

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660225

研究課題名(和文) マウス遺伝子改変技術を活用した狂犬病の病態発症に重要なウイルス因子の同定

研究課題名(英文) Identification of the important viral factor related to the development of rabies by the gene manipulation in mice

研究代表者

杉山 誠 (Sugiyama, Makoto)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80196774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、狂犬病の病態に關与する狂犬病ウイルス蛋白質を同定するため、ウイルス蛋白質を神経細胞特異的に発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作出し、同マウスに狂犬病様の症状を再現することを目指した。同時に、遺伝子欠損型狂犬病ウイルスの併用による詳細な検討を試みた。L蛋白質発現Tgマウスの作製には失敗したものの、G蛋白質発現Tgマウスの作製に必要なプラスミドを得ることができた。また、LおよびG遺伝子欠損ウイルスの作出にも成功し、その有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：To identify rabies virus protein that is responsible for the pathogenesis, we tried to establish transgenic (Tg) mice expressing each viral protein exclusively in neurons and then to reproduce rabies-like symptoms in the mice. In addition, we aimed to further examine this point by a combination use of the mice and the gene-deficient rabies viruses. Although we failed to generate L protein-expressing Tg mice, we established a plasmid required for G protein-expressing mice. Further, we have successfully generated L and G gene-deficient viruses before confirming their utilities.

研究分野：獣医学

キーワード：狂犬病ウイルス 病態発生機序 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は、重篤な神経症状を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。発症後の致死率がほぼ 100%であると同時に、有効な治療法が確立されていないことから、現在も最も恐ろしい感染症のひとつと言える。ワクチンが十分に普及していない発展途上国を中心として、毎年 5 万 9000 人が本病の犠牲となっている。

狂犬病の原因である狂犬病ウイルスは、モノネガウイルス目ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される。そのゲノムは約 12,000 塩基のマイナス鎖 1 本鎖 RNA である。狂犬病ウイルスは、人を含む哺乳動物の神経系に感染し、活発に増殖することで、致死的な神経症状を引き起こす。一般的に、狂犬病患者の脳では、著しい神経症状とは対照的に、肉眼および組織学的に顕著な神経細胞死は確認できない。また、炎症細胞の浸潤も極めて限定的である。以上の知見より、狂犬病の病態には、神経組織の器質的変化ではなく、神経細胞の機能的変化が深く関与していると考えられている。

狂犬病ウイルスが感染した神経細胞では、ウイルス増殖の過程で、5 種類のウイルス蛋白質 (N、P、M、G および L 蛋白質) が産生される。狂犬病ウイルスによる神経細胞の機能障害には、感染細胞内で産生されるウイルス因子が関与すると考えられるものの、上記のウイルス蛋白質のいずれが病態形成に関与するかについては不明のままである。さらに、神経細胞におけるウイルス複製が病態形成に関与するか否かについても解明されていない。このような基礎的情報の欠落は、狂犬病の治療法を確立する上で、大きな障害となっている。

2. 研究の目的

本研究では、狂犬病の治療法の確立を最終目標として、本病の病態形成に関与するウイルス蛋白質を特定することを目的とする。

【研究戦略の概要】

上記の目的を達成するため、神経細胞特異的に狂犬病ウイルスの各蛋白質を誘導発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、その発現誘導によりマウスが狂犬病様の症状を発症するか否かを検討する (実験 1)。さらに、あるウイルス遺伝子を欠損した狂犬病ウイルスを遺伝子操作により作出し、当該ウイルス遺伝子産物 (蛋白質) を発現誘導した Tg マウスに脳内接種することで、狂犬病が発現されるかどうか検証する。Tg マウスが致死的な狂犬病を発症したことを確認した後、当該蛋白質の発現を停止することで、発症マウスが回復するか否かを検証する (実験 2)。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞導入用プラスミドの構築

狂犬病ウイルス蛋白質の調節発現系を確立するため、テトラサイクリン (Tet) 発現誘導システム (Tet-off システム) を活用した。まず、TRE プロモーターの支配下で狂犬病ウイルス西ヶ原株の L 蛋白質あるいは G 蛋白質を発現するプラスミドを構築した (ここではプラスミド A とする)。なお、L 蛋白質発現プラスミドには、同蛋白質の発現をモニターするため、口蹄疫ウイルスの自己開裂ペプチド 2A および赤色蛍光蛋白質である mCherry を組換え L 蛋白質の C 末端側に融合した。

