C、増幅反応 : 1 sec 95° C、5 sec 60° C を 45 サイクル)。コピー数は、配列を確認しているプラスミド DNA クローンをスタンダードに置いて算出した。

(5) TCR レパトア解析：マーモセット TRAV/TRBV 特異的プライマーの設計と、すでに確立しているヒトやマウスのマイクロプレートハイブリダイゼーション解析 (MHA) 法のマーモセットでの応用を行う。確立に際して刑が信頼に足るものであるかを調べるため、各 V プライマーの交差反応性・実験の再現性・抗体を用いた胆ペルベルトの相動性および得られた TCR レパトアのヒトとマウスとの比較を行った。近年、qPCR の評価に関するガイドラインが作成され、異なるサンプルを正確に比較する際に normalization として用いる最適なハウスキーピング遺伝子の厳密な選択方法が提唱されている。ハウスキーピング遺伝子は実験に用いる組織や細胞、実験条件などに影響を受けないことが重要であるため、評価系として十分な注意のもとに行った。また、T 細胞のアイデンティティを決定する T 細胞受容体 (TCR) の α 鎖と β 鎖に特異的な V プライマーを作成し、網羅的に発現頻度の変化を解析することのできる TCR レパトア解析法の確立を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認 (610,007) を得て実施した。

4. 研究成果

(1) マーモセットにおけるデングウイルス感染

マーモセットにデングウイルス 1-4 型を接種し、ウイルス血症のレベルを経時的に調べた。デングウイルス 1-4 型いずれの接種においても高いレベルのウイルス血症がコンスタントに認められた。また、デングウイルス感染の成立を示唆する NS1 抗原がコンスタントに検出された (図 1)。

次に、デングウイルスに対する抗体反応を調べると、ヒトにおけると同様に、早期に IgM が出現し、その後 IgG が出現した (図 1)。

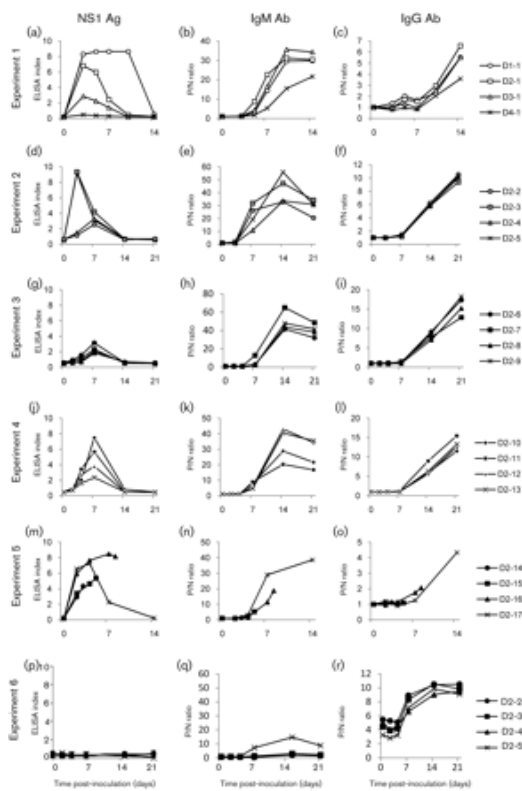


図 1：デングウイルス感染後の NS1 抗原の出現と IgM、IgG 抗体応答

(2) デングウイルス抗原の臓器における検出
 感染したマーマセツトにおけるデングウイルス抗原の存在を免疫組織染色により確認した。特に、脾臓および膵臓に抗原が認められた (図 2)。

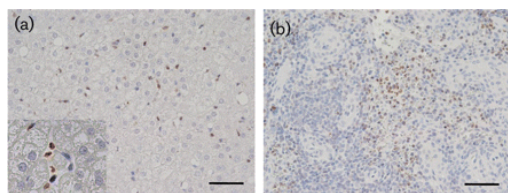


図 2：デングウイルス抗原の臓器における検出。(a) 肝臓、(b) 脾臓

(3) 感染マーマセツトにおける血液学的及び生化学的解析
 感染マーマセツトにおいて白血球減少、血小板減少等、デング熱患者において見られる血液学的変化が認められた。また、AST や ALT の計度上昇等デング熱患者において認められる血液生化学的所見も認められた。しかしこれらの所見はすべての感染マーマセツトにおいては認められなかった。

