

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850132

研究課題名(和文) サケ科魚癌ウイルスによる発癌・肝炎の病態解明

研究課題名(英文) Studies of oncogenesis and viral pathogenesis of Oncorhynchus masou virus (OMV; Salmonid herpesvirus 2) in salmonid fish

研究代表者

笠井 久会 (Kasai, Hisae)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50399995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：サケ科魚類に感染して基底細胞癌と肝炎を引き起こすOncorhynchus masou virus (OMV; Salmonid herpesvirus 2)を対象に、宿主への腫瘍誘発機構を解明することを目的に包括的高感度遺伝子発現解析を展開するとともに、OMV感染による病態生理学的解析を行った。腫瘍組織におけるウイルス遺伝子の局在解析の結果、ウイルスが組織の広範囲に分布することを認め、腫瘍組織で発現亢進が認められる腫瘍関連遺伝子を見出した。加えて、OMV感染に起因する肝炎が血清化学成分値に影響を与えると同時に、腎機能障害および鰓機能障害も起きることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Oncorhynchus masou virus (OMV; Salmonid herpesvirus 2) is a member of Herpesviridae associated with oncogenic and hepatitic diseases of national and international socio-economic importance. The present study focused on oncogenesis and viral pathogenesis of OMV in salmonid fish. Viral genes were localized in the whole Tumor tissues of masu salmon *Oncorhynchus masou* that survived OMV infections. A strong ISH signal was detected in the tumor tissue indicating that OMV induces tumor development. Highly expressed viral genes in Tumor were found by transcriptome analysis using NGS-based RNA sequencing. Liver failure as well as renal dysfunction and failure of gill function were occurred in OMV-infected rainbow trout *O. mykiss*.

研究分野：魚病学

キーワード：OMV 魚類ウイルス ヘルペスウイルス 腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

OMV (*Oncorhynchus masou virus*) は1978年に北海道のサケマス孵化場で成熟したサクラマス雌親魚の卵巣腔液から分離したアロヘルペスウイルス科に属するウイルスである。稚魚に肝炎を起こすほか、感染耐過魚に基底細胞癌を誘発する、魚類で初めて見つかった癌ウイルスである。腫瘍原性 (oncogenic) と宿主の種名を取って *Oncorhynchus masou virus* と命名された。分類学的には、*Alloherpesvirus*科 *salmoherpessvirus*属に属し、分布は国内のみに留まることから、国際獣疫事務局 (OIE) の OMV 病レファレンスラボの一員として、本ウイルスが世界流行しないよう国内で制圧に努めている。OMV は宿主のサクラマスを始めヒメマス、サケ、ギンザケ、ニジマスに病原性を示し、特にヒメマス、サケ、サクラマスには強い病原性を示す。腫瘍原性も実験的に確かめられている (Fish Pathol. 15:149, 1981; Fish Pathol. 22:7, 1987)。サクラマスから OMV が分離された当初、OMV のサクラマス、シロサケ、ギンザケおよびニジマスに対する病原性は仔魚期のみであったが、1988年にギンザケから分離された OMV はギンザケ成魚にも病原性を示し、産業被害が問題となった。1993年には大型のニジマスを殺すようになり、2000年以降、本州各地の大型ブランドニジマスの生産に大きな脅威となっている。ニジマス株は強毒であるが、腫瘍原性は認められていない。このように分離株によって病原性に大きな違いが見られるものの、これら分離株は血清学的に均一であり区別されない。申請者らはニジマスに対し高い病原性を有する株を選抜し、これに病原性・腫瘍原性の異なる2株を加えて OMV の全ゲノム配列決定とゲノム解析を行った。その結果、アポトーシス抑制遺伝子である *Bcl-2* と高い相同性を有する遺伝子を見出した。哺乳類のヘルペスウイルスではウイルスゲノム中の癌遺伝子が細胞のアポトーシスの誘導を抑制し、細胞の癌化を促進することから、OMV の腫瘍原性にこの遺伝子が関与している可能性が高い。ところで、ヒト癌ウイルスである Epstein-Barr ウイルス (EBV) は上咽頭癌やリンパ腫などに関与し、癌細胞において EBV が潜伏感染状態を維持すること、発現しているウイルス遺伝子の機能が発癌に関与していることが明らかにされている (ウイルス, 56: 201, 2006)。OMV 感染により生じた腫瘍に対しては、病理組織の観察がなされているものの、ウイルス遺伝子の発現動態解析は進んでいない。腫瘍組織における OMV の潜伏感染を示唆する報告 (Fish Pathol. 22:7, 1987) があることから、腫瘍組織で発現するウイルス遺伝子を検出することで、癌遺伝子の候補を絞り込むことが出来る。一方、OMV 感染症は、肝臓に壊死が見られ、体表に潰瘍が形成される場合と、感染耐化後、顎を主に頭部、尾部、腎臓などに腫瘍が生じる場