神経細胞特異的プロモーターであるシナプシン・プロモーターの下流で転写活性化因子 tTA を発現するプラスミドも構築した (プラスミド B)。なお、Tet が tTA に結合した場合、TRE プロモーターは活性化されず、目的の蛋白質は発現されない。反対に、Tet が非存在の場合は、tTA が TRE プロモーターに結合し、蛋白質の発現が誘導される。

さらに、プラスミド A および B をマウス ES 細胞の ROSA26 遺伝子座に特異的に挿入するためのプラスミドも調整した。部位特異的組換え反応 (LR 反応) により上記 3 種類のプラスミドを 1 種類のプラスミド (プラスミド A+B+C) に統合し、ES 細胞導入用のプラスミドとした。

(2) 特定の遺伝子を欠損した狂犬病ウイルスの作出

強毒の狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株の遺伝子操作系 (Yamada et al., Microbiol. Immunol. 2006) を用いて、L 遺伝子あるいは G 遺伝子を欠損し、かつ GFP を発現するウイルス株を樹立した (それぞれ Nishi-ΔL/GFP 株および Nishi-ΔG/GFP 株と命名)。同様に、同様に、GFP の代わりにホタルルシフェラーゼを発現する Nishi-ΔL/Luc 株および Nishi-ΔG/Luc 株も作出した。L 蛋白質あるいは G 蛋白質を発現するプラスミド (バックボーン: pCAGGS/MCS) を導入した細胞に、これらの株を接種することで各ウイルスを増殖させ、保存液を調整した。得られた保存液については、使用するまで -80°C にて保管した。

(3) 狂犬病ウイルス G 蛋白質を調節発現する培養神経細胞系の樹立

G 蛋白質調節発現 Tg マウスの *in vitro* モデルを確立するため、狂犬病ウイルスに対して高感受性を示すマウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞を用いて、G 蛋白質調節発現細胞を樹立した。その作製には、Retro-X Tet-Off Advanced Inducible Expression System (Clontech) を用いた。得られた G 蛋白質発現細胞を NA-TetOff-NiG 細胞と命名した。

(4) G 蛋白質の発現停止が NA-TetOff-NiG 細胞における Nishi-ΔG/GFP 株の増殖性に及ぼす影響の検討

Tet 誘導体である Doxycycline (Dox) を含

まない培地で培養することでG蛋白質の発現を誘導した NA-TetOff-NiG 細胞に、Nishi-ΔG/GFP 株を感染多重度 0.01 で接種した。接種後1日目の培養上清を回収した後に、Dox を含まない培地を加え培養を続けた。その後、接種後2日目に 0.1μg/ml の Dox を含む培地に置き換えることでG蛋白質の発現を停止した。その後、毎日、Dox 含有培地に置換しながら、接種後7日目まで培養を続けた。接種後1日目および7日目の培養上清に含まれるウイルス感染価を、G蛋白質発現 NA-TetOff-NiG 細胞を用いたフォーカス・アッセイにより決定した。

4. 研究成果

(1) L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出

実験 2 に使用するためのウイルスとして、L 遺伝子欠損ウイルス Nishi-ΔL/GFP 株を作出することに成功した。L 蛋白質を発現しない NA 細胞（空ベクター導入細胞）に Nishi-ΔL/GFP 株を接種した場合、GFP のシグナルは確認できなかったのに対し、L 蛋白質を発現する細胞（L 蛋白質発現プラスミド導入細胞）では、明瞭な GFP シグナルが確認された（図 1）。なお、L 蛋白質発現細胞の培養上清には、 3.3×10^6 FFU/ml の感染性ウイルスが含まれていた。同様に、GFP の代わりにルシフェラーゼを発現する Nishi-ΔL/Luc 株についても作出することができた。

