

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630244

研究課題名(和文) ウイルス感染への細胞応答を活用した水中感染性腸管系ウイルスの迅速検出手法の開発

研究課題名(英文) Rapid detection of infectious enteric viruses in water using cellular responses to virus infection

研究代表者

大村 達夫 (Omura, Tatsuo)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授

研究者番号：30111248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新規な感染性ウイルス検出手法に活用可能な細胞応答遺伝子を同定することを目指すものである。細胞小器官内の陽イオン濃度を制御するイオンチャネルタンパク質の遺伝子について、ウイルス感染後の発現量をモニタリングしたところ、KCNJ4遺伝子発現量は感染多重度=1で24時間後、感染多重度=0.1で36時間後に有意に増加していた。SCN7A遺伝子は、両方のMOI条件で24時間後に有意に増加していた。これらの結果から、KCNJ4およびSCN7A遺伝子が、感染性ウイルスの存在を早期に検出することが可能な遺伝子マーカーであることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify candidate genes for detecting infectious viruses when concentrated water samples were inoculated to cultivated human cell lines. A vaccine strain of poliovirus type 1 (PV1) was used as a test virus, and the INT407 cell line derived from human intestinal epithelial cells was used as a host cell line. The expression level of KCNJ4 and SCN7A genes were monitored in the post-infection of PV1. When PV1 was inoculated at multiplicity of infection (MOI) = 1, the expression levels of KCNJ4 and SCN7A genes were significantly increased compared to those in mock cells. These results indicate that these genes of ion-channel proteins are available as cellular genetic markers for detecting the presence of infectious viruses in water samples.

研究分野：土木環境システム

キーワード：腸管系ウイルス 細胞応答 迅速検出

1. 研究開始当初の背景

腸管系ウイルスは主に感染者の糞便を介して外界に放出されるため、日本のような下水処理システムが確立した先進諸国では、腸管系ウイルスを含む下水が下水処理場に流れ込んでいる。しかしながら、一般的な下水処理過程では腸管系ウイルスを適切に除去・不活化することが困難であるため、腸管系ウイルスが含まれた状態で下水処理水が環境中に放出されることになる。その結果、ウイルス汚染海域で養殖された牡蠣による食中毒が発生するなど、様々な環境水を介して引き起こされる腸管系ウイルスによる胃腸炎被害が問題視されている。

これらの健康被害を防ぐためには、環境水中の病原ウイルスによる感染リスクを正確に評価し、適切に管理することが求められる。しかしながら、各種水質基準にはウイルスに関連する項目が存在しないことから、環境水を汚染する腸管系ウイルスによって生じる問題に対して適切に対応できているとは言い難い状況にある。このような状況に陥っている理由は、環境水中の腸管系ウイルスが低濃度で存在していることに加え、感染性を有する腸管系ウイルスを望ましい時間スケールで検出する技術がそもそも存在しないことにある。主に時間的な問題を解決するために定量 PCR 法によるウイルス遺伝子の検出・定量が広く用いられてきているが、言うまでもなく定量 PCR 法ではウイルスの感染能力の評価は不可能である。感染性を保持した環境水中の腸管系ウイルスを迅速に検出可能な新規手法の開発が求められている。

本研究では、腸管系ウイルスがヒト組織細胞に感染した際、初期に発動する細胞応答に着目し、新規な感染性ウイルス検出手法に活用可能な細胞応答遺伝子及びその産物を同定することを目指す。代表的な腸管系ウイルスであるエンテロウイルスに関しては、細胞感染時における複製機構（ウイルス遺伝子放出 ウィルスタンパク質の合成 ウィルス遺伝子の複製 ウィルス粒子アッセムリー）が詳しく調べられているが、感染初期における細胞応答に関する知見はウイルス学の分野においても驚くほど少ない。感染初期においては、ウイルスが自らを複製するための場を創り出そうとするのに対し、細胞はインターフェロン（IFN）などが関わる自然免疫機構によりウイルス複製の阻止を試みる（図1）。このウイルスと細胞のせめぎ合いの中で、ウイルス感染が成立するか否かが決定される。本研究では、「感染が成立する前のこの”せめぎ合い”の有無を指標として感染性ウイルスの有無を判断する」ことが可能であるか否かを検証する。

