

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658257

研究課題名(和文)高感度ウイルス検出細胞の樹立

研究課題名(英文)Establishment of cell lines sensitive for virus isolation

研究代表者

前田 健 (Maeda, Ken)

山口大学・獣医学部・教授

研究者番号：90284273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：1)糖鎖を有するウイルスを分離することを目的として、DC-SIGNとDC-SIGNRの発現細胞の樹立に成功し、これらが日本脳炎ウイルスの感染を促進することを証明した。
2)抗体が存在する際でもウイルスを分離することが可能な細胞の樹立を目的として、FcレセプターであるCD32を発現する細胞の樹立に成功した。この細胞は、抗体の存在下で猫伝染性腹膜炎ウイルスの感染を促進した。
3)更なる培養細胞の樹立を目的として、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にSV40のLarge T抗原を導入し、その不死化に成功した。

研究成果の概要(英文)：1) We succeeded in establishment of cell lines expressing DC-SIGN and DC-SIGNR. These cell lines enhanced infection with Japanese encephalitis virus.
2) We developed cell lines expressing CD32 (Fc receptor) that can bind to antibody. This cell lines enhanced infection with feline infectious peritonitis virus under the antibody to the virus.
3) We succeeded in immortalization of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by transfection with plasmid expressing SV40 Large T antigen..

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：Fcレセプター C型レクチン 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

“One World, One Health”のもと、野生動物由来感染症の重要性が認識されつつある。申請者はこれまで野生動物由来ウイルスのデータベース化を目的として、野生動物由来培養細胞の樹立および未知のウイルス分離を試みてきた。その結果、14種類の動物由来培養細胞(イノシシ、シカ、ニホンノウサギ、アライグマ、タヌキなど)の樹立に成功した。また、野生動物(コウモリ、イノシシ、イルカ)の各種臓器から5種類の新規ウイルスの分離・同定に成功している(Maeda K and Watanabe S *et al.*, 2010; Maeda K *et al.*, 2008)。

これらのウイルスは細胞に細胞変性効果(CPE)を生じたために、その存在が確認されたが、顕著なCPEを起こさないウイルスは見逃されていた可能性が高い。また、申請者らはヒトやイノシシなどの野生動物からE型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス分離を行っているが、HEVは培養細胞にCPEを起こさず、感染細胞を検出する際には抗HEV抗体を用いた免疫染色法やRT-PCRによる遺伝子検出を行う必要があり、操作が煩雑で時間を要する。

2. 研究の目的

申請者らは近年、野生動物から幾つかの新規ウイルスの分離に成功してきた。しかし、これらは感染細胞における細胞変性効果(CPE)を指標にして分離されたものであり、ウイルスの中にはCPEを生じないものも数多く存在する。本申請研究はウイルス感染に迅速に反応し発光する各種動物由来細胞の樹立を目的とし、更なる新規ウイルスの検出・分離および診断系の確立に役立てる。新規ウイルスではないが、野生動物由来かつ典型的な人獣共通感染症を引き起こし、感染細胞にCPEを示さず増殖も遅いE型肝炎ウイルスをモデルとして用いる。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖を有するウイルスを分離するためのC型レクチン発現細胞の樹立

ヒトのレクチンを発現するために組換えレンチウイルスベクターを用いた。このレンチウイルスベクターは既に作成済みである(Shimojima M *et al.*, 2007)。コントロールとしてネコのCD2発現組換えレンチウイルスベクターを用いた(Shimojima M, 2002)。遺伝子組み換えレンチウイルスは各種細胞へ感染後、0.3 µg/mlのピューロマイシンで選択後に、実験に用いた。発現の確認はマウス anti-DC-SIGN(R)(clone120612)(R&D Systems)とヤギ anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)を用いたフローサイトメトリーにより実施した。発現確認後は、日本脳炎ウイルスをモデル

ルに感染性を調査した。

また、DC-SIGNとDC-SIGNRの機能部位を同定するために、キメラ蛋白を発現する組換えレンチウイルスベクターも作製し、それを各種細胞に導入してJEVの感受性を比較した。

