

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659210

研究課題名(和文) ヒトと媒介蚊体内におけるデングウイルス準種の網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis on dengue viral quasispecies in human and mosquito body.

## 研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：デングウイルス1型、2型感染患者血漿中のウイルス遺伝子を次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、デングウイルス2型でNS-5タンパク遺伝子の3'末端の終止コドンの配列が変化し、NS-5の3'端に更に27アミノ酸が付加される塩基配列が確認された。また、デングウイルス1型、2型、3型、4型感染患者血清をそれぞれ、蚊の培養細胞(C6/36)及びサルの培養細胞(Vero)に接種して、分離された培養上清中のウイルス遺伝子を次世代シーケンサーで解析したところ、デングウイルス1型のウイルス株でC6/36細胞(蚊)とVero細胞(哺乳類)での細胞向性に関与すると考えられるウイルス遺伝子領域が確認された。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive dengue viral gene analysis was conducted on DENV-1 and -2 infected patient serum samples by using second generation sequencer. Preliminary analysis showed that the 3' terminal codon of NS5 gene was changed and there was an addition of 27 amino acids resulting in the extension at the 3' end of NS5 protein of the DENV-2 virus from some patient samples. DENV-1 to -4 strains were isolated by using C6/36 and Vero cell lines and the entire sequences were analyzed by second generation sequencer. Among the DENV-1 isolates, we confirmed cell-line dependent amino acid sequence which is related in cellular tropism to either mosquito or mammals.

研究分野：ウイルス学

キーワード：デングウイルス ウイルス準種 次世代シーケンサー 細胞向性

## 1. 研究開始当初の背景

デングウイルスが媒介蚊によって人の体内に侵入後、最初の標的細胞となるのは樹状細胞であることが報告されている。しかし、樹状細胞に感染した後、ウイルスがどのように体内を移動し、どのような細胞を増殖の場としているのかはほとんど解析されていなかった。そこで我々はフローサイトメトリーを用いてデング患者の血液細胞の解析、及び、分離ウイルス株の細胞向性について検討を行い、Bリンパ球が患者体内でのデングウイルスの増殖、及び、動態に重要な役割を持つこと、そして細胞向性の異なるウイルス準種が同一患者に感染していることを解明し報告した (Kinoshita H, et al. *Jpn J Infect Dis.* 2009 Sep; 62(5):343-50)。デングウイルスは常時、蚊とヒトの間で交互に維持され、細胞成分、構造、体温、免疫システム等全く環境の異なる宿主の体内において違った選択圧を受けながら短時間の内に行き来している。Askovらは2001年にミャンマーでエンペロプ (E) 蛋白に欠損を持つデングウイルス1型 (DENV-1) の流行があったことを報告している (Science 2006; 311(5758):236-8)。不完全なウイルス集団でさえ準種として長期間ヒトと蚊の間で維持されており、このことはヒトや蚊への適応や、免疫反応からの回避または病原性などにも影響するのではないかと示唆している。これらのことから考えると、蚊の体内で好んで増殖するウイルス集団やヒトの体内で好んで増殖するウイルス集団、人に感染し病態に関連するウイルス集団、または何か特別な意味を持つ不完全なウイルス集団の存在があることが推測された。これまでのデングウイルス研究は培養細胞を用いて分離された選択圧のかかったウイルス株を中心に研究されており、それぞれの宿主内でのデングウイルス準種の全体像は解明されていない。

## 2. 研究の目的

これまでのデングウイルス研究はデング患者または媒介蚊から培養細胞を用いて分離されたウイルス (選択圧のかかったウイルス) を中心に解析・研究されてきた。本研究ではウイルスの細胞向性に直接関与するE蛋白に焦点を絞り、デング患者の血液中に存在する全てのデングウイルス準種のE蛋白遺伝子領域を対象に次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析することにより、これまで確認されていなかったデングウイルス準種のE蛋白遺伝子の全体像を解明する。また、デング患者血液を媒介蚊に吸血させ一定期間飼育後、蚊の体内で選択圧を受け蚊の唾液腺にたどり着いたデングウイルス遺伝子についても同様に網羅的解析を行い、ヒトと媒介蚊体内におけるデングウイルス準種の動態について比較解析を行う。