合がある。ギンザケでは両者が、ニジマスでは前者、サクラマスでは後者が多い。高い死亡率は肝炎によってもたらされ、OMV は癌ウイルスであるとともに肝炎ウイルスという側面を有する。病理組織検査により、組織の形態的变化が観察されているものの、肝臓の正常な機能が異常をきたすことにより魚がどのような影響を受け、死の転帰を辿るかについては明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

(1) 腫瘍原性への関与が疑われる遺伝子は、アポトーシスの制御に関わると推察されるが、宿主に自然に備わる制御機構との関わりを明らかにする必要がある。他の遺伝子が関与する可能性もあるが、腫瘍組織で発現するウイルス遺伝子を検出することで、癌遺伝子の候補を絞り込むことが出来る。OMV の発癌誘起機構解明に向け、病魚の患部における網羅的な遺伝子発現動態解析を行う。

(2) OMV 感染魚の生理状態および死亡魚の病理について肝臓に重点を置いて解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 腫瘍が確認されたサクラマス *Oncorhynchus masou* 親魚 14 尾の腫瘍組織、脳、視神経、鰓、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、背びれ、精巣あるいは卵巣、消化管を対象にウイルス分離及び遺伝子の検出を行った。正常組織および腫瘍組織に対して、上述の包括的遺伝子発現解析を実施した。加えて、OMV に感染し腫瘍を発現したサクラマス親魚より腫瘍組織および脳組織を摘出し、ブアン固定後、定法に従ってパラフィン切片を作製してヘマトキシリン・エオシン染色による病理組織学的観察を行った。また、OMV の DNA ポリメラーゼ遺伝子を対象に DIG 標識 DNA プロンプを作成して *in situ* hybridization によりウイルス特異遺伝子の局在を観察した。脳に対しては、whole-mount *in situ* hybridization (WISH) により脳全体におけるウイルス特異遺伝子の局在を観察した。ニジマス *Oncorhynchus mykiss* 60 尾に対し、OMV 標準株 (007812 株) ならびにニジマス由来株 (RtNa0010 株) を用いて 100 TCID<sub>50</sub>/mL、60 分の浸漬攻撃を行い、死亡数を観察するとともに腫瘍が発現するまで飼育を継続した。正常組織および腫瘍組織に対して、次世代シーケンサによる包括的遺伝子発現解析のための RNA-seq データを取得した。

(2) OMV 感染によるニジマスの肝機能障害が、血清化学成分値にどのような影響を与えるのかについて明らかにすることを目的とし、病魚の血清化学成分値の変動について検証を行った。また、採血した病魚の肝臓、腎臓、脾臓、脳を摘出し、測定した成分値が臓器の状態を反映しているかどうかについても検証を行った。感染区と対照区を2区ずつ用意

し、それぞれ 15 尾ずつニジマスを収容して 1 週間の子備飼育を行ったのち、ニジマス分離株である OMV RtNa-0010 株のウイルス培養液 100  $\mu$ L (4.8 log TCID<sub>50</sub>) を腹腔内接種した。飼育は 50 日間行い、異常遊泳が観察された個体は直ちに引き上げ、水槽内で死亡する前に採血し、その後速やかに血清化学成分値の測定を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 腫瘍が確認されたサクラマス親魚 14 尾の各臓器を対象に RTG-2 細胞によるウイルス分離培養および PCR によるウイルス遺伝子検出を行った結果、14 尾のいずれかの臓器からも OMV が分離された。最も分離率の高い臓器は腫瘍 (79%) であり、次いで脳 (43%) であった。その他の臓器からの分離率は低かった。PCR では全ての臓器から OMV 特異遺伝子が検出されたが、陽性率は臓器毎に差が認められた。腫瘍が 100 %と最も高い値を示し、次いで視神経 (71%) や脳 (50%) で高い陽性率を示した。体表も 14 尾中 7 尾で陽性を示し、部位別では頭部と尾柄部が共に高い値を示した。病理観察においては、腫瘍組織では細胞の塊状増殖像が広範囲にわたって観察された。歯の混在の他に、ウイルス感染などの原因により細胞同士の支えが消失し、組織の一部が崩壊する棘融解も確認された。さらに ISH では、腫瘍組織においてウイルス特異遺伝子は広範囲に検出され、特に腫瘍外縁部に強い陽性シグナルが認められた (Fig. 1)。