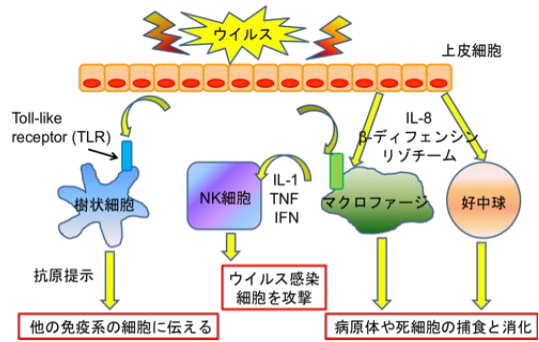


図1. 自然免疫機構の模式図.

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス感染時における細胞応答に着目し、細胞由来遺伝子マーカーを用いた水中腸管系ウイルスを迅速に検出する全く新しい手法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではポリオウイルス1型ワクチン株（PV1）をテストウイルスとして使用し、宿主としてヒト小腸上皮由来細胞（INT407）を使用した。80%コンフルエント培養のINT407細胞に対しPV1を接種し、CO₂インキュベータ（37℃）で培養しながら接種後一定時間ごとにサブサンプリングを行った。サブサンプリングされた細胞から総RNAを抽出し（TRIZOL、Thermo Fisher Scientific）、RT-qPCR法によりKCNJ4およびSCN7A遺伝子の定量を行った。用いたプライマー配列を表1に示した。また、比較Ct法解析に用いる対照遺伝子としてGPDH遺伝子の定量も行った。

表1. 使用したプライマーの配列

Primer	塩基配列(5'→3')
KCNJ4-F	CCACGAGATCGACGAGGA
KCNJ4-R	TCTCAAAGTCCTCCGACTCC
SCN7A-F	GTTGGCTTCACCAGAACCTAAG
SCN7A-R	GCCAACTCCAAATCAGGAG

4. 研究成果

PV1感染細胞内におけるKCNJ4およびSCN7A遺伝子の発現の経時的変化を図2に示した。KCNJ4遺伝子は感染多重度（multiplicity of infection: MOI）=1の場合に24時間後、MOI=0.1の場合には36時間後に、GPDH遺伝子との相対発現量が有意に増加したことが確認された。SCN7A遺伝子は、両方のMOI条件で24時間後にGPDH遺伝子との

相対発現量が有意に増加していることが確認された。PV1 を高濃度 (MOI=1) に接種した場合、両方の遺伝子で短時間の培養時間における発現の増加が検出されたが、感染後 36 時間では発現量の減少が確認され、KCNJ4 では 48 時間後に有意な発現が見られなかった。

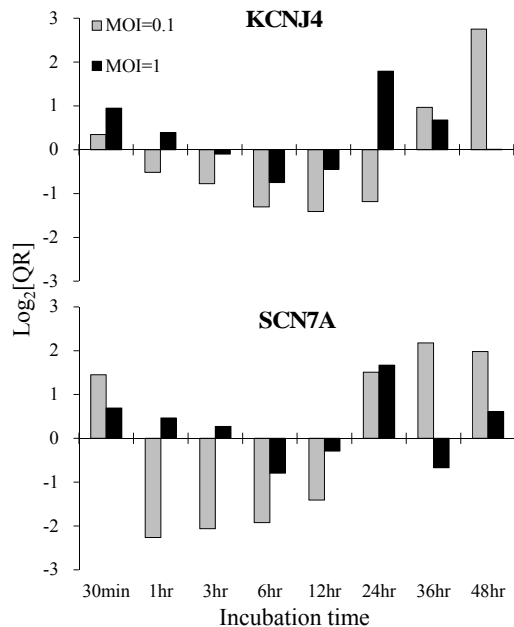


図2 . ポリオウイルス感染細胞 (INT407) における KCNJ4 及び SCN7A 遺伝子発現の経時変化 .