(2) 抗体が存在する際でもウイルスを分離することが可能な細胞の樹立

本来は抗体と結合して、抗体が認識している異物を取り込むための抗体のFc領域に対するレセプター(Fcレセプター)の発現を試みた。ネコのCD32(FcRII)遺伝子を発現するために組換えレンチウイルスベクターを用いた。このレンチウイルスベクターは既報に従い作製した(Shimojima M *et al.*, 2007)。このウイルスを各種培養細胞に感染させ、接着細胞は6 µg/ml、浮遊細胞は0.3 µg/mlのピューロマイシンで選択後実験に供試した。FITC標識マウス Anti-Human CD32 (AbD serotec)を反応させフローサイトメーターにより発現を確認した。

(3) ヒトや動物由来の新規培養細胞の樹立

本研究では、海生哺乳類であるオキゴンドウ(*Pseudorca crassidens*)の腎臓細胞と、ゴマフアザラシ(*Phoca largha*)の血管筋肉細胞の初代培養細胞を常法により樹立し、pLNCLT(神奈川がんセンター 安本茂先生より分与)をLipofectamine® 2000 (Life Technologies)をもちいて形質転換した。その後、継代を重ねた。

購入した臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC細胞)(クラボウ)をHuMedia-EG2培地(クラボウ製増殖用低血清培地)で培養し、SV40 Large T抗原を発現するプラスミドpLNCLT(神奈川がんセンター 安本茂先生より分与)をLipofectamine® 2000 (Life Technologies)をもちいて形質転換した。その後、継代を重ねた。

(4) 分離が困難なウイルスの検出

我々は、新規ウイルスの分離を試みてきたが、遺伝子検出はできるものの分離には成功していないウイルスが数多くある。

海外で、2001年から報告されている新興感染症であるフェレットコロナウイルスの検出を国内の動物病院に来院するフェレット(*Mustela putorius*)の糞便を回収し、コロナウイルス共通のコンセンサスプライマーを用いて遺伝子検出を試みた。更に、特異的なプライマーを構築し高感度のRT-PCRを確立した。検出された遺伝子は、塩基配列を解析し、系統樹を作製した。

スunks *Suncus murinus*の糞便からコロナウイルス共通のコンセンサスプライマーを用いてコロナウイルスの検出を行った。

(5) E型肝炎ウイルスの分離のための準備

E型肝炎ウイルスは分離が難しいことが知られている。これまで成功した例では一ヶ月以上培養して初めてウイルス遺伝子が検出されている。我々は、E型肝炎ウイルスの分離を本研究のモデルとしてあげている。そのため、野外におけるE型肝炎ウイルスの陽性例の検出を試みた。イノシシおよびシカより血清を回収し、HEV検出用のプライマー(Yamamoto et al., 2008)を用いてRT-PCRを実施した。得られた遺伝子断片は塩基配列を決定し、系統樹を作成した。

更に、下関の患者から得られた塩基配列をもとに、E型肝炎ウイルスの主要抗原蛋白であるORF2の培養細胞での発現を試みた。ORF2全長(1-660)とORF2の一部(112-660)をコードする遺伝子のN末端領域にHisタグ配列を挿入してpCAGGS(大阪大学宮崎先生より分与)に組み換えて、293T細胞での発現を試みた。発現の確認には抗Hisタグ抗体を用いたウエスタンブロット解析を実施した。

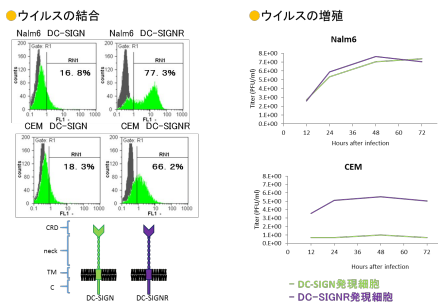
4. 研究成果

(1) 糖鎖を有するウイルスを分離するためのC型レクチン発現細胞の樹立

DC-SIGNとDC-SIGNRは樹状細胞やマクロファージに存在する糖鎖を認識するレクチンで、ある種の糖鎖を保有するウイルスに結合し、レセプターとして機能することが知られている。そこで、我々は、日本脳炎ウイルスをモデルにDC-SIGNとDC-SIGNRのレセプターとしての機能解析を試みた。

まず、日本脳炎ウイルスが感染できないNaIm6細胞(ヒト前駆Bリンパ球由来培養細胞)とCEM細胞(ヒトTリンパ球由来培養細胞)にDC-SIGNとDC-SIGNRをレンチウイルスベクターを用いて導入した。ピューロマイシンでの選択の後、発現を確認した結果、NaIm6細胞、CEM細胞ともにDC-SIGNRは高発現していたが、DC-SIGNの発現はDC-SIGNRに比べて弱かった(図1)。