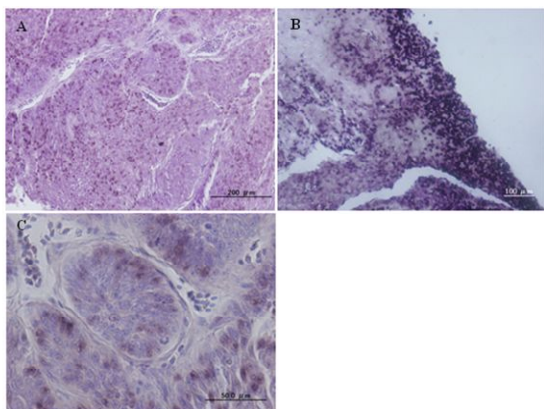


Fig. 1. 腫瘍組織におけるウイルス遺伝子の局在。

脳では、組織の特定の部位に陽性シグナルが認められた。ヘルペスは脳の三叉神経に潜伏しているとの報告があることから、脳におけるウイルス特異遺伝子の三次元的な局在性を、終脳、視蓋、視床下部、脳下垂体、小脳、延髄、脊髄を含む脳組織全体に対して、WISH を用いて調べたところ、終脳と小脳に強い陽性シグナルが認められた。魚類の場合、三叉神経節は中脳と小脳の間位置している。今回の結果から、OMV は、魚類以外を宿主とする他のヘルペスウイルスと同様に、三叉神経に潜伏する可能性が高いことが示された。本研究において、ISH には DNA プローブを用い

たが、一般的に RNA プローブの方が感度が高いとされる (Komminoth, 1992)。ヒトの場合、潜伏感染に関連する遺伝子として、Epstein-barr virus (EBV) の LMP (Latent membrane protein) (Kulwichit *et al.*, 1998) や *Human herpesvirus 8* の LANA (Latency-associated nuclear antigen) (Katano *et al.*, 2000) が報告されているが、魚類においては未だ報告されていない。今後、OMV においても上記のような潜伏感染に関与する遺伝子の探索を行い、それらの遺伝子をターゲットとした RNA プローブを作成し、同様の ISH および WISH を実施する必要がある。

2 個体の腫瘍を有するサクラマス親魚より、腫瘍と正常組織を摘出し、包括的遺伝子発現解析のための RNA-seq データを取得後、OMV 007812 株の全ゲノム配列をリファレンス配列として bowtie2 (ver 2.2.4) を用いてマッピングした。その結果、OMV ウイルスゲノム上の 99 個の ORF のうち、ORF-1, 2, 71, 75, 78, 79, 86 および 87 の発現が確認された。遺伝子長による生じるバイアスを補正し比較した結果、最も高く発現している ORF は ORF-1 および 2 であり、続いて ORF-86, 87 および 75 が腫瘍組織で高発現することを明らかにした。ORF-71 は protein kinase の機能が予測され、ORF-86 には BIR domain と相同性の高い配列が見出されたが、他の ORF は機能不明であった。一般に protein kinase は腫瘍細胞の増殖、移動、浸潤やアポトーシスの調整に関与することから、OMV の腫瘍関連遺伝子の候補のひとつであると考えられる。今後はウイルス側因子が宿主細胞の癌化を促進する分子機構を解析することが重要である。

ニジマスを用いた感染試験では、OMV 007812 株および RtNa0010 株による死亡率はそれぞれ 7.8% および 100% であった (Ikemoto *et al.*, 2016)。007812 株を感染させた区では、感染試験開始後 361 日後に腫瘍を形成した個体が観察され、さらに 8 か月後には 27% の個体に腫瘍が認められた。腫瘍組織を対象にした包括的高感度遺伝子発現解析を実施するための RNA-seq データを取得したが、腫瘍が解析必要量まで増大するのに時間を要したため、解析が間に合わず、サクラマス親魚の腫瘍におけるデータとの比較解析は今後の課題となった。

(2) 1 回目の試験において、感染区と対照区間で有意差が認められた項目は、カルシウム、HDL コレステロール、尿素窒素、リパーゼ、CPK、総コレステロールの 6 項目であり、2 回目の試験において有意差が認められた項目は、GPT、総蛋白、トリグリセリド、アルブミン、マグネシウム、尿素窒素、GOT、HDL コレステロール、アルカリホスファターゼ、総コレステロールの 10 項目であった。2 回の試験の対照区を比較すると、グルコース、クレアチニン、マグネシウム、無機リン酸の 4 項目において、その差が有意であった。病理観

