

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292147

研究課題名(和文) 野生水禽や家禽におけるマレック病ウイルスの病原性進化の分子機序の解明

研究課題名(英文) Studies on the molecular mechanisms for the increase in MDV virulence in the field

研究代表者

大橋 和彦 (Kazuhiko, Ohashi)

北海道大学・(連合) 獣医学研究科・教授

研究者番号：90250498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：鶏に悪性リンパ腫を主徴とするマレック病(MD)を引き起こすマレック病ウイルス(MDV)の野外における病原性進化の分子機序を解明するために、国内でワクチン接種したにも関わらずMDが発生するワクチンブレイク鶏からMDVを単離して、その分子生物学的性状及びウイルス学的性状を解析した。その結果、分離したMDVは、病原性に重要なウイルス遺伝子に新規の多型が同定され、鶏に病原性を示したが、全ゲノムの系統樹解析の結果、米国等で従来報告されていたものとは異なる分子機序で病原性進化している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Marek's disease virus (MDV), a causative agent of Marek's disease (MD), which is characterized by the formation of malignant lymphomas, tends to increase its virulence in the fields. To clarify the molecular mechanism for the increase in MDV virulence, recent MDV strains isolated from vaccinated chickens which developed clinical MD were virologically and molecular biologically characterized. Several new diversities/mutations were detected in viral genes of these strains, and a plaque-purified MDV strain was shown to be pathogenic to chicks. However, phylogenetic analysis of the whole genome of the MDV strain and reference strains showed that domestic MDV may increase its virulence through unknown mechanisms which are different from those suggested previously in MDV strains isolated in the United States.

研究分野：獣医学

キーワード：マレック病 マレック病ウイルス

1. 研究開始当初の背景

マレック病ウイルス (MDV) は鶏に悪性リンパ腫を引き起こし、養鶏業界に甚大な被害をもたらしてきたが、ワクチンにより、現在ではほぼ抑制されている。しかし MDV の病態形成機構・ワクチンの防御機構は解明されていない。また近年、世界各地でワクチン接種鶏でもワクチンブレイクが発生し、野外における MDV の強毒化が報告されている。さらに平成 13 年度、マガン 1 羽に、世界初のマレック病発症による死亡例が報告され、申請者らが実施した MDV 疫学調査 (平成 15~17 年度、基盤研究 (B)・13556045) の結果、多くの野生水禽 (ガン・カモ類) が高率に MDV に感染していることが判明した。このように野外における MDV の強毒化により、今後現行のワクチンが効力を失う可能性があり、MDV の病原性進化の分子基盤を明らかにして新規防除法を樹立することが急務となっている。

野生水禽での強毒 MDV 汚染やワクチンブレイクを引き起こす MDV の強毒化の原因は現在のところ不明であるが、可能性として MDV がコードする抗原・遺伝子の変異、ワクチンによる強毒 MDV の選択、あるいは野鳥などによる新規の強毒 MDV の導入などが考えられる。中でも、MDV の発癌遺伝子産物として同定された Meq (*meq* 遺伝子産物) は、転写因子として、細胞増殖、抗アポトーシスや免疫抑制に重要な宿主因子の発現を制御することで MDV の腫瘍化に寄与していると考えられており、近年の MDV 病原性進化にも関与している可能性がある。申請者らは、これまで MDV 病原性進化に伴う MDV ゲノムの変化として、日本国内でワクチンブレイク鶏から分離した強毒 MDV では *meq* 遺伝子に多型が存在することや *gB* や *gL* 遺伝子などに従来報告されていない変異が存在することを同定した。さらに *meq* 遺伝子の多型が、Meq 蛋白の転写活性化能や形質転換能に大きな変化をもたらすことを発見した。このことは、*meq* 遺伝子の多型 (変異・欠損) による Meq 蛋白の機能変化が MDV の病原性進化に関与していることを示唆している。しかし *gB* や *gL* 遺伝子の変異については、未だ MDV の病原性進化との関係は不明である。さらに近年国内でワクチンブレイク鶏から検出された MDV では、*meq* 遺伝子にこれまで報告されていない新規の構造変化が観察され、野外では現在も MDV の病原性進化が多様な機序で起こっていることが示唆されている。