一方、低濃度 (MOI=0.1) で PV1 を接種した場合、接種後 48 時間において KCNJ4 遺伝子及び SCN7A 遺伝子の GPDH 遺伝子に対する相対発現量が有意に変動していることが確認された。特に KCNJ4 遺伝子の変動は明確であった。このような発現プロファイルの PV1 摂取量に対する依存性は、ウイルスと細胞が感染する頻度に由来するものと考えられる。すなわち、低い MOI の場合にはウェル中の細胞にウイルス感染が広がるまでに時間を要することで、比較的長い時間が経過した後に遺伝子発現量の有意な変動が検出されたと考えられる。これらの結果から、両方の遺伝子ともに、ウイルスの感染により有意に発現量が変動し、感染性ウイルスの検出用遺伝子マーカーとして使用可能であると考えられた。しかしながら、遺伝子発現の全体量に関しては KCNJ4 遺伝子の方が SCN7A 遺伝子に比べて常に高いことから、両者を比較すると、KCNJ4 遺伝子の方が定量対象として望ましいと考えられた。

そこで、次に KCNJ4 遺伝子のみについて、さらに PV1 接種量が少なくなった場合の発

現パターンを把握するための実験を行った。MOI は 0.1 (10^{-1}) に加えて 10^{-3} 及び 10^{-5} とした。MOI = 10^{-5} は、1 well に対してウイルス遺伝子 1 コピーを接種した量に相当する。PV1 感染後、24 時間が経過するまで 3 時間おきに発現量を計測し、GPDH 遺伝子に対する相対発現量を算出した (図 3)。その結果、各 MOI 条件において、PV1 感染後数時間以内に発現量が顕著に上昇したことが確認された。MOI= 10^{-1} では感染後 12 時間後に、MOI= 10^{-3} では感染後 18 時間後、MOI = 10^{-5} では感染後 24 時間後に発現量の上昇のピークが得られた。上述したように、MOI = 10^{-5} は細胞培養に用いる 6well プレート の 1 well に対してウイルス遺伝子 1 コピーを接種した量に相当する。ウイルスの感染価をプラーク形成単位 (plaque forming unit: PFU) で示した場合、一般的には 1 PFU を形成するのに約 100 コピーのウイルス遺伝子量 (=ウイルス 100 粒子) を必要とするので、今回得られた結果は、計算上 0.01 PFU に相当する感染価を検出可能であったことを示している。このように極めて低いウイルス濃度の条件でも遺伝子発現プロファイルの変化が見られたことは、KCNJ4 遺伝子が低濃度のウイルス感染に対しても鋭敏に反応することを示している。

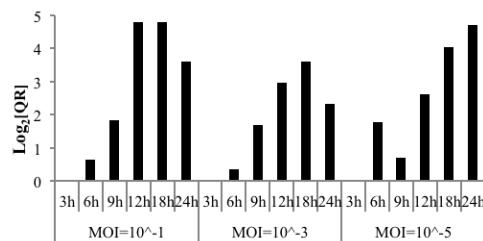


図3 . ポリオウイルス感染細胞 (INT407) における KCNJ4 遺伝子発現の経時変化 .

図 2 と図 3 を比較すると、同じ MOI (0.1) において、感染 24 時間後の KCNJ4 の発現パターンが異なるという結果であった。すなわち、図 2 では GPDH 遺伝子に対する相対発現量がマイナスであったのに対し、図 3 ではプラスの相対発現量が得られた。この結果は、KCNJ4 遺伝子の GPDH 遺伝子に対する相対発現量が細胞周期の影響を受けていることを示していると考えられる。いわゆるハウスキーピング遺伝子である GPDH 遺伝子の発現量は、細胞周期の影響を比較的受けにくいと考えられるが、それに対して細胞小器官におけるイオン透過性を制御するチャンネルタ