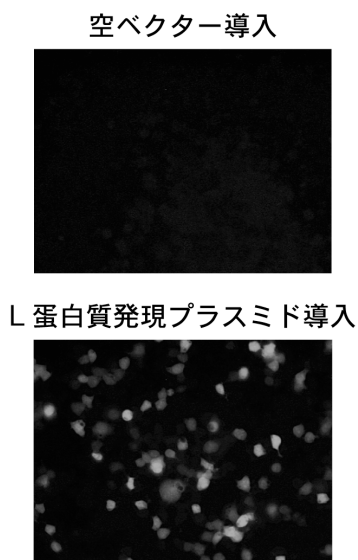


図 1. L 蛋白質供給 / 非供給条件における Nishi-ΔL/GFP 株の増殖 (NA 細胞)

(2) L 蛋白質調節発現 Tg マウスの作出のための ES 細胞導入用プラスミドの構築と機能性確認

実験 1 および 2 に使用する L 蛋白質調節発現 Tg マウスを作出するためのプラスミドを構築した。L 蛋白質を発現するプラスミド A

と、tTA を発現するプラスミド B を NA 細胞に共導入した NA 細胞では、Dox 不含の培地で培養した場合、L 蛋白質の発現の指標となる mCherry のシグナルを持つ多数の細胞が確認された（図 2）。一方、Dox 含有培地で培養した同細胞では、mCherry 陽性細胞の数が著しく低下した。以上より、Dox 除去による発現誘導が確認されたと同時に、プラスミド A および B の機能性が確認された。

そこで、LR 反応によりプラスミド A、B および C の結合を行い、プラスミド A+B+C を得た。しかし、プラスミド A+B+C を導入した NA 細胞では、Dox 除去による発現誘導の有無にかかわらず、mCherry 陽性細胞の数は変化せず、いずれもごく少数のままであった（図 2）。また、同細胞に Nishi-ΔL/Luc 株を接種した場合でも、発現誘導の有無にかかわらず、同株の増殖の指標となるルシフェラーゼの価はほぼ同等であった（データ非掲載）。以上より、LR 反応に結合された L 蛋白質発現プラスミド A+B+C は、何らかの原因により機能性を失っていることが明らかとなった。

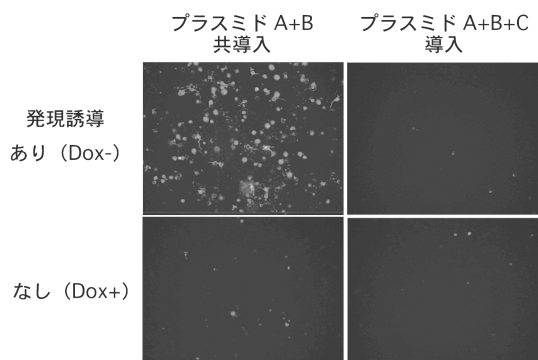


図 2. ES 細胞導入用プラスミドからの L 蛋白質の発現の確認 (NA 細胞)

(3) G 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出

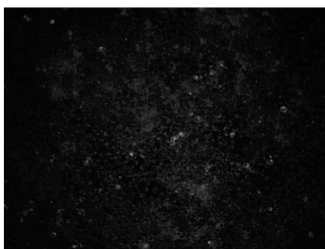
上記のような技術的な問題により、当面の標的を L 蛋白質から G 蛋白質に切り替えた。そこで、実験 2 に使用する G 遺伝子欠損ウイルス Nishi-ΔG/GFP 株の作出を試み、同株を得ることに成功した。本株の感染細胞では明瞭な GFP シグナルが確認された（データ非掲載）。

(4) G 蛋白質調節発現 Tg マウスの作出のための ES 細胞導入用プラスミドの構築と機能性確認

次に、ES 細胞導入用の G 蛋白質発現プラスミド A+B+C の構築を行なった。プラスミド A+B+C 細胞を導入した NA 細胞における G 蛋白質の発現をウェスタンブロット法により確認した。その結果、G 蛋白質と同じ分子量を示す特異的なバンドが確認された（データ非掲載）。さらに、培養液への Dox の添加により、G 蛋白質の発現が抑制されることも確認された。G 蛋白質に対する単クローン抗体を

用いた間接蛍光抗体法によってもプラスミド導入細胞における G 蛋白質の調節発現が確認された (図 3)。

発現誘導なし (Dox+)



発現誘導あり (Dox-)

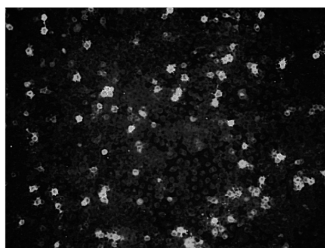


図 3. ES 細胞導入用プラスミドからの G 蛋白質の発現の確認 (NA 細胞)

