

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292149

研究課題名(和文) コウモリ由来新型レオウイルスの高度病原性獲得機序に関する研究

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for the acquisition of virulence by bat-borne reoviruses

研究代表者

小林 剛 (Kobayashi, Takeshi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：90324847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに重篤な呼吸器疾患を引き起こすコウモリ由来レオウイルス(NBV)の病原性獲得機序を理解するため、以下の研究を行った。
新規NBV遺伝子操作系により、NBV S1遺伝子産物であるFAST、p17およびC各種欠損ウイルスを作製し、解析を行った。その結果、FAST、p17およびCはウイルス複製に必須でないことが明らかとなった。FASTがウイルス複製の増強因子であること、CがA549細胞への感染に重要な役割を担っていることを明らかにした。
NBVのマウス病態モデルを開発した。マウスモデルを用いた解析から、FASTおよびCが病原性因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nelson Bay orthoreoviruses (NBVs) were recently isolated from humans with acute respiratory tract infections, suggesting that NBVs have evolved to propagate in humans. To better understand NBV replication and pathogenesis, we have developed a mouse model of NBV infection that mimics the disease in humans. Furthermore, using reverse genetics, we demonstrated that FAST, p17, and C proteins encoded by S1 gene segment were not required for viral replication. Our results with mutant viruses demonstrated that fusion activity of FAST was critical for the enhancement of viral replication and that C was dispensable for cell attachment in several cell lines, including L929 cells but not in A549 cells. Significant attenuation was observed in mice infected with FAST- and C-deficient viruses compared to those infected with the wild-type, suggesting that FAST and C play crucial roles in viral pathogenesis, and can provide new insights into the NBV biology.

研究分野：ウイルス学

キーワード：レオウイルス コウモリ

1. 研究開始当初の背景

近年、宿主域を変異適応することで新たにヒトに対して高病原性を引き起こす新興の人獣共通ウイルス感染症が大きな問題となっている。1970年にコウモリから分離されたネルソンベイオルソレオウイルス(NBV)は、レオウイルス科、オルソレオウイルス属に属し、10本の分節化した2本鎖RNAをゲノムとして有する。これまで、NBVは、ヒトに対して病原性はないと考えられていたが、2007年、東南アジア マレーシアで重篤な呼吸器疾患を呈した患者から、NBVと同一性が高い新型の高病原性レオウイルス感染(NBV Melaka株)が報告された。NBV Melaka株の感染患者は、発症前にコウモリとの接触経歴があり、コウモリからの水平感染と考えられている。さらに、発生地域における大規模な疫学調査結果から、有意な抗体保有率が示されたことで、流行・常在化が懸念されている。他のアジア諸国においても、同様の感染者が相次いで報告されており、日本国内においては、申請者のグループが、東南アジアから帰国後、呼吸器症状を伴うインフルエンザ様症状を呈した患者から、新型レオウイルス(Miyazaki株)の分離を行った。アジア諸国におけるNBVの感染報告状況から、新興ウイルス感染症として早急な対策が望まれているが、現状では、予防・治療法の開発は遅れており、NBVの複製機構、病態発現機序についてもまったく解明がなされていない状況である。

2. 研究の目的

コウモリを起源とするNBVがどのような機序でヒトに対して高病原性を獲得したのかは明らかにされていない。コウモリ体内で多様なNBVが存在し、一部のクローンのみがヒトで病原性を示すに至ったのか、あるいはコウモリ由来NBVがヒトに感染後、強毒変異することで病原性を示すに至ったのかは不明である。NBVの感染伝播様式については、ヒトからヒトへ伝播・感染することが示唆されているが、伝播力は低いと考えられている。しかし、現段階でNBVがヒトへの感染・病原性を獲得したことを考慮すると、今後さらに変異を繰り返すことで容易にヒト-ヒト間感染が可能なより強毒化したNBVの出現

が懸念される。

本研究課題では、NBVのヒトにおける高度病原性獲得機序についての解明を目指す。申請者が開発に成功した高病原性を示すヒト由来NBV Miyazaki株におけるリバーシジェネティクス(RG)系を駆使することで、病態発現に関わるウイルス側因子の同定・機能解析を行う。