(4) 感染マーマセツトにおける臨床所見

感染マーマセツトにおいては発熱および行動量の減少が認められた。しかし、しかしこれらの所見はすべての感染マーマセツトにおいては認められなかった。

(5) マーマセツトとヒト白血球における各免疫関連遺伝子の発現比較：CD4、IL-4 の発現量において、ヒトよりもマーマセツトで有意に低値を示したが、IL-10、IL-12 β 、IFN- γ は有意に高値を示した。CD8/CD4 比において、マーマセツトではヒトよりも有意に高値を示し、この傾向はフローサイトメトリーによる結果とも一致し (図-7)。さらに IFN- γ /IL-4、IL-2/IL-4 比においてもマーマセツトはヒトよりも有意に高値を示し、Th バランスがヒトと異なることを示した。

(6) マーマセツトにおける T 細胞レセプター解析系の確立

マーマセツト TRAV/TRBV 特異的プライマーの設計と TCR レパトア解析：TCR レパトア解析を確立するために、まずコモンマーマセツトにおける TCR 遺伝子を同定する必要がある。これまでに TCRAV および TRBV の遺伝子同定が完了しプライマーを設計した。TRAV/TRBV の DNA プロブの交差反応性をそれぞれ検討したところ、TRAV では 992 か所中 2 か所、TRBV では 992 か所中 7 か所で 10% の交差反応性が見られたのみであった。実験の再現性の確認として同一 PBMC サンプルを 3 回解析した結果、TRAV/TRBV 共に高い再現性を示すことが分かった (図 3)。

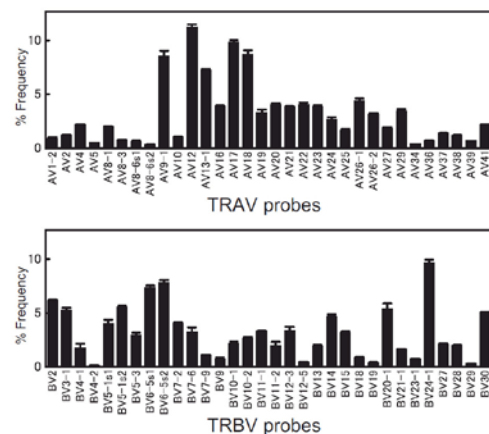


図 3：マーマセツトの T 細胞レセプター発現解析の再現性

マーマセツトの TCR に対する抗体は現在作成されていないため、ヒト TCRV β との交差反応性の確認を行った。ヒト抗体でマーマセツト PBMC において反応したものは V β 5.2、23 の 2 つのみであったが、FACS ソーティングを行い検証した結果、V β 5.2 は非特異的に多くの V 遺伝子と結合していることが分かった。V β 23 はソーティングされたマーマセツト

細胞において TRBV13 遺伝子シグナルを特異的に検出していることが明らかとなった。FACSにおける発現頻度とMHA法の結果を比較したところ、有意な差は見られなかった。以上より、開発したマーマセットにおけるTCRレパトア解析系は交差反応性が非常に少なく、蛋白レベルとの相関があり、かつ高い再現性があり解析系が確立された。

この確立したTCRレパトア解析系を用いてマーマセットの個体間および組織間で比較を行った。まずPBMCでの個体間比較を行ったところ個体間で類似のパターンを示し、その変動範囲は3SDに限定された(図4)。

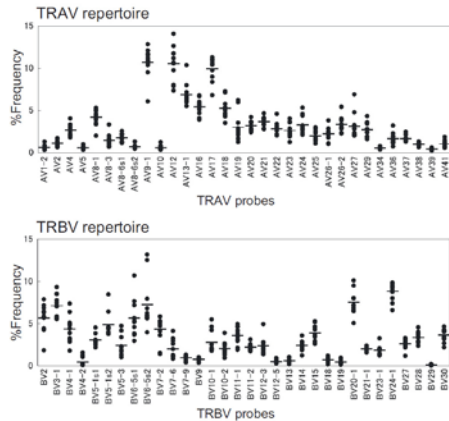


図4: マーマセットにおけるT細胞レセプター発現の末梢血における個体差

次いでPBMC、脾臓、リンパ節、胸腺の比較を行った。各組織ではPBMCと類似のパターンを示した。また、マウスにおいてはマウス乳癌ウイルス(MMTV)の影響により胸腺におけるT細胞のCD4+CD8+ (DP) からCD4+CD8- (CD4SP) もしくはCD4-CD8+ (CD8SP) への発達過程において一部Vβファミリーでデレージョンを起こすことが知られているが、マーマセットにおいてはそれらは確認されず、胸腺分画においても類似することが明らかとなった。以上よりマーマセットのTCRレパトアはヒトと同様個体間で類似の傾向を示し、かつ組織特異性も低いことが明らかとなった。

