

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660231

研究課題名(和文) 持続感染培養系を用いたノロウイルスの変異機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mutation mechanism of norovirus using persistent infection culture system

研究代表者

花木 賢一 (Ken-Ichi, Hanaki)

国立感染症研究所・動物管理室・室長

研究者番号：40376421

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)：マウスノロウイルス(MNV)持続感染細胞の培養上清中ウイルスRNAの総量は、死細胞数と高い相関関係を認めた。透過型電顕解析では二重膜小胞内にウイルス粒子を認め、抗MNV血清と細胞質小胞マーカーを用いた間接二重蛍光抗体法では、MNV抗原がRab7の分布とほぼ一致することが示された。以上の知見からMNV持続感染培養系の生活環は、RAW264.7細胞が死細胞から放出されたMNVをエンドサイトーシスにより取り込んでRab7陽性後期末期エンドソームに貯蔵する。細胞の多くはMNVが増殖することなく壊死するが、一部の細胞ではMNVが増殖してアポトーシスを引き起こし、新たなウイルスの供給源になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Persistent infection with murine norovirus strain S7 (MNV-S7) in RAW264.7 cells was established. Transmissible electron microscopy and electron tomography showed that MNV-S7 virions aggregated in subcellular vesicles of persistently infected cells. Confocal immunofluorescence microscopy showed co-localization of MNV-S7 antigen with Rab7. The copy number of extracellular MNV-S7 RNA showed a high linear correlation with the number of non-viable cells, and virus replication was only observed in apoptotic cells. Based on these knowledges, the life cycle of persistent infection with MNV-S7 in RAW264.7 cells can be supposed as follows. Nearly 100% of persistently infected cells harbored MNV-S7 virions in Rab7-positive late endosomes. MNV-S7 replicated in a small number of the cells, which were identified by apoptotic morphological changes, and progeny virus was released into the culture supernatant from the apoptotic cells. The progeny virus was taken up by living RAW264.7 cells again.

研究分野：実験動物学

キーワード：ノロウイルス 持続感染 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

マウスノロウイルス (MNV) は細胞培養系と感染動物モデルがある唯一のノロウイルス属ウイルスである。そのため、ノロウイルス属ウイルスに関する多くの知見が MNV の研究により蓄積されている。MNV の遺伝子変異や遺伝子組換えに関する実験的知見は、ノロウイルス属ウイルスの遺伝子変異や抗原エピトープの変異を理解する上で重要な示唆を与えている。しかし、それらは MNV の初感染培養を繰り返すことによって行われているため、生体内で起こる連続的な変異を再現していない可能性がある。また、MNV にはマウスへの感染が一過性に終わる株 (MNV-1) と数ヶ月持続する株 (MNV-S7, MNV-3) とが知られているが、持続感染の成立するメカニズムは初感染培養によって解明することはできない。

我々は MNV に感受性のあるマウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に MNV を感染させても死滅せずに増殖する細胞が存在することを見出した。その細胞を 30 代 (200 日) 以上継代した後、培養上清を RAW264.7 細胞へ接種すると細胞変性効果が見られ、マウス抗 MNV 血清を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) によりウイルス抗原が細胞質に存在することを確認した。そこで、この持続感染細胞を用いると、宿主の免疫応答の影響を受けることなく MNV の遺伝子変異や遺伝子組換えを引き起こす要因とメカニズムを明らかにすることができると考えた。

2. 研究の目的

ウイルス持続感染細胞はマウス肝炎ウイルス、狂犬病ウイルス、A 型肝炎ウイルスをはじめ、様々なウイルスで樹立されているが、それらの中には継代を続ける過程でウイルスが脱落する事例が報告されている。そこで、本研究では MNV-S7 と MNV-1 の持続感染培養系について、継代毎に細胞と培養上清のストックを作製して研究リソースを保守する。そして、MNV 持続感染細胞の増殖能、定量 RT-PCR による培養上清中 MNV RNA 量の解析、IFA によるウイルス抗原の細胞内分布、透過型電子顕微鏡 (TEM) 解析による細胞内ウイルスの存在を証明する等を行って、持続感染培養系の性状を明らかにする。