ンパク質の1つである KCNJ4 は、細胞周期の段階によって役割の大きさが変化することになる。本研究で得られた結果は、KCNJ4 遺伝子の発現量が PV1 感染により影響を受けることを示しているが、その影響が発現量の上昇によるものなのか下降によるものなのかは細胞周期の段階に影響を受けると考えられる。KCNJ4 遺伝子を感染性ウイルス検出用の細胞由来遺伝子マーカーとして用いるためには、細胞内における KCNJ4 遺伝子の発現特性について、今後さらに精査が必要であると言える。

さらに、実際の水環境由来サンプルにはウイルス以外の物質、例えば重金属や化学物質等の毒性物質などが含まれていることから、KCNJ4 遺伝子がウイルス以外の物質に対してどのような発現応答を示すかについて、上述した細胞周期との関連と併せ、今後明確にする必要がある。

本研究で提案する、細胞由来遺伝子マーカーを用いた感染性ウイルスの迅速検出技術が新規に確立されれば、従来のように定量 PCR によってウイルス遺伝子を検出せずとも、ウイルス量に比べて桁違いに存在量が多いヒト組織細胞側の遺伝子発現をモニタリングすることで、感染性を有する腸管系ウイルスの有無を判定することが可能となる。将来的には、ヒト組織細胞の遺伝子発現プロファイルをモニタリングするために、ターゲットとなる遺伝子産物を蛍光標識するプローブを開発して使用することも想定される。ウイルス感染によって産生された遺伝子産物量をリアルタイムにモニタリングすることで、迅速にウイルス感染を検出することが可能となる。これはクリプトスポジウムの検出方法に通じるところがあることから、これまでに確立された実験施設を活用できるという利点があり、広範に採用されることが期待される。

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)

(1) Zheng Ji, Xiaochang C. Wang, Limei Xu, Chongmiao Zhang, Naoyuki Funamizu, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Estimation of contamination sources of human enteroviruses in a wastewater treatment and reclamation system by PCR-DGGE. Food and Environmental Virology, 6(2), 99-109. 2014. doi: 10.1007/s12560-014-9140-x. 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

(1) 稲葉愛美、伊藤寿宏、大村達夫、岡部聡、

佐野大輔．ヒト細胞由来遺伝子マーカーを用いた感染性ウイルスの迅速検出．第50回日本水環境学会年会 2016年3月16日～18日．アスティとくしま(徳島県徳島市)

(2) 稲葉愛美、真砂佳史、大村達夫．セライトを用いた下水流入水のウイルス濃縮法の改善．第49回日本水環境学会．2015年3月16日～18日．金沢大学(石川県金沢市)

(3) 風間しのぶ、真砂佳史、当広謙太郎、相馬奈央、今川稔文、鈴木陽、Xiaofang Liu、斉藤繭子、押谷仁、大村達夫．下水モニタリングと感染性胃腸炎サーベイランスによるノロウイルス流行状況調査．第17回水環境学会シンポジウム．2014年9月8日～9日．滋賀県立大学(滋賀県彦根市)

(4) 真砂佳史、風間しのぶ、当広謙太郎、斉藤繭子、今川稔文、鈴木陽、押谷仁、大村達夫．ノロウイルス GI、GII 群を対象とした定量 PCR 法の比較．第17回水環境学会シンポジウム．2014年9月8日～9日．滋賀県立大学(滋賀県彦根市)

(5) Kazama, S., Masago, Y., Tohma, K., Souma, N., Imagawa, T., Suzuki, A., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H. and Omura, T. Detection and genotyping of norovirus from gastroenteritis surveillance and wastewater monitoring in 2012-2013 winter. 4th International Conference on Food and Environmental Virology, 2014年9月2日～5日. Ionian Academy (Corfu, Greece)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大村 達夫 (TATSUO OMURA)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授
研究者番号：30111248

(2)研究分担者

佐野 大輔 (DAISUKE SANO)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80550368

(3)連携研究者

真砂佳史 (YOSHIFUMI MASAGO)

国際連合大学サステイナビリティ高等研
究所・研究員

研究者番号：50507895