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7件)

Fujii, K., Matsutani, T., Kitaura, K., Suzuki, S., Itoh, T., Takasaki, T., Suzuki, R. and Kurane, I.: Comprehensive analysis and characterization of the TCR alpha chain sequences in the common marmoset. *Immunogenetics*. 62(6): 383-385, 2010.

DOI:10.1007/s00251-010-0445-0

Omatsu, T., Moi, M.L., Hirayama, T., Takasaki, T., Nakamura, S., Tajima, S., Ito, M., Yoshida, T., Saito, A., Katakai, Y., Akari, H. and Kurane, I.: Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. *Journal of General Virology*. 92(Pt 10):2272-2280, 2011.
DOI:10.1099/vir.0.031229-0.

Matsutani, T., Fujii, Y., Kitaura, K., Suzuki, S., Tsuruta, Y., Takasaki, T., Ogasawara, K., Nishimoto, N., Kurane, I. and Suzuki, R.: Increased positive selection pressure within the complementarity determining regions of the T-cell receptor β gene in New World monkeys. *American Journal of Primatology*. 73: 1082-1992, 2011.
DOI: 10.1002/ajp.20976.

Omatsu, T., Moi, M.L., Takasaki, T., Nakamura, S., Katakai, Y., Tajima, S., Ito, M., Yoshida, T., Saito, A., Akari, H. and Kurane, I.: Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *Journal of Medical Primatology*. 41(5):289-296, 2012
DOI:10.1111/j.1600-0684.2012.00552.x.

Kitaura, K., Fujii, Y., Matsutani, T., Shirai, K., Suzuki, S., Takasaki, T., Shimada, S., Kametani, Y., Shiina, T., Takabayashi, S., Katoh, H., Ogasawara, K., Kurane, I. and Suzuki, R.: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *Journal of Immunological Methods*. 384(1-2):81-91, 2012
DOI: 10.1016/j.jim.2012.07.012.

Fujii, Y., Kitaura, K., Matsutani, T., Shirai, K., Suzuki, S., Takasaki, T., Kumagai, K., Kametani, Y., Shiina, T., Takabayashi, S., Katoh, H., Hamada, Y., Kurane, I. and Suzuki, R.: Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using

selected reference genes. PLoS One. 8(2):e56296. 2013.
DOI: 10.1371/journal.pone.0056296

Moi, M.L., Omatsu, T., Hirayama, T., Nakamura, S., Katakai, Y., Yoshida, T., Saito, A., Tajima, S., Ito, M., Takasaki, T., Akari, H. and Kurane, I.: Presence of viral genome in urine and development of hematuria and pathological changes in kidneys in common marmoset (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. Pathogens 2: 357-363, 2013.

[学会発表] (計3件) 北浦一孝、松谷隆治、藤井克樹、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、小笠原康悦、西本憲弘、倉根一郎、鈴木隆二: 新世界ザルにおけるT細胞受容体β鎖遺伝子のCDR3領域における正の選択第40回日本免疫学会学術集会(東京)2011年11月27-29日

北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、倉根一郎、鈴木隆二: コモンマーモセットにおけるTCRレパトア解析法の開発第59回日本実験動物学会総会(別府)2012年5月24-26日

北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、亀谷美恵、倉根一郎、鈴木隆二: コモンマーモセットにおけるリアルタイムPCRを用いた免疫関連遺伝子発現解析第60回日本実験動物学会総会(つくば)2013年5月15-17日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉根 一郎 (KURANE ICHIRO)
国立感染症研究所 副所長
研究者番号: 90278656

(2) 研究分担者

高崎 智彦 (TAKASAKI TOMOHIKO)
国立感染症研究所 ウイルス第一部室長
研究者番号: 20221351

松谷 隆治 (MATSUTANI TAKAJI)
和歌山県立医科大学医学部 講師
研究者番号: 70372290

鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI)
独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長
研究者番号: 70373470

[学会発表] (計3件) 北浦一孝、松谷隆治、