(5) G 蛋白質の発現停止が NA-TetOff-NiG 細胞における Nishi-ΔG/GFP 株の増殖性に及ぼす影響の検討

Tet-off システムを活用し、G 蛋白質を調節発現する NA-TetOff-NiG 細胞を樹立した。同細胞に Nishi-ΔG/GFP 株を接種した後、1 日目に採取された培養上清中のウイルス感染価は、約 10^4 FFU/ml であった (図 4)。接種 2 日目以降に Dox の除去により G 蛋白質の発現を停止させた場合、接種 7 日目の培養上清中のウイルス感染価は、 1.8×10^2 FFU/ml まで低下した。一方、G 蛋白質の発現停止を行わなかった場合、培養上清中のウイルス感染価は上昇を続け、接種後 7 日目には 4.6×10^6 FFU/ml に達した。以上より、G 蛋白質の発現停止により、Nishi-ΔG/GFP 株の増殖性が著しく低下することが確認された。

(6) 考察と今後の課題

当初は、各狂犬病ウイルス蛋白質を神経細胞特異的に発現した場合、Tg マウスが狂犬病様の症状を発症するか否かを検討すること (実験 1) が研究計画の主体であった。しかし、人工的な発現系では、感染細胞で産生されるレベルのウイルス蛋白質の発現量が得られないという懸念が生じた。そこで、この問題を解決するため、当該蛋白質をコードするウイルス遺伝子を欠損した狂犬病ウイルスを Tg マウスに接種する方法 (実験 2) を併用することとした。

本研究では、最初に、ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとしてウイルス増殖に必

須な役割を担う L 蛋白質を標的とした。L 蛋白質は、ゲノム RNA の複製だけではなく、各 mRNA の合成・修飾にも重要な役割を果たす多機能性蛋白質であり、その重要性から有力な狂犬病の治療標的となることが予想される。しかし、今回、L 蛋白質を調節発現する Tg マウスの作製に必要なプラスミド A+B+C を作出することができなかった (図 2)。その理由は明らかではないが、非常に大きなサイズの L 遺伝子 (約 6400 塩基) が、今回使用した ES 細胞導入用プラスミドに許容されなかった可能性が考えられた。

本研究では、狂犬病ウイルスの遺伝子操作により、L 遺伝子欠損ウイルスを世界で初めて確立することに成功した。これらのウイルス (Nishi-ΔL/GFP 株および Nishi-ΔL/Luc 株) は、いまだに不明な点が多い L 蛋白質の分子機能解析に応用できるだけでなく、ウイルスの初期転写メカニズムを解明するための強力なツールとなる。今回、技術的な問題により、L 遺伝子欠損ウイルスを当初の目的 (実験 2) のために活用することはできなかったものの、今後は、様々な角度からの L 蛋白質の機能解析に利用していく予定である。

上記のような状況を鑑み、研究の対象を L 蛋白質から G 蛋白質に切り替えることとした。G 蛋白質は、受容体結合蛋白質として知られており、ウイルスの細胞への接着・侵入、さらには子孫ウイルス粒子の形成にも必須の役割を担っている。一方で、G 蛋白質は、感染細胞内のゲノム複製および mRNA 転写には関与しない。このような G 蛋白質の機能と狂犬病の病態の関連性を明らかにすることを新たな目標とした。

そこで、G 蛋白質を神経細胞特異的に調節発現する Tg マウスの作出を行うこととした。G 蛋白質については、L 蛋白質の場合とは異なり (図 2)、ES 細胞導入用のプラスミド A+B+C が完成し、Dox 除去による発現誘導も確認されている (図 3)。現在、本プラスミドを用いて、G 蛋白質調節発現 Tg マウスの作出を始めており、まもなく完成する予定である。

実験 2 を実施するため、G 遺伝子欠損ウイルス Nishi-ΔG/GFP 株を作出することに成功した。さらに、実験 2 の *in vitro* モデルを確立するため、Tet-off システムにより G 蛋白質を調節発現する NA-TetOff-NiG 細胞を樹立した。G 蛋白質を発現する同細胞に Nishi-ΔG/GFP 株を接種した後、G 蛋白質の発現を停止した場合、ウイルス増殖が顕著に抑制された (図 4)。この成績により、G 蛋白質を調節発現する Tg マウスに Nishi-ΔG/GFP 株を接種した場合でも、G 蛋白質の発現を停止することでウイルス増殖の抑制が可能であることが強く示唆された。今後は、当初の計画に基づき、狂犬病の病態における G 蛋白質の重要性を検証していく予定である。