## 3. 研究の方法

1) 当初の予定では患者血液に存在するデングウイルスのE蛋白遺伝子領域を解析対象と考えていたが、RNAから直接cDNAを合成し、遺伝子増幅を行わないで、ウイルス遺伝子全領域を解析できないか、デング患者 (DENV-1感染患者16名、DENV-2感染患者4名) 血漿中のウイルスRNA量を定量してみた結果、直接解析に十分量のRNAを患者血漿から準備することが困難であることが判明した。そこで、ベトナムで分離されたDENV-1株及びDENV-2株のデングウイルス遺伝子配列を基に、DENV-1と2の全塩基配列をそれぞれ網羅するようにプライマーを設計 (増幅領域500~4000bp) した。DENV-1感染患者血漿16検体、DENV-2感染患者血漿15検体からTotal RNAを抽出し、ランダムプライマーを用いてcDNA合成を行った後、各種プライマーの組み合わせでウイルス遺伝子全領域を増幅し、次世代シーケンサーを用いて各増幅遺伝子領域の定性的、及び、定量的解析を行った。

2) 室内実験で新鮮なデング患者血液を直接媒介蚊に吸血させ感染させることが困難であったため、DENV-1,-2,-3,-4感染患者血清をそれぞれ、C6/36細胞 (蚊由来の培養細胞) 及びVero細胞 (サル由来の培養細胞) に接種して、分離された培養上清中のウイルス遺伝子を、PCR増幅をしないで直接次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

1) DENV-1及び2感染患者血漿からそれぞれのウイルス遺伝子全領域の増幅を試みたが、DENV-1患者血漿ではCore、PreM/M、及びEnvelopeの構造タンパク遺伝子領域 (nt 57 - 2464) とEnvelope遺伝子の後半からNS-1、NS-2A、NS-2B、NS-3の1部非構造タンパク遺伝子の領域 (nt 1936-4456) の2つの遺伝子領域 (PCR産物) が3人の患者検体から増幅され、DENV-2患者血漿からは、Core、PreM/M、及びEnvelopeの構造タンパク遺伝子領域 (nt 83 - 1861) とNS-5の3'末端から非翻訳領域 3' - UTR (nt 8855 - 10349) とNS-4Aの3'末端からNS-5の3'末端、3' - UTR (nt 8855 - 10349) の3つの遺伝子領域が5人の患者検体から増幅され、それぞれのPCR産物をゲノム支援協力機関である宮崎大学フロンティア科学実験総合センターの林哲也教授のご協力を得て、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina Inc.) を用いて網羅的に解析を行った。その結果から、ベトナム中部で2013年に流行したDENV-1及び2流行株のドミナントなウイルス遺伝子配列 (Genotype及びSub-genotype) が確認された。DENV-2の解析結果からNS-5タンパク遺伝子の3'末端の終止コドンの配列が変化し、NS-5の3'末端に更に27アミノ酸が付加される塩基配列が確認された。デングウイルスのNS-5蛋白はRNA依存性RNAポリメラーゼ酵素 (RdRp) 活性を有し、ウイルス遺伝子の転写に重要な

役割をもつ。今回、デング患者血漿中に存在する DENV-2 の NS-5 タンパク遺伝子に確認された変異は NS-5 の蛋白構造、及び、RdRp 活性に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。

2) DENV-1,-2,-3,-4 感染患者血清をそれぞれ C6/36 細胞、及び Vero 細胞に接種して、分離された培養上清中のウイルス遺伝子を次世代シーケンサーで解析したところ、DENV-1 のウイルス株で C6/36 細胞(蚊)と Vero 細胞(サル)で細胞向性に関与すると考えられるウイルス遺伝子領域が確認された。現在、これら分離ウイルス株のクローニングとデングウイルス 1 型感染性クローンをを用いて変異体を作成し検証実験を進めている。