3. 研究の方法

MNV-S7 と MNV-1 の持続感染細胞は 10% FBS 加 DMEM で培養し、80~90% 集密度となる 3~7 日毎に継代を行った。細胞増殖能の解析では持続感染細胞を 6 ウェルプレートに 2×10^5 / 2mL / ウェルで播種し、播種直後、2 時間後、播種後 24 時間毎 168 時間まで培養上清と細胞を全量回収した。細胞数はトリパンブルー染色により生死細胞数を算定し、また、培養上清中の MNV RNA 全量を算出するために必要な培養上清液量は、重量を測定して算出した。培養上清中 MNV RNA の定量は、SYBR

Green I RT-PCR 法 (Hanaki et al., 2014. PLoS ONE 9: e98108) により行った。また、培養上清のウイルス感染価は 50% 感染量 (TCID₅₀) により算出した。継代培養を続けることによるブラックの形成変異が見られるか確認するためのブラックアッセイは、常法により行った (Takimoto et al., 2013. Exp Anim. 62: 237-245)。

ウイルス抗原の細胞内分布を明らかにするため、抗 MNV-S7 血清を用いた IFA を行い、蛍光顕微鏡で観察した。さらに、ウイルス抗原の細胞内局在を明らかにするため、抗 MNV-S7 血清と抗エンドソーム (EEA1, Rab7, Rab9)、抗ライソソーム (LAMP1)、抗オートファゴソーム (LC3) マーカー抗体 5 種の何れか一つを用いた二重 IFA を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により解析した。

細胞内におけるウイルス粒子の存在を明らかにするため、エポキシ樹脂包埋後に超薄切した試料の TEM 観察を行った。また、粒子の形態的特徴を明らかにするため、電子線トモグラフィ解析を行った。さらに、MNV 持続感染培養上清中のウイルス粒子を確認するため、MNV 持続感染細胞を無血清 DMEM で一晩培養した。遠心により細胞残渣を除去した培養上清は、Nanosep Centrifugal Devices 100K (PALL) で濃縮あるいはポリエチレングリコール (分子量 6,000) による沈澱濃縮後、精製水で沈澱を再浮遊させた。次に、支持膜を張ったグリッドに試料を吸着させ、酢酸ウランによるネガティブ染色を実施し、TEM 解析を行った。

4. 研究成果

樹立した MNV-S7 と MNV-1 の持続感染細胞は、前者が 3 次元のあるいは培地に浮遊して集塊を形成しながら増殖する (図 1A) のに対して、後者は RAW264.7 細胞同様に培養容器に接着して増殖した (図 1B)。

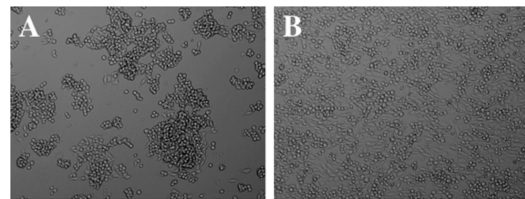


図 1 持続感染細胞の形態 (左: MNV-S7、右: MNV-1)

持続感染細胞の増殖速度は RAW264.7 細胞と異なっているように見えたことから、経日的に細胞数を算定した (図 2)。何れの細胞も RAW264.7 細胞 (NC) に比べて増殖は悪く、死細胞を含む播種後 6 日目の総細胞数比較では、MNV-S7 持続感染細胞は NC の 72%、MNV-1 持続感染細胞は NC の 47% であった。MNV-S7 持続感染細胞は培養 5 日目以降に死細胞数が増加し、それらの中にアポトーシスを起こした細胞を認めた (図 7A 参照)。MNV が増殖したことによりアポトーシスが引き起こされたと考えられる (Bok et al., 2009. J. Virol.

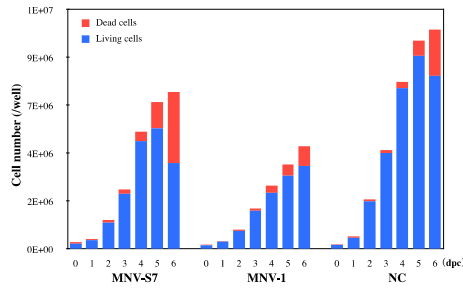


図2 細胞数の経時的推移 (MNV-S7, MNV-S7 持続感染細胞; MNV-1, MNV-1 持続感染細胞; NC, RAW264.7 細胞. 青, 生細胞数; 赤, 死細胞数; N=4.)