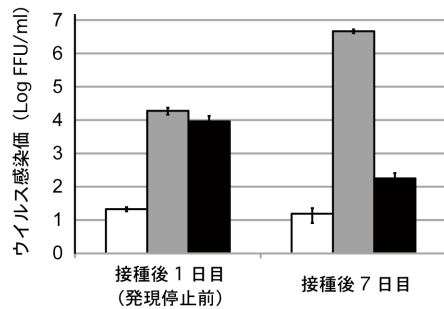


図4. G蛋白質の発現停止がNA-TetOff-NiG細胞におけるNishi-ΔG/GFP株の増殖に及ぼす影響

接種後2日目以降、Doxの除去によりG蛋白質の発現を停止した。

- NA細胞 (G蛋白質の発現なし)
- NA-TetOff-NiG細胞 (G蛋白質の発現停止なし)
- NA-TetOff-NiG細胞 (G蛋白質の発現停止あり)

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2件)

- ① Tatsunori Masatani, Makoto Ozawa, Kentaro Yamada, Naoto Ito, Horie, M., Aya Matuu, Kosuke Okuya, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Makoto Sugiyama, and Akira Nishizono: Contribution of the interaction between the rabies virus P protein and I-kappa B kinase e to the inhibition of type I IFN induction signalling. J. Gen. Virol. 97: 316-326, 2016.
- ② 伊藤直人、杉山誠: 狂犬病の現状とその制圧に向けた課題. 生体の科学 66: 305-308, 2015 (査読なし)

[学会発表] (計7件)

- ① 中川賢人、伊藤直人、岡田和真、岡寺康太、三竹博道、杉山誠、L蛋白質機能および初期転写機構の解析に有用となるL遺伝子欠損型狂犬病ウイルスの樹立、5th Negative Strand Virus-Japan Symposium in Okinawa、2016年1月25-27日(沖縄県恩納村)
- ② Kazuma Okada, Naoto Ito, Kento Nakagawa, Kota Okadera, Hiromichi Mitake, Makoto Sugiyama: P protein isoforms have roles in rabies virus neuroinvasiveness. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月22-24日(福岡県福岡市)
- ③ Hana Okada, Naoto Ito, Makoto Nagai, Kota Okadera, Hiromichi Mitake, Kazuma Okada, Kento Nakagawa, Tetsuya Mizutani,

Makoto Sugiyama: Genetic and phenotypic changes of highly attenuated rabies virus strain Ni-CE after adaptation to Vero cells. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月22-24日(福岡県福岡市)

- ④ 中川賢人、伊藤直人、岡田和真、岡寺康太、三竹博道、杉山誠: L蛋白質機能解析において有用となるL遺伝子欠損型狂犬病ウイルスの樹立、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月(青森県十和田市)
- ⑤ 中川賢人、伊藤直人、岡田和真、岡寺康太、三竹博道、杉山誠、L遺伝子欠損型狂犬病ウイルスの樹立および性状解析、第14回狂犬病研究会、2015年4月3日、国立感染症研究所戸山庁舎(東京都新宿区)
- ⑥ Kento Nakagawa, Naoto Ito, Kazuma Okada, Kota Okadera, Hiromichi Mitake, Makoto Sugiyama, Generation and characterization of L gene-deficient rabies virus, 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, 2015年1月25日~29日, Academia Sinica (台湾・台北市)
- ⑦ 中川賢人、中川敬介、伊藤直人、山岡理子、岡田和真、岡寺康太、杉山誠、神経系培養細胞を用いた組換え狂犬病ウイルスの作出、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20日~2013年9月22日、岐阜大学(岐阜県岐阜市)

[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:
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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 誠 (Sugiyama, Makoto)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号： 80196774

(2) 研究分担者

伊藤 直人 (ITO, Naoto)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号： 20334922

大沢 匡毅 (Osawa, Masatake)
岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号： 10344029

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：