以上より、ワクチンブレイク鶏や野生水禽から分離された強毒 MDV 株の病原性進化に伴う MDV ゲノムの変化を同定し、それらの変化による病原性への影響を検討することは、今後 MDV の病原性進化に対抗する新規防除法を開発するためにも重要であると考えられ、その詳細な解析が待たれている。また MDV の病原性進化に伴う宿主側標的因子や病原性発現の分子機構は全く判明しておらず、これについても解明する必要がある、マレック病の

ワクチンブレイクに対応できる新規制御法の確立への応用が待たれている。

2. 研究の目的

本研究では、日本国内でワクチンブレイク鶏等から分離される強毒 MDV 株の性状解析をするとともに全ゲノム解析を行い、その病原性進化に伴う構造変化・変異領域を同定する。さらに鶏を用いた感染実験等により、ワクチンブレイクの分子機序を明らかにする。そして MDV の病原性進化に対応できる新規防除法開発への応用を試みる。

3. 研究の方法

国内の養鶏場等において、MD ワクチンを接種しているにも関わらず MD が発生する、いわゆるワクチンブレイク鶏より血液や腫瘍材料等を採取し、常法に従ってゲノム試料を調製して、PCR 法 (一部は Nested PCR 法) により、MDV の腫瘍化に重要と考えられる *meq* 遺伝子の検出及び検出された *meq* 遺伝子の塩基配列を決定して多型解析を行った。さらに従来欧米等で報告されていない多型に関しては、それらの Meq (*meq* 遺伝子産物) の機能への影響を確認するため、レポーターアッセイや軟寒天内コロナー形成試験により、転写活性化能や形質転換能を解析した。

次に国内に分布する MDV の病原性などウイルス学的性状を解析するために、ワクチンブレイク鶏から MD ワクチンを除去して MDV を単離する方法の樹立を試み、確立した方法で MDV の分離を行った。分離されたウイルスについては、鶏を用いた感染実験により病原性を米国の強毒株と比較した。また単離したウイルス株の全ゲノム解析 (Illumina HiSeq を使用) を行い、従来報告されている強毒株等との比較を行った。

MDV の病原性進化には、ウイルス側因子のみならず、宿主因子との相互作用の変化も重要な役割を担うと思われる。そこで近年、種々の腫瘍や難治性慢性感染症において、免疫回避に重要と思われる免疫抑制因子 PD-1/PD-L 経路の病態形成に関わる役割を検討した。ワクチンブレイク鶏由来腫瘍材料を採取して、組織標本作製後、レーザーマイクロダイセクション法により、腫瘍部 (対照として非腫瘍部) を採取してゲノム材料を調製し、RT-PCR 法により PD-1 等の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 国内のワクチンブレイク鶏由来 MDV の *meq* 遺伝子の多型解析及び Meq (*meq* 遺伝子産物) の機能解析

2010 年~2014 年に国内で発生したワクチンブレイクにおいて、MD 発症鶏から材料を採取して、ゲノム材料を調製して PCR 法により *meq* 遺伝子の検出を行った結果、調査した全ての検体で *meq* 遺伝子が検出された。そこで検出された *meq* 遺伝子全長の塩基配列を決定

し、米国で報告されているワクチンブレイク鶏由来強毒株と比較した(表1)。その結果、Meq(*meq* 遺伝子産物)の機能に重要と考えられる塩基性ドメインや転写活性化ドメインに多くの多型が検出された。その中には従来報告されていない多型も多く含まれていた。そこで次に、これらの多型を含む Meq の転写活性化能や形質転換能を解析したが、予想に反して、今回新規に同定した多型を含む Meq は、米国の強毒株由来 Meq や 1980 年代に国内で分離された MDV 株由来 Meq に比較して、転写活性化能及び形質転換能が有意に低かった(表1)。以上より、国内で発生しているワクチンブレイクでは、従来とは異なり、*meq* 遺伝子の多型以外の要因が関与している可能性が示唆された。

