

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590542

研究課題名(和文) デングウイルス感染マウスモデル系の作成

研究課題名(英文) Development of murine model for dengue virus infection

研究代表者

黒須 剛 (KUROSU, TAKESHI)

大阪大学・微生物病研究所・招へい教員

研究者番号：70432432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：デングウイルス感染症重症化機序は明らかではなく、効果的な治療法・予防法はない。本研究では病態機序の解明のため、マウス増殖性キメラデングウイルスを作成し、マウスへ接種し、重症化患者に観察される血漿漏出、血小板減少症、抗体依存性感染増強の観察に成功した。このモデルでは感染により惹起される腫瘍壊死因子(TNF-alpha)の過剰発現が原因で重症化していた。また血小板減少に関連する強い骨髄抑制効果が観察された。このモデル系は抗デングウイルス抗体の治療効果及び副反応などの治療薬候補の効果判定できる系であることが判明し、今後、重症化の病態機序解明や治療法の開発に有用なモデル系となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of severe dengue remains unknown, and there is no effective drug or therapy against dengue virus infection. To understand the mechanism of severe dengue, we established the mouse model system using the recombinant chimeric dengue virus and interferon knock out mice. Mice infected with the chimeric dengue virus showed plasma leakage, thrombocytopenia and antibody-dependent enhancement which have been seen in patients with severe dengue. Tumor necrosis factor (TNF) alpha was a critical factor for severe diseases. In addition, we observed strong bone marrow suppression, which is related to thrombocytopenia.

We examined if this model could be applied to study the therapeutic effect and side effect of anti-dengue virus antibody. This model is a valid model system to study pathogenesis of severe dengue and development of therapeutics.

研究分野：基礎医学 ウイルス学

キーワード：デングウイルス 熱帯感染症 蚊媒介性疾患 新興・再興感染症

1. 研究開始当初の背景

デングウイルス感染症は世界中で毎年5千万人が感染し、25万人の重症化例をみる蚊媒介性の重要な疾患である。重症化すると血漿漏出により出血を伴うショック症状が起こる。デングウイルス感染症による重症化の病原機序は明らかではなく、効果的な治療法・予防法はない。

2. 研究の目的

重症化機序解明の遅れは動物感染モデルがないためであり、それはデングウイルスがヒトと蚊以外には感染しないためである。これには自然免疫が鍵になっていると考えられる。一方、同じフラビウイルス属に属する日本脳炎ウイルス (JEV) はマウスに致死感染を起こす。本研究では、両ウイルスのマウスでの自然免疫に対する制御機序の違いを利用し、重症化が観察されるデングウイルスのマウス感染モデル系を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス増殖性デングウイルスの開発
デングウイルスと日本脳炎ウイルスとのキメラウイルスを作成し、マウス由来培養細胞での増殖性を確認する。

(2) マウスを用いた感染実験

野生型、IFN系ノックアウトマウスにデングウイルス、日本脳炎ウイルス及びキメラウイルスを接種し、致死性、ウイルス増殖を観察する。

(3) デングウイルス感染マウスモデルの開発

デングウイルス、日本脳炎ウイルス及びキメラウイルスをマウスに接種し、ヒト感染者の重症例に観察される血漿漏出、血小板減少症、抗体依存性感染増強効果について解析する。

(4) モデル系の治療法開発などへの応用可能性についての検討

作成されたマウスモデル系を使用し、抗デングウイルス抗体をマウスへ導入し、抗体の防御効果を判定する。

4. 研究成果

(1) マウス増殖性デングウイルスの開発
マウス細胞で増殖できる組換えキメラデングウイルス作成を試みた。デングウイルスはマウス細胞では一旦増殖するが、感染5日後には細胞のI型インターフェロンによって排除された(図1)。一方、日本脳炎ウイルスはマウス細胞で増殖可能である。これを利用し、2型デングウイルスに由来するpremembrane (prM)とエンベロープ(E)を日本脳炎ウイルスへ組込んだキメラウイルスを作成した。キメラデングウイルスはマウス培養細胞で増殖することに成功した。1型お

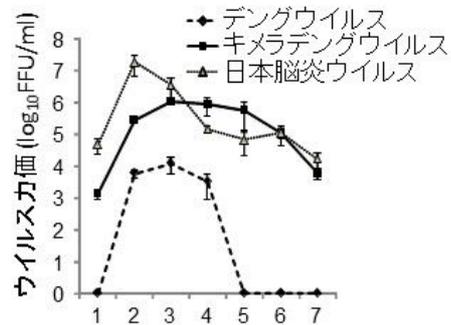


図1. マウス細胞におけるキメラデングウイルスの増殖

よび4型デングウイルスのprMとE領域を持つキメラウイルス作成にも成功した。

(2) マウスを用いた感染実験

キメラデングウイルスを野生型マウス(C57BL6, H3, BALB/cなど)へ感染したが、致死感染は引き起こさなかった。幼弱なマウスでは致死感染を起こしたが、ウイルスは脳で増殖しており、デングウイルス患者特有の症状(血漿漏出)は観察できなかった。そこでI型、II型インターフェロンレセプターノックアウト(IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ RKO)マウスを作成し、2型キメラデングウイルスの感染を試みたところ、少量のウイルスで致死感染に至った(図2)。一方IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ RKOマウスでも親株のデングウイルスは全く症状を示さず、