図1 DC-SIGNあるいはDC-SIGNRを発現する非感受性細胞への日本脳炎ウイルスの結合と増殖

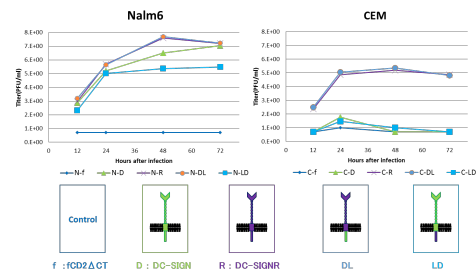


NaIm6細胞とCEM細胞はともに日本脳炎ウイルスに感受性がないので日本脳炎ウイルスをDC-SIGNおよびDC-SIGNR発現細胞に感染を

試みた結果、NaIm6細胞ではDC-SIGNおよびDC-SIGNRが日本脳炎ウイルスの感染を促進することが確認された(図1)。しかし、CEM細胞ではDC-SIGNRのみがレセプターとして機能した(図1)。

次に、DC-SIGNとDC-SIGNRのどの領域が日本脳炎ウイルスのレセプター機能に影響しているのかを調べるために、DC-SIGNとDC-SIGNRのキメラ蛋白を発現させて日本脳炎ウイルスの感染性を比較した(図2)。その結果、CEM細胞で顕著に現れたが、細胞表面に突出している領域が、日本脳炎ウイルスの感染性には重要であることが確認された。

図2 キメラレクチンを発現する細胞への日本脳炎ウイルスの感染性

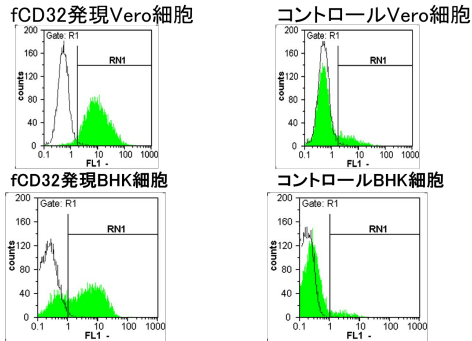


これら一連の細胞は、日本脳炎ウイルスのみならず糖鎖を有するウイルスのレセプターとして機能できる可能性が考えられた。しかし、後述するが、E型肝炎ウイルス、フェレットコロナウイルス、猫コロナウイルス、スルクスコロナウイルスの分離にこれらの細胞を使用してみたが、現在までのところウイルス分離に成功していない。

(2) 抗体が存在する際でもウイルスを分離することが可能な細胞の樹立

ウイルス分離に関して、最も問題となるのが抗体出現である。中和抗体が出現してくるとウイルス分離が出来なくなる。しかし、デングウイルスや猫伝染性腹膜炎ウイルスは抗体がウイルスに結合することにより、逆にFcレセプターを介して感染が増強することが知られている(抗体依存性感染増強: Antibody-dependent enhancement)。我々は、抗体と結合したウイルスを逆にFcレセプターを介して分離できないかを試みるためにFcレセプターとして知られているCD32とCD16の発現細胞を樹立した。ネコのCD32をクローニングして、レンチウイルスベクターに組み換えてアフリカミドリザル由来Vero細胞とハムスター由来BHK細胞に導入した。ヒトCD32に対する抗体で発現の確認が出来た(図3)。ネコ伝染性腹膜炎ウイルスに対するマウスのモノクローナル抗体と反応した猫伝染性腹膜炎ウイルスの感染が増強することを確認した。

図3 CD32発現細胞の作出

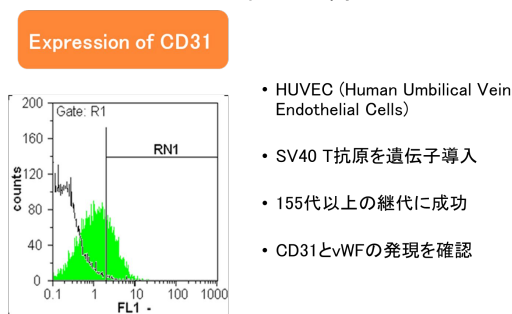


現在、CD16 発現 Vero 細胞および CD32 発現 Vero 細胞で E 型肝炎ウイルス、フェレットコロナウイルス、猫コロナウイルス、スンスココロナウイルスの分離にこれらの細胞を使用してみたが、現在までのところウイルス分離に成功していない。