表1. 日本に分布するMDV株のMeq(*meq*遺伝子産物)の特徴

国名	病原性	年	株名	塩基性ドメイン		転写活性化ドメイン				* 活性
				77	80	153	176	193	217	
日本	ワクチンブレイク	2014	Kgs-c1, Myz-c, Me-c3等	E	Y	P	S	P	A	2+
	ワクチンブレイク	2010	Isk-c1, Nr-c1等	E	Y	P	S	P	A	2+
		~	Me-c1等	E	Y	P	L	P	A	2+
		2003	Nig-c1, Tkc-1	K	D	P	P	P	A	3+
	?	1980	md239, md242	E	Y	P	P	S	A	2+
米国	4+/3+	-	595, 648aなど	K	D	Q	A	P	A	3+
	3+/2+	-	RB1B, GA	K	D	P	P	P	P	3+
	2+	-	571, 573	E	Y	P	P	P	P	2+
	2+	-	BC-1, JM	A	D	P	P	P	P	2+
	+/-	-	CV1988, CU-2	E	D	P	P	P	P	1+

* 活性: 転写活性化能・形質転換能

(2) ワクチンブレイク鶏由来 MDV 株の単離法の樹立

国内養鶏場では、MD 予防のため MD ワクチンが使用されている。そのため、ワクチンブレイク鶏から、常法により強毒 MDV を分離するとワクチン株の混入が避けられず、またワクチン株は、組織培養において強毒 MDV よりも容易に増殖するため、強毒 MDV の単離及びその後のウイルス学的解析が困難である。そこで、ワクチン株を除去して強毒 MDV のみを単離する方法を確立した。組織培養での分離や鶏を用いた継代などを組み合わせた種々の方法を検討した。その結果、ワクチンブレイク鶏由来腫瘍病変を初生ヒナに接種し、生体内でのウイルス増殖後に感染ヒナより腎臓を採取して初代腎臓細胞培養によりウイルス分離を行い、得られたブレイクを単離することで強毒 MDV のみを分離することに成功した。この方法により、ワクチン接種鶏からもワクチン混入のない強毒 MDV の分離が可能となった。

(3) ワクチンブレイク鶏由来 MDV 株の病原性および全ゲノム解析

上記(2)で樹立した方法を用いて、ワクチンブレイク鶏からの強毒 MDV を行った。近年、国内で最も優勢に分離される MDV 株(*meq* 遺伝子の多型解析から)として Kgs-c1 株を分離した。そして分離した株を用いて、鶏を用いた感染実験を行い、その病原性を解析した。その結果、分離した Kgs-c1 株は、鶏に対して強い病原性を示した(1ヶ月程度で感

染鶏は MD を発症して死亡)。しかし、対照として用いた米国由来強毒 MDV 株である 648 株に比べると、その病原性は低いものであった(死亡までに要する平均日数等の解析により判定)。

そこで次に分離した Kgs-c1 株の全ゲノム解析を行った。Kgs-c1 株では、米国由来強毒 MDV 株に比べて、従来は報告されていない *meq* 遺伝子の多型が検出され、さらにウイルスのテグメントタンパク質である UL36 の variable region におけるリピート配列のコピー数に違いがあることが判明した。しかしながら、この変化が MDV の病原性進化に与える影響は不明であり、今後の解析が必要である。また全ゲノムを用いた系統樹解析を行った結果、国内分離株である Kgs-c1 株は、米国由来強毒 MDV 株とは異なり、中国やヨーロッパで分離される強毒 MDV 株とクラスターを形成することが示された(図1)。以上より、国内における MDV の病原性進化は、米国で報告されているものとは異なり、これまで報告されていない新規の分子機構が寄与している可能性が示唆された。その原因は、現時点では不明であるが、現在使用されているワクチンが異なることや、鶏の遺伝的背景の違いなどが関与している可能性があり、今後より詳細な解析が必要であると思われる(平成 29 年度より解析予定)。