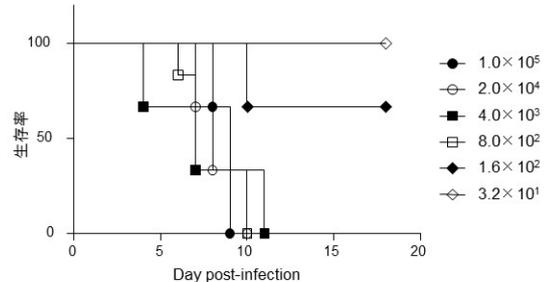


図2. キメラデングウイルス接種IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ RKOマウスの生存率

ウイルスは数日でマウス体内から排除されていた。1型及び2型キメラデングウイルスも同様に致死感染を起こした。

さらに2型デングウイルスを用いてマウス体内でのウイルス増殖標的臓器の特定を試みた。その結果、2型キメラデングウイルスは感染5日後に高いウイルス血漿を示し、ウイルスは全身に広がっていた。特に脾臓、胸腺、骨髄で高いウイルス増殖が観測された。またキメラデングウイルスは単球、マクロファージ、樹状細胞などを主に標的としていた。これらの観察からキメラデングウイルスはIFN- $\alpha/\beta/\gamma$ RKOマウスにおいて、ヒトでのデングウイルス感染と近い感染様式を示すと考えられた。

(3) デングウイルス感染マウスモデルの開発

以上のモデル系を用いて、デングウイルス感染重症者に観察される血漿漏出、血小板減少症、抗体依存性感染増強効果（ADE）を確認した。その結果、病態末期に肝臓において

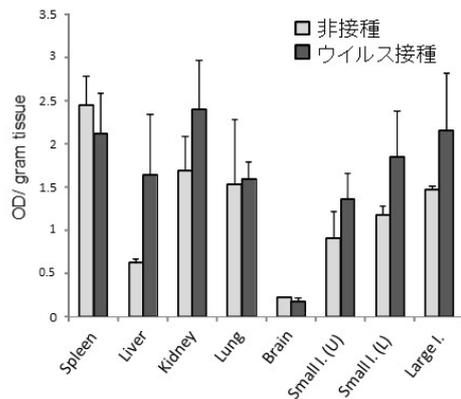


図3. 各種臓器の血漿漏出（エバンスブルー漏出量を定量）

血漿漏出を観察した（図3）。また抗デングウイルスE抗体を適当な濃度で導入した場合に、マウスの生存期間が短縮する現象を確認した（図4）。これはデングウイルス感染重

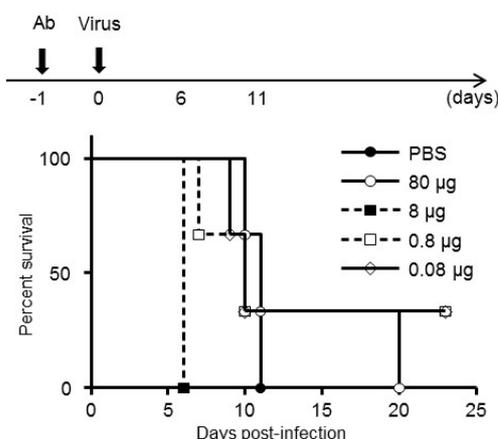


図4. ADE現象による致死性への効果（8μgの抗デングウイルス抗体導入時に短縮した。）

症化患者に観察される抗体依存性増強効果（ADE）であると考えられる。この条件では血漿中のウイルス増殖は約2倍程度であったが、肝臓では約7倍増強効果が認められ、ADEは臓器特異的な現象であることがわかった。またこの系においては血小板減少症が観察できなかったが、骨髄での顕著な病変を観察した。骨髄中では、血小板産生の元になる巨核球が消失しており、血小板現象の前段階が起きていると考えられた。そこで免疫的に一段強い、I