(3) ヒトや動物由来の新規培養細胞の樹立

ヒトの培養細胞を新たに樹立することを目的としてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に SV40 の Large T 抗原を導入し、その後 155 代以上の継代に成功した。これらに血管内皮細胞のマーカである CD31 とヴォン・ヴィレブランド因子 (vWF) の発現を確認したところ、発現が確認された (図 5)。この結果、この細胞を HUVECT 細胞と命名した。この細胞においては日本脳炎ウイルスの増殖が確認された。

図5 不死化HUVEC細胞の樹立



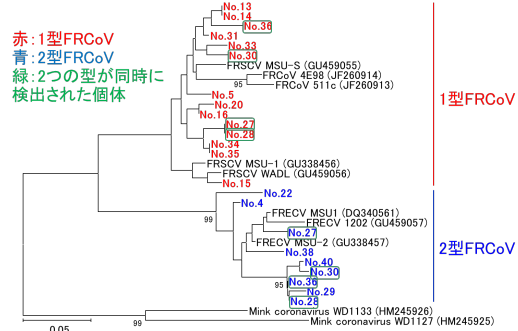
更にはオキゴンドウ (*Pseudorca crassidens*) の腎臓細胞と、ゴマファザラシ (*Phoca largha*) の血管筋肉細胞の不死化にも成功した。オキゴンドウ由来培養細胞にカマイルカ由来ヘルペスウイルス、アザラシ由来培養細胞にネコとイヌのヘルペスウイルスを比較的近縁と思われるウイルスの感染を試みたが、ウイルスの増殖は確認されなかった。

(4) 分離が困難なウイルスの検出

我々は、比較的分離が困難なウイルスを分離するために本申請実験を行っている。そのため、そのウイルスを含む臨床材料を準備している。その一環として、フェレットとスンスから新規コロナウイルス遺伝子の検出に成功した。

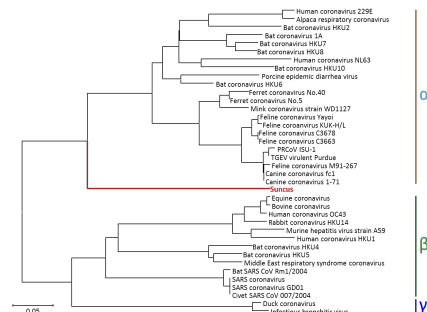
フェレットの臨床検体 79 頭中 44 頭からフェレットコロナウイルスが分離され、これまでに報告されている 2 種類のフェレットコロナウイルスが既に国内に蔓延していることが判明した (図 6)。世界中で誰もこのウイルスの分離に成功していない。これらの糞便材料を用いて、本研究で樹立した様々な培養細胞で分離を試みているが、未だ成功していない。

図6 フェレットコロナウイルスの系統樹



更に、ジャコウネズミ (スンス) を実験動物として飼育している施設より、糞便を回収する機会が得られた。そこで、コロナウイルスの遺伝子の検出を試みた結果、これまでに分類されている、コロナウイルスのすべてに属さないウイルスであることが判明した (図 7)。これを分離すべく本研究で樹立した様々な培養細胞で分離を試みているが、未だ成功していない。

図7 スンスから検出された新規コロナウイルス

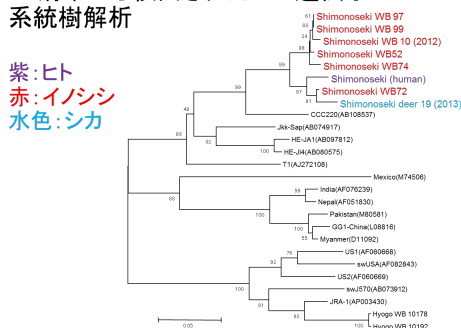


(5) E型肝炎ウイルスの分離のための準備

本申請研究では、分離が困難であるが、一部の細胞を用いて分離に成功している E 型肝炎ウイルスの分離を試みる事となっている。

我々は、山口県のイノシシが非常に高率にウイルスを保有していることを見出した。これまで 6 頭のイノシシ、1 頭のシカ、1 人の患者の血清中から E 型肝炎ウイルスの遺伝子の検出に成功し、山口県の E 型肝炎ウイルスは動物種に関わらず、近縁である事が判明した (図 8)。これらの血清と陽性動物の肝臓から、本研究で樹立した細胞でのウイルス分離を試みているが未だウイルス分離に成功していない。