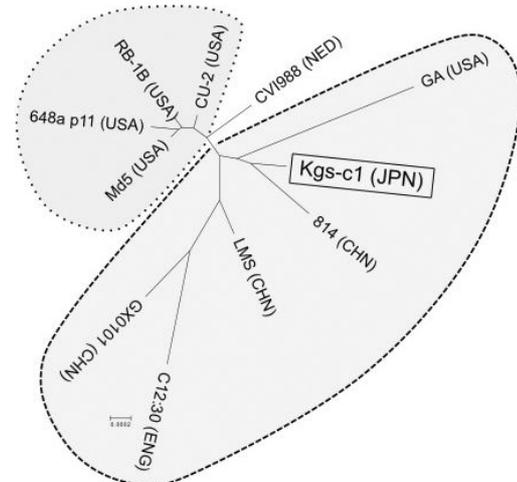


図1. 全ゲノム配列を用いたMDV株の系統樹解析

(4) マレック病腫瘍における免疫抑制因子の発現の解析

種々の腫瘍や難治性慢性感染症において、免疫抑制因子 PD-1/PD-L 経路が免疫回避に重要と思われ、病態形成に関わると考えられている。そこで、ワクチンブレイク鶏由来腫瘍において、PD-1 やそのリガンドである PD-L の発現を RT-PCR 法で解析した。その結果、腫瘍病変からレーザーマイクロダイセクション法により精製した腫瘍で PD-L2 の発現上昇が観察され、MD の病態形成において、免疫抑制因子 PD-1/PD-L 経路が関与していることが示唆された。しかしながら、今回の研究で

は、MDV の病原性進化と PD-1/PD-L 経路の関係については解明することができず、今後、より検体数を増やして詳細な解析をすることが必要であると思われる。

以上のように、本研究では、国内におけるワクチンブレイク鶏由来強毒 MDV 株の解析を行い、従来報告されていない分子機構がワクチンブレイクの発生に関与している可能性が示された。今後、国内におけるワクチンブレイクの制御に向けた新規防除法の開発が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Machida, A., Murata, S., Matsuyama-Kato, A., Isezaki, M., Taneno, A., Sakai, E., Konnai, S., Ohashi, K. 2017. Isolation and purification of *Gallid herpesvirus 2* strains currently distributed in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 115-122. 査読有, DOI:10.1292/jvms.16-0329.

Ohira, K., Nakahara, A., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Maekawa, N., Ikebuchi, R., Kohara, J., Murata, S., Ohashi, K. 2016. Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF- β secretion from regulatory T cells. *Immun. Inflamm. Dis.* 4: 52-63. 査読有, DOI:10.1002/iid3.93.

Maekawa, N., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Kato, Y., Murata, S., Ohashi, K. 2016. Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. *PLoS One.* 11: e0157176. 査読有, DOI:10.1371/journal.pone.0157176.

Mekata, H., Murata, S., Mingala, C. N., Ohashi, K., Konnai, S. 2015. Expression of regulatory dendritic cell-related cytokines in cattle experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *J. Vet. Med. Sci.* 77: 1017-1019. 査読有, DOI:10.1292/jvms.15-0066.

Suzuki, S., Konnai, S., Okagawa, T., Ikebuchi, R., Nishimori, A., Kohara, J., Mingala, C. N., Murata, S., Ohashi, K. 2015. Increased expression of the regulatory T cell-associated marker CTLA-4 in bovine leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 163: 115-124. 査読有, DOI:10.1016/j.vetimm.2014.10.006.

Okagawa, T., Konnai, S., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Mizorogi, S., Nagata, R., Kawaji, S., Tanaka, S., Kagawa, Y.,

Murata, S., Mori, Y., Ohashi, K. 2015. Bovine immunoinhibitory receptors contribute to the suppression of *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis-specific T-cell responses. *Infect. Immun.* 84: 77-89. 査読有, DOI:10.1128/IAI.01014-15.