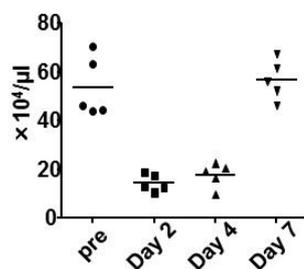


図5. マウス末梢血中の血小板数

型IFNレセプターだけがロックアウトされたマウス（IFN- α / β R-KOマウス）にキメラデ

ングウイルスを感染したところ、感染二日後に血小板減少症が観察された。この系は致死的感染を起こさないため、感染7日目には血小板数は正常レベルまで回復していた（図5）。

まとめると血漿漏出、ADE現象、血小板減少症を観察することに成功した。今後はこれら現象の分子的機序について解明することが重要になる。

（4）モデル系の治療法開発などへの応用可能性についての検討

マウスモデル系の応用性について検討するため、患者由来のヒト型単クローン抗体の防御効果について検討した。培養細胞で中和能を示す抗体は、マウスモデル系でも高い防御能を示し、培養細胞で中和能の低い抗体は低い防御能を示し、培養細胞での観察と一致した。しかし、重要なことに、Fcレセプターに結合しない変異を導入した抗体では、培養細胞での中和能に影響しなかったが、マウスでの防御能が弱まった。この原因は、変異抗体の低い安定性によることがわかった。Fcレセプター結合能を欠いた抗体は、半減期が低くなることが知られており、モデル系を用いた検討でこのことが確認できた。ADEを誘導しない治療用抗体開発にはFcレセプター結合部位を改変し、レセプター結合能のない抗体を開発する必要があると考えられているため、この観察は重要である。これらのことから、開発したマウスモデル系ではこれまで培養細胞だけ用いていただけでは不明であった現象を観察できることが明らかになった。このモデル系は、治療薬開発にも有用であることが証明された。

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 7件)

1. 黒須 剛 デング出血熱重症化マウスモデル 最新医学社 2015 査読無

2. Kurosu T Current Situation of Dengue Study 順天堂社 Juntendo Medical Journal 2015 査読有

3. Phanthanawiboon S, A-nuegoonpipat A, Panngarm N, Limkittikul K, Ikuta K, Anantapreecha S, Kurosu T. Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 cells expressing human DC-SIGN stably. J Virol Methods. 209:55-61. 2014 査読有

DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.08.023.

4. Omokoko MD, Kurosu T. (12名中12番目) A highly conserved region between amino acids 221 and 266 of dengue virus non-structural protein 1 is a major epitope region in infected patients. Am J Trop Med Hyg. 91:146-55. 2014 査読有

DOI: 10.4269/ajtmh.13-0624.

5 . Kurosu T, Chaichana P, Phanthanawiboon S, Khamlert C, (8名中1番目) Jpn J Infect Dis. 67:132-134. 2014 査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/2/67_132/_article

6 . Pambudi S, Kurosu T. (11人中11番目) Biochem Biophys Res Commun. 440:393-398. 2013 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.078.

7 . Masrinoul P, Omokoko MD, Pambudi S, Ikuta K, Kurosu T. Serotype-specific anti-Dengue virus NS1 mouse antibodies cross-react with prM and are potentially involved in virus production. Viral Immunol. 26:250-258.2013 査読有

DOI: 10.1089/vim.2012.0102.

〔学会発表〕(計 6件)

1 . 黒須 剛, 浅井あづさ, 花原景子, Supranee Phanthanawiboon, Surapee Anantapreecha, Kriengsak Limkittikul, 生田和良, 「 Dengueウイルス/日本脳炎ウイルスによる抗体依存性感染増強効果の解析」, 第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10~12日、パシフィコ横浜(横浜)

2 . Ririn Ramadhany, 佐々木正広, 平井到, 小野健一郎, Pongrama Ramasoota, 生田和良, 黒須 剛, 「Different Enhancement of DENV Infection by Human Monoclonal Antibodies IgG Subclass and Its Protection in Mice with Lethal Infection DENV/JEV Chimeric Virus」, 第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10~12日、パシフィコ横浜(横浜)

3 . 黒須 剛, (9名中9番目) Dengueウイルス/日本脳炎ウイルスによる抗体依存性感染増強効果の解析 第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9~12日、北海道札幌市,

4 . 黒須 剛, (9名中9番目) Dengue/日本脳炎キメラウイルスを用いたマウスへの感染性の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10~12日、兵庫県神戸市

5 . 黒須 剛, (9名中9番目) Dengue/日本脳炎キメラウイルスを用いたマウスへの感染性の解析 第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20~22日 岐阜県岐阜市

6 . 黒須 剛 治療法開発のための Dengueウイルス感染マウスモデル第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13~15日大阪府大阪市、(シンポジウム)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://virology.biken.osaka-u.ac.jp/den-gue-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒須 剛 (KUROSU, Takeshi)
大阪大学・微生物病研究所・招へい教員
研究者番号：70432432

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：