この他、2013 年にベトナム中部で発生した、DENV-4 を主流としたデング熱大流行の分子疫学的解析を行い、論文にまとめ発表した(J Clin Virol 66;May 2015.24-26)。

## 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 6 件)

1. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in northern Vietnam, 1964–2011: genotype replacement. Do LP, Bui TM, Hasebe F, Morita K, Phan TN. Virology Journal (2015) 12:51 DOI10.1186/s12985-015-0278-4. (査読有)
2. A dengue virus serotype 4-dominated outbreak in central Vietnam, 2013. Takamatsu Y, Nabeshima T, Nguyen Thi Thu Thuy, Dang Thi Dinh, Pham Hoai Linh Ly, Pham Thi Hang, Nguyen Thi Nam Lien, Phu Ly Minh Huong, Bui Thu Thuy, Le Thi Quynh Mai, Morita K, Hasebe F. J. Clin Virol 66; May 2015.24-26. (査読有)
3. 蚊媒介性ウイルス感染 - デング熱・日本脳炎・チクングニア熱 - 長谷部太 「科学療法の領域」2015 年 5 月号(2015 年 4 月 25 日発行) 特集「野外活動と感染症」Vol31, No.5, 2015: P57 - 65. (査読無)
4. デング熱、日本脳炎、ウエストナイル熱

長谷部太 臨床と微生物 話題の新興・再興感染症 Vol. 41, No.1, 2014: 309-315. (査読無)

5. An approach for differentiating echovirus 30 and Japanese encephalitis virus infections in acute meningitis/encephalitis: a retrospective study of 103 cases in Vietnam. Takamatsu Y, Uchida L, Phan TN, Okamoto K, Nabeshima T, Dang TT, Do TH, Nguyen TT, Hoang MD, Le XL, Hasebe F, Morita K. Virol J. 2013 Sep 11;10(1):280. Doi: 10.1186/1743\_422X\_10\_280. (査読有)
6. Field trial on a novel control method for the dengue vector, *Aedes aegypti* by the systematic use of Olyset Net and pyriproxyfen in Southern Vietnam. Tsunoda T, Kawada H, Huynh TT, Luu II, Le SH, Tran HN, Vu HT, Le HM, Hasebe F, Tsuzuki A, Takagi M. Parasit Vectors 2013 Jan 11;6:6. Doi: 10.1186/1756-3305-6-6. (査読有)

### 【学会発表】(計 11 件)

1. 長谷部太 「デングウイルスとデング熱」平成 26 年度新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究推進事業シンポジウムプログラム「感染症は一国の問題ではない ~ エボラ出血熱、デング熱を例として ~」平成 27 年 2 月 16 日 ホテル椿山荘東京 ジュピターホール(東京都文京区)
2. Futoshi Hasebe, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Co Thach, Dang Thi Dinh, Pham Thi Hang, Takeshi Nabeshima, Le Thi Quynh Mai, and Kouichi Morita. "Dengue Situation in Vietnam and Quasispecies of Dengue Viruses." The Phase-End Seminar for the "Collaborative Study on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in Vietnam: Enhancement of