NBVに近縁な哺乳類レオウイルスを用いた研究から、病態発現に関わるウイルス側因子として、S1遺伝子の重要性が示唆されている。NBV S1遺伝子はその領域内に3つのタンパク質をコードしている。Fusion Associated Small Transmembrane (FAST)は非構造タンパク質で細胞融合活性を持つことから、NBV感染細胞でのシンシチウムの形成に重要な働きを担っている。非構造タンパク質p17は、核に局在するタンパク質であるが複製における機能は不明である。 σ Cはウイルス粒子表面に存在する構造タンパク質であり、細胞への吸着・侵入に重要な役割を担っていると考えられている。しかし、これらのタンパク質のウイルスライフサイクルにおける役割については明らかになっていない。そのため、RG系を用いることで、様々なS1遺伝子変異ウイルスを作製し、FAST、p17および σ Cの機能を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

NBV マウス病態モデルを開発するため、高病原性 Miyazaki 株を C3H マウスに経鼻接種し、体重、死亡率、病理組織、各種臓器におけるウイルス複製能について解析を行った。各種臓器におけるウイルス力価はブランク法により決定した。

各種欠損組換えウイルスはRG系により作出された。各種 S1 遺伝子産物 (FAST、p17 および σ C) 欠損ウイルスの作製は以下のとおり行った。FAST、p17 および σ C の各翻訳開始コドンに変異を導入した S1 遺伝子レスキュープラスミドを作製した。作製した各種 S1 変異プラスミドを他の9分節ウイルスゲノム発現レスキュープラスミドとコトランスフェクションし、培養後、組換えウイルスをブランク法により単離した。得られた組換えウイルスの性状解析は培養細胞およびマウ

ス病態モデルを用いて行った。各種欠損ウイルスの感染細胞におけるウイルスタンパク質発現能については、抗 FAST、p17 および σ C 抗体を用いて解析を行った。培養細胞における σ C 欠損ウイルス ($\Delta\sigma$ C) の感染性については、抗 NBV 抗体を用いた蛍光抗体法により解析した。

4. 研究成果

高病原性のNBV Miyazaki株の致死的な呼吸器感染マウスモデルの開発に成功した。Miyazaki株をマウスに経鼻接種し、観察した結果、感染マウスでは体重減少が認められ、 10^6 PFUを接種したマウスでは全ての個体が死亡した。感染マウスの肺では病変が認められ、ウイルスが効率よく増殖していることが確認された。以上の結果は、本研究で確立したマウスモデルがヒトの呼吸器疾患症状を反映する優れたモデルであることを示している。

NBV RG系を用いて、病原性への関与が示唆されるNBV S1遺伝子産物について詳細な解析を行った。

RG系を用いて、p17欠損ウイルス (Δ p17) の作製を試みた。その結果、 Δ p17の作製に成功したことから、p17はウイルスの複製に必須でないことが明らかとなった。さらにL929細胞における増殖能について調べた結果、 Δ p17は親株と同程度の複製能を示した。これらの結果から、p17は少なくともL929細胞でのウイルス複製には重要でないことが明らかとなった。

NBV粒子外層の構造タンパク質 σ Cは、宿主細胞へのセルアタッチメントに必須と予想されたが、 $\Delta\sigma$ Cの作製に成功したことから、 σ Cは少なくともL929細胞での複製には必須でないことが明らかとなった。様々な培養細胞株を用いて解析を行った結果、感染に σ Cを必要とする細胞株 (A549細胞) と σ Cに依存しない経路で感染する細胞株 (L929細胞、Vero細胞等) に分類されることが明らかとなった (図1)。

マウスモデルを用いた解析から、 $\Delta\sigma$ C感染マウスでは顕著に病原性が低下していた (図1)。これらの結果は、 σ Cが*in vivo*における主要な病原性因子であることを示して

いる。NBVは σ Cを含む複数の感染経路を有し、 σ Cに依存する感染経路が病態発現に重要と考えられる。また、 σ Cは株間での相同性が著しく異なることから、株間における病原性の決定因子としても重要と考えられる。

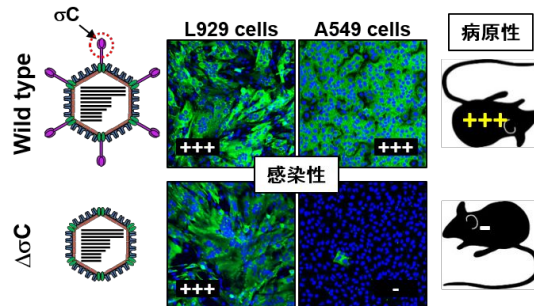


図1. σ C欠損ウイルスの感染性、病原性

細胞融合活性を有するFASTの機能について、FAST欠損ウイルス (Δ FAST) を用いて解析した結果、 Δ FAST の作出に成功したことから、FASTは細胞融合活性によるシンシチウムの形成に関わるものの、ウイルス複製に必須でないことが明らかとなった (図2)。しかし、様々な培養細胞株で Δ FASTの複製能について解析を行った結果、FASTはウイルス複製を顕著に増強する因子であることが明らかとなった。