図8 血清中から検出されたHEV遺伝子の系統樹解析



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9件)

Shimajima M, Takenouchi A, Shimoda H, Kimura N, Maeda K. Distinct usage of three C-type lectins by the Japanese encephalitis virus: DC-SIGN, DC-SIGNR, and LSECtin. *Archives of Virology* (In press) 査読有

Hara Y, Terada Y, Yonemitsu K, Shimoda H, Noguchi K, Suzuki K, Maeda K*. High Prevalence of Hepatitis E Virus in Wild Boar in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 2014;50(2):378-383. 査読有

Terada Y, Minami S, Noguchi K, Mahmoud H.Y.A.H., Shimoda H, Mochizuki M, Une Y, Maeda K*. Genetic characterization of coronaviruses from domestic ferrets in Japan. *Emerging Infectious Diseases* 2014 Feb;20(2):284-287. 査読有

Hara Y, Suzuki J, Noguchi K, Terada Y, Shimoda H, Mizuno T, Maeda K*. Function of feline signaling lymphocyte activation molecule as a receptor of canine distemper virus. *Journal of Veterinary Medical Science* 2013 75(8):1085-1089. 査読有

Noguchi K, Shimoda H, Terada Y, Shimajima M, Kohyama K, Inoshima Y, Maeda K*. Isolation of a novel herpesvirus from a Pacific white-sided dolphin. *Archives of Virology* 2013 158(3): 695-699. 査読有

寺田 豊、前田 健:「フェレットコロナウイルス感染症」*The Japanese Society of Exotic Pet Medicine (JSEPM)* (寄稿) 2013: 15:1-10. 査読無

Terada Y, Shiozaki Y, Shimoda H, Mahmoud HYA, Noguchi K, Nagao Y, Shimajima M, Iwata H, Mizuno T, Okuda M, Morimoto M, Hayashi T, Tanaka Y, Mochizuki M, Maeda

K*. Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5' terminal region of spike gene retains its virulence for cats. *Journal of General Virology* 2012 93: 1930-1934. 査読有
Shirato K†, Maeda K†, Tsuda S†, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2012 Feb;44(1):40-44. († Equally contributed) 査読有

Shimoda H, Nagao Y, Shimojima M, Maeda K: Viral infectious diseases in wild animals in Japan. *Journal of Disaster Research* 2012. 7(3): 289-296. 査読有

[学会発表](計20件)

寺田 豊、南 昌平、下田 宙、野口慧多、Hassan Y.A.H. Mahmoud、鎌田龍星、望月雅美、宇根有美、前田 健「2種類のフェレットコロナウイルスの国内での蔓延とその体内動態」第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(神戸)、2013年11月10日[ポスター]

竹之内悫、下田 宙、下島昌幸、鎌田龍星、前田 健「日本脳炎ウイルスの細胞馴化による感染性の変化」第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸国際会議場(神戸)、2013年11月9日

野口慧多、寺田 豊、Yossef Hassan、鎌田龍星、下田 宙、前田 健「I型猫伝染性腹膜炎ウイルスに対してADE活性を有する単クローナル抗体の作製」第156回日本獣医学会学術集会、岐阜大学(岐阜)、2013年9月21日

寺田 豊、南 昌平、下田 宙、野口慧多、Y.A.H. Mahmoud Hassan、鎌田龍星、望月雅美、宇根有美、前田 健「フェレットコロナウイルス自然感染例の継時的観察」第156回日本獣医学会学術集会、岐阜大学(岐阜)、2013年9月21日

竹之内悫、下田 宙、前田 健、下島昌幸「日本脳炎ウイルス感染におけるDC-SIGNとDC-SIGNRのレセプター機能の比較」第156回日本獣医学会学術集会、岐阜大学(岐阜)、2013年9月20日

大松 勉、酒井宏治、前田 健、片山幸枝、萩原、克郎、下田 宙、鈴木和男、遠藤大二、永田典代、佐々悠木子、長井 誠、古谷哲也、森川 茂、水谷哲也「野生イノシシから分離された新規ラブドウイルスの系統解析」第156回日本獣医学会学術集会、岐阜大学(岐阜)、2013年9月20日