- Research Capacity Phase II, 2011-2015” project. 平成 27 年 1 月 12 日 Hanoi Intercontinental Hotel ベトナム
3. Futoshi Hasebe, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Co Thach, Dang Thi Dinh, Pham Thi Hang, Takeshi Nabeshima, Le Thi Quynh Mai, and Kouichi Morita. “Study of Unknown Acute Encephalitis in Vietnam.” The Phase-End Seminar for the “Collaborative Study on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in Vietnam: Enhancement of Research Capacity Phase II, 2011-2015” project. 平成 27 年 1 月 12 日 Hanoi Intercontinental Hotel ベトナム
  4. 長谷部太 デング熱/デング出血熱とは Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever (DF/DHF) 「緊急開催!!デング熱の脅威」 大下財団主催 平成 26 年 11 月 13 日 ANA クラウンプラザホテル 広島【広島市中区中町】
  5. Nguyen Thi Thu Thuy, Takeshi Nabeshima, Guillermo Posadas-Herrera, Dang Thi Dinh, Maria Terrese G. Alonzo, Lady-Anne C. Suarez, Mya Myat Ngwe Tun, Nguyen Le Khanh Hang, Pham Hoai Linh Ly, Le Thi Quynh Mai, Corazon C. Buerano, Filipinas F. Natividad, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita. “Changing Pattern of DENV Serotypes in Vietnam” Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム 2014 平成 26 年 1 月 20-22 日 仙台国際センター 宮城県仙台市
  6. Nguyen Thi Thu Thuy, Dang Anh Tuan, Vu Dinh Luan, Truong Thi Ha, Takeshi Nabeshima, Posadas-Herrera Guillermo, Dang Thi Dinh, Pham Hoai Linh Ly, Nguyen Bao Ngoc, Le Thi Quynh Mai, Vu Thi Que Huong, Kouichi Morita and Futoshi Hasebe. “Molecular epidemiological study on dengue viruses in Vietnam.” NIHE-長崎大学インターナルセミナー 平成 25 年 11 月 28 日 ノボテルハロンベイ ベトナム・クアンニン省ハロン市
  7. Ataru Tsuzuki, Bui Thant Phu, Hitoshi Kawada, Le Trung Nghia, Vu Trong Duoc, Futoshi Hasebe, Tran Vu Phong, and Noboru Minakawa. “Control of Aedes aegypti with key container management and permethrin-impregnated nets in Southern Vietnam: a cluster randomised trial.” NIHE-長崎大学インターナルセミナー 平成 25 年 11 月 28 日 ノボテルハロンベイ ベトナム・クアンニン省ハロン市
  8. 都築中、Bui Phu、Le Nghia、川田均、Vu Duoc、長谷部太、Trang Phong、皆川昇 「ボウフラ主要発生源対策及び殺虫剤浸漬網を使用したベトナム南部におけるネッタイシマカ防除試験」第 54 回日本熱帯医学大会「熱帯医学からグローバルヘルスへ」平成 25 年 10 月 3 - 5 日 長崎県長崎市 長崎ブリックホール
  9. 長谷部太 “Molecular Epidemiology of dengue virus type 4 in Vietnam.” 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム AARF2013 平成 25 年 1 月 23 日 東京医科歯科大学 M&D タワー2 階 鈴木章夫記念講堂 東京都文京区
  10. Futoshi Hasebe “Unusual Dengue Virus 1 Epidemic in Hanoi, 2009.” Symposium for Interrim Evaluation on the “Collaborative Study on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in Vietnam: Enhancement of Research

Capacity Phase II, 2011-2015" Project.  
平成 24 年 8 月 27 日 Hanoi, Vietnam.  
Futoshi Hasebe "Dengue research and diagnostic capacity in Vietnam."  
Informal Consultation to Prepare a Draft Action Plan for the Establishment of an External Quality Assurance (EQA) Programme for the Diagnosis of Dengue Virus and other Emerging Infectious Diseases. WHO 東京会議 平成 24 年 6 月 19 日 国立感染症研究所 東京都新宿区

11. 長谷部太 「ベトナムで起こったデングウイルス 1 型大流行に関する調査研究」  
"Dengue primary infections observed among dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in Myanmar." 我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究班 (H23-新興-一般-010) 平成 24 年 6 月 8 日 国立感染症研究所 東京都新宿区

#### 〔図書〕(計 1 件)

1. 西條政幸、高田礼人、長谷部太、澤邊京子 「感染症は一国の問題ではない。～エボラ出血熱、デング熱を例として～」  
17 ページ (9 - 10、15 - 17) 2015 年 2 月 16 日 公益社団法人国際校正事業団 初版発行 監修

#### 〔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：  
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

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者：  
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

(2)研究分担者  
無し ( )

研究者番号：

- (3)連携研究者：  
1 . 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  
2 . 鍋島 武 (NABESHIMA, Takeshi)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号： 30546859