マウスモデルを用いた解析から、 Δ FAST感染マウスでは顕著に病原性が低下しており、*in vivo*における病原性因子としてFASTの重要性が明らかとなった (図2)。FASTの細胞融合活性がFASTを有するレオウイルス科サブグループの複製能の増強ならびに高病原性に深く関与していることが示唆された。

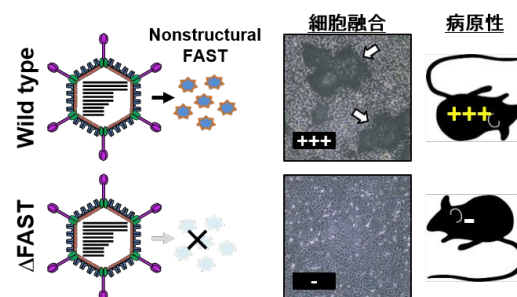


図2. FASTの細胞融合活性および病原性

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)

Eaton HE, Kobayashi T, Dermody TS, Johnston RN, Jais PH, Shmulevitz M, African swine fever virus NP868R capping enzyme promotes reovirus rescue during reverse genetics by promoting reovirus protein expression, virion assembly, and RNA incorporation into infectious virions. *Journal of Virology*, 査読有, 2017, 91, 7, e02416-16. DOI: 10.1128/JVI.02416-16
Kanai Y, Komoto S, Kawagishi T, Nouda R, Nagasawa N, Onishi M, Matsuura Y, Taniguchi K, Kobayashi T. Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有, 2017, 114, 9, 2349-2354. DOI:10.1073/pnas.1618424114

〔学会発表〕(計 9 件)

Takeshi Kobayashi, Reverse genetics for fusogenic bat-borne orthoreovirus associated with acute respiratory tract infections in humans, 11th International Symposium of The Institute Network “Frontiers in Biomedical Sciences”, 2017/1/27, Fujii Memorial Hall, Kuramoto Campus, Tokushima University, Tokushima, Tokushima.

金井祐太, 川岸崇裕, 納田遼太郎, 下島昌幸, 西條政幸, 松浦善治, 小林剛, 人に重篤な呼吸器症状を引き起こすコウモリ由来レオウイルス, 第 57 回日本熱帯医学会大会, 2016/11//6, 一ツ橋大学一ツ橋講堂, 東京都・国立市.

Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi, Nelson Bay Orthoreovirus S1 Gene Segment Determines Strain-Specific Differences in Viral Infectivity and Pathogenesis, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/25, 札幌コンベンションセンター, 北海道・札幌市.

Yuta Kanai, Takahiro Kawagishi, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi, In vivo live imaging of tumor by gene-modified mammalian orthoreovirus with exogenous luciferase transgene, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/25, 札幌コンベン

ションセンター, 北海道・札幌市.
金井祐太, 川岸崇裕, 松浦善治, 小林剛, レポーター遺伝子発現哺乳類オルソレオウイルスによる腫瘍の生体イメージング, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016/9/7, 日本大学生物資源科学部, 神奈川県・藤沢市.

Yong Gang Li, Yuta Kanai, Takahiro Kawagishi, Misa Onishi, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi, Expression and characterization of the Neison Bay orthoreovirus μ NS and σ NS proteins, 第 11 回日中国際ウイルス学会, 2016/7/1, 琴弾荘, 香川県・観音寺市.

Yuta Kanai, Takahiro Kawagishi, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi, Roles of FAST proteins of fusogenic orthoreovirus in viral propagation and pathogenesis, 第 11 回日中国際ウイルス学会, 2016/7/1, 琴弾荘, 香川県・観音寺市.

Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi, FUNCTIONAL ANALYSIS OF NELSON BAY ORTHOREOVIRUS CELL ATTACHMENT PROTEIN σ C, American Society for Virology 2016, 2016/6/20, VirginiaTech, Blacksburg, USA.

Yuta Kanai, Takahiro Kawagishi, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi, BIOLOGICAL FUNCTIONS OF ORTHOREOVIRUS FAST PROTEINS IN VIRAL REPLICATION AND PATHOGENESIS, American Society for Virology 2016, 2016/6/20, VirginiaTech, Blacksburg, USA.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

小林 剛 (KOBAYASHI, Takeshi)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：90324847

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

金井祐太 (Kanai, Yuta)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：80506501

(4) 研究協力者

()