Ikebuchi, R., Konnai, S., Okagawa, T., Yokoyama, K., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S., Ohashi, K. 2014. Influence of PD-L1 cross-linking on cell death in PD-L1-expressing cell lines and bovine lymphocytes. *Immunology.* 142: 551-561. 査読有, DOI:10.1111/imm.12243.

Matsuyama-Kato, A., Murata, S., Isezaki, M., Takasaki, S., Kano, R., Konnai, S., Ohashi, K. 2014. Expression analysis of programmed death ligand 2 in tumors caused by the avian oncovirus Marek's disease virus. *Arch. Virol.* 159: 2123-2126 査読有, DOI:10.1007/s00705-014-2021-7.

Maekawa N., Konnai, S., Murata, S., Ohashi, K. 2014. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS One.* 9: e98415. 査読有, DOI:10.1371/journal.pone.0098415.

Ikebuchi, R., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Nakahara, A., Murata, S., Ohashi, K. 2014. Differences in cellular function and viral protein expression between IgM^{high} and IgM^{low} B cells in bovine leukemia virus-infected cattle. *J. Gen. Virol.* 95: 1832-1842. 査読有, DOI:10.1099/vir.0.065011-0.

Nishimori, A., Konnai, S., Okagawa, T., Nakahara, A., Murata, S., Ohashi, K. 2014. Identification and characterization of bovine programmed death-ligand 2. *Microbiol. Immunol.* 58: 388-397. 査読有, DOI:10.1111/1348-0421.12160.

[学会発表](計 7 件)

村田史郎、町田柚香、伊勢崎政美、今内 覚、大橋和彦。マレック病ウイルス日本分離株の全ゲノム解析。第 159 回 日本獣医学会学術集会 日本大学(藤沢) 2016 年 9 月 8 日

Murata S., Machida, Y., Isezaki, M., Konnai, S., Ohashi, K. Sequence analysis of a Marek's disease virus strain isolated in Japan. 11th International Symposium on Marek's Disease and Avian Herpesviruses, Tours, France. July 6, 2016.

Ohashi, K., Murata, S., Matsuyama-Kato, A., Okada, T., Hashiguchi, M., Isezaki,

M., Konnai, S. Analysis of the diversities observed in the Meq protein of Marek ' s disease virus (MDV) and immunosuppression during MDV infection. New Paradigm of Molecular Diagnostics and Therapeutics. Wonju, Korea. November 6, 2015.

北條巧、谷口綾香、村田史郎、伊勢崎政美、酒井英史、矢吹卓也、寺田晴菜、種子野章、今内覚、大橋和彦・ワクモ

(*Dermanyssus gallinae*) 由来カテプシンL様タンパク質の性状解析とワクチン抗原としての評価. 第 158 回 日本獣医学会学会学術集会 北里大学(十和田) 2015 年 9 月 9 日

町田柚香、村田史郎、伊勢崎政美、酒井英史、種子野章、今内覚、大橋和彦. 日本に分布するマレック病ウイルス野外株の分離. 第 158 回 日本獣医学会学術集会 北里大学(十和田) 2015 年 9 月 9 日

村田史郎、山本英次、坂下奈津美、松山あゆ美、伊勢崎政美、町田柚香、今内覚、大橋和彦. マレック病ウイルス meq 遺伝子に認められた欠損配列. 第 158 回 日本獣医学会学術集会 北里大学(十和田) 2015 年 9 月 9 日

大橋和彦. ウイルス性発癌: 鶏マレック病研究の最新知見. 第 157 回 日本獣医学会学術集会 北海道大学(札幌) 2014 年 9 月 10 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大橋 和彦 (OHASHI, Kazuhiko)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号: 9 0 2 5 0 4 9 8

(2)研究分担者

今内 覚 (KONNAI, Satoru)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号: 4 0 3 9 6 3 0 4

村田 史郎 (MURATA, Shiro)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号: 1 0 5 7 9 1 6 3