寺田 豊、下田 宙、野口慧多、Hassan YAH Mahmoud、望月雅美、宇根有美、前田 健
「フェレットコロナウイルスの国内における蔓延状況」第 28 回中国四国ウイルス研究会、広島大学(広島)、2013 年 6 月 23 日

竹之内悫、下田 宙、前田 健、下島昌幸
「日本脳炎ウイルス感染における C 型レクチン DC-SIGN と DC-SIGNR の比較」第 28 回中国四国ウイルス研究会、広島大学(広島)、2013 年 6 月 22 日

野口慧多、下田 宙、Hassan Youssef、下島昌幸、香山 薫、猪島康雄、前田 健「海棲動物におけるヘルペスウイルスの解析」第 28 回中国四国ウイルス研究会、広島大学(広島)、2013 年 6 月 22 日

寺田 豊、下田 宙、野口慧多、Hassan Y. A. H. Mahmoud、望月雅美、宇根有美、前田 健「フェレットコロナウイルス検出系の確立」第 155 回日本獣医学会学術集会、東京大学駒場キャンパス(東京)2013 年 3 月 28 日 30 日

野口慧多、原 由香、Hassan Y. A. H. Mahmoud、寺田 豊、下田 宙、水野拓也、前田 健「ネコの SLAM 遺伝子の同定と機能解析」第 155 回日本獣医学会学術集会、東京大学駒場キャンパス(東京)2013 年 3 月 28 日 30 日

野口慧多、下田 宙、寺田 豊、長尾裕美子、下島昌幸、香山 薫、猪島康雄、前田 健「イルカ由来新規ヘルペスウイルスの分離」第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪(大阪)、2012 年 11 月 15 日

寺田 豊、下田 宙、野口慧多、長尾裕美子、Hassan Youssef、望月雅美、水野拓也、下島昌幸、前田 健「スパイク遺伝子 5' 末端領域の欠損を有する猫伝染性腹膜炎ウイルスの野外での証明」第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪(大阪)、2012 年 11 月 14 日

下島昌幸、竹之内悫、下田 宙、木村菜穂、前田 健「日本脳炎ウイルス感染への C 型レクチン 3 分子の異なる関与」第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪(大阪)、2012 年 11 月 13 日

下島昌幸、竹之内悫、下田 宙、木村菜穂、前田 健「日本脳炎ウイルスの感染への C 型レクチン 3 分子の異なる効果」第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学(岩手)2012 年 9 月 15 日

原 由香、寺田 豊、鈴木和男、沖田幸祐、下島昌幸、沖田 極、前田 健「イノシシにおける E 型肝炎ウイルス感染状況の調査」第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学(岩手)2012 年 9 月 15 日

寺田 豊、下田 宙、野口慧多、長尾裕美子、Hassan Youssef、望月雅美、水野拓也、下島昌幸、前田 健「野外におけるスパイク遺伝子 5' 末端領域欠損猫伝染性腹膜炎ウイルスの存在」第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学(岩手)2012 年 9 月 15 日
野口慧多、下田 宙、寺田 豊、長尾裕美子、下島昌幸、香山薫、猪島康雄、前田 健
「カマイルカから分離された新規アルファヘルペスウイルス」第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学(岩手)2012 年 9 月 14 日

下島昌幸、竹之内悫、下田 宙、木村菜穂、前田 健「日本脳炎ウイルスの感染と C 型レクチン 3 分子」第 27 回中国四国ウイルス研究会米子コンベンションセンター(米子)2012 年 6 月 24 日

原 由香、寺田 豊、鈴木和男、沖田幸祐、下島昌幸、沖田 極、前田 健「下関市のイノシシにおける E 型肝炎ウイルス感染状況調査」第 27 回中国四国ウイルス研究会米子コンベンションセンター(米子)2012 年 6 月 24 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 健(MAEDA, Ken)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号: 9 0 2 8 4 2 7 3

(2) 研究分担者

下島 昌幸(SHIMOJIMA, Masayuki)
国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長
研究者番号: 1 0 4 2 2 4 1 1

(3) 連携研究者

下田 宙(SHIMODA, Hiroshi)
山口大学・共同獣医学部・助教
研究者番号: 4 0 7 1 9 8 8 7