察においては、肝臓では広範囲にわたる肝細胞の壊死が確認され、所々に核濃縮を始めとした核変性や病巣の融解が確認された。腎臓も同様に核変性および細胞質の崩壊が確認された。脾臓では顕著な壊死は見られなかったものの、一部の個体において壊死病巣があり、空胞化を起こしていた。

臓器の病変と血清化学成分値の変動については、肝機能障害の指標として用いられている GOT と GPT は、2 回目の試験では有意に上昇し、1 回目の試験においても、有意差こそ認められなかったものの、感染区において上昇傾向が見られた。肝臓で合成されている HDL コレステロールや総コレステロールは両試験において有意に減少し、トリグリセリドも 2 回目の試験では有意に減少し、1 回目の試験では有意差は認められなかったが、減少傾向を示した。これらは医学における肝炎の症状と一致する。さらにリパーゼは 1 回目の試験では有意に上昇し、2 回目の試験では上昇傾向を示した。これは腎機能の低下に伴う排出不良であると推測される。一方、アルカリホスファターゼは医学における肝炎の症状とは一致せず、両試験において低値を示した。また、カルシウムやマグネシウムは、医学においてはいずれも腎機能の障害によって血中量が増減するが、魚類においては鰓から排出される。これにより、OMV 感染では腎機能障害に加えて鰓機能障害も起きていると推測される。

以上のことから、病原体への感染や発病が魚類の血清化学成分値に与える影響について、病理組織学的な視点と合わせて検証することに成功した。医学と同様に血清化学成分値から一定の基準を元に症状を判断し、魚体の状態を正確に知ることが出来れば、誰でもその場で対策を講じることが可能となる。本研究ではその類の分析の先駆けとして、ニジマスの肝炎による症状を、血清化学成分値を用いて数値化することができた。しかしながら、基準値の選定には至っておらず、今後は疾病の進行度合いを考慮し、経過を追った研究が必要である。加えて、健全な個体から採血を行い基準値の選定を行う必要がある。

## 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 1 件)

Ikemoto, K., M. Yoshimizu, M. Furihata, M. Kohara and H. Kasai (2016) Pathogenicity of a rainbow trout isolate RtNa-0010 of *Oncorhynchus masou* virus (Salmonid herpesvirus 2) in salmonid and cyprinid fish. *Fish Pathology*, **51**: in press.

〔学会発表〕(計 5 件)

池本恵祐・勝又義友・吉水 守・笠井久会: *Oncorhynchus masou* virus (OMV) の感染耐過サクラマス親魚の腫瘍および脳組織における局在. 平成 28 年度日本魚病学会春季大会, 日本獣医生命科学大学(東京都, 武蔵野市), 平成 28 年 3 月 12-13 日.

笠井久会: 魚類ウイルス病とその防除対策. 平成 27 年度日本ウイルス学会北海道支部夏季シンポジウム, 大滝セミナーハウス(北海道, 伊達市), 平成 27 年 7 月 25-26 日.

池本恵祐・勝又義友・笠井久会: *Oncorhynchus masou* virus (OMV) の感染部位. 平成 27 年度日本魚病学会春季大会, 東京海洋大学(東京都, 港区), 平成 27 年 3 月 7-8 日.

池本恵祐・笠井久会・吉水 守・降幡 充・小原昌和: *Oncorhynchus masou* virus (OMV) のサケ科魚類に対する病原性. 平成 27 年度日本魚病学会春季大会, 東京海洋大学(東京都, 港区), 平成 27 年 3 月 7-8 日.

笠井久会・吉水 守: サケ科魚ヘルペスウイルス *Oncorhynchus masou* virus (OMV) の全ゲノム解析. 第 7 回サケ学研究会, 北海道大学(北海道, 札幌市), 平成 25 年 12 月 22 日.

〔図書〕(計 2 件)

Yoshimizu, M., H. Kasai, Y. Sakoda, N. Sano and M. Sano (2016) Oncogenic Viruses - *Oncorhynchus masou* Virus and Cyprinid Herpesvirus. 『Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection』, in press, ed. by P.T.K. Woo and D.W. Bruno, CABI International, Oxford, England.

笠井久会 他 (2013) (分担) 消毒剤と養殖・孵化場の消毒法. 『魚介類の微生物感染症の治療と予防』, 504 (276-283), 青木 宙編, 恒星社厚生閣, 東京.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 久会 (KASAI, Hisae)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号: 50399995