IFA によるウイルス抗原の観察では、MNV-S7 持続感染細胞の細胞質に目視で明瞭な顆粒状蛍光が観察された (図 3)。一方、MNV-1 持続感染細胞では細胞質に CCD カメラで辛うじて捉えることができる微量の顆粒状蛍光が観察された (データ未収載)。

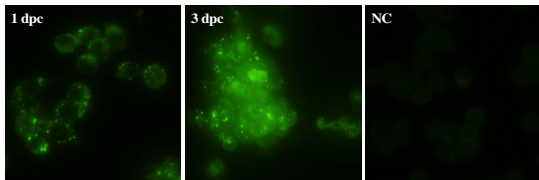


図 3 MNV-S7 持続感染細胞の抗 MNV-S7 血清による IFA (1dpc, 播種後 1 日目; 3dpc, 播種後 3 日目; NC, RAW264.7 細胞)

播種後 7 日目の培養上清中 MNV RNA 総量を定量 RT-PCR で求めると、MNV-S7 持続感染細胞は 7.7×10^{10} コピー、MNV-1 持続感染細胞 2×10^8 コピーであり、両者の間に 400 倍近い差があった。MNV-1 持続感染細胞は増殖が悪く、MNV RNA 量とウイルス抗原発現量も MNV-S7 持続感染細胞に比べて明らかに少なく、本研究での解析に適しないことから 50 代目で継続を一時中止した。

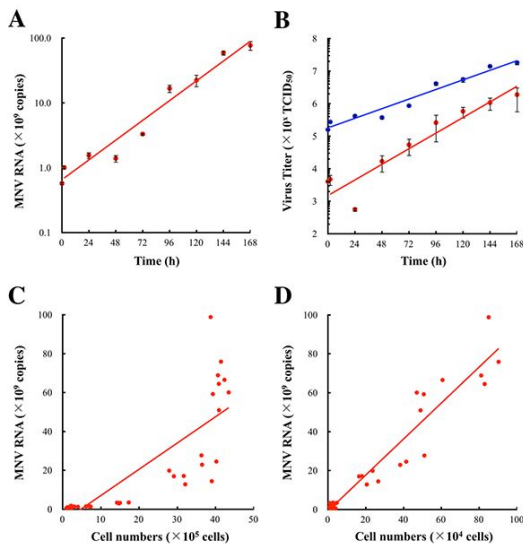


図 4 MNV-S7 持続感染細胞の培養上清中 MNV RNA 量と細胞数との関係性 (A, 経時的培養上清中 MNV RNA の総量;

B, MNV RNA 量から算出される $TCID_{50}$ (青)と実測値(赤); C, 培養上清中 MNV RNA 総量と生細胞数との相関性; D, 培養上清中 MNV RNA 総量と死細胞数との相関性)

MNV-S7 持続感染細胞の培養上清中 MNV RNA 総量を定量 RT-PCR により調べると、指数関数的に増加していた (図 4A)。MNV 初感染培養系において、定量 RT-PCR により算出される MNV RNA 量とウイルス感染価とは相関があった (Hanaki et al., 2014. PLoS ONE 9: e98108)。それに基づいて $TCID_{50}$ を算出すると (図 4B, 青線) 実測した $TCID_{50}$ (図 4B, 赤線) との間に 10 倍以上の差があった。この理由として、持続感染細胞由来のウイルス粒子の中にゲノムの一部を欠く欠陥干渉 (DI) 粒子が存在していることが考えられる。

培養上清中 MNV RNA の由来を推定するため、経時的な MNV RNA 総量と細胞数との相関を調べた。生細胞とは $R^2=0.67$ と低い相関を示したが (図 4C)、死細胞とは $R^2=0.922$ と高い相関を示した。(図 4D)。従って、培養上清中 MNV RNA は生細胞由来ではなく、死細胞由来と考えられる。

IFA で観察された細胞内のウイルス抗原がウイルス粒子であるか確認するため、TEM 解析を行った。核、ゴルジ体、ミトコンドリアといった細胞小器官に形態異常を認めない細胞の細胞質に高電子密度の塊を認め (図 5A)、それは二重膜内に存在する高電子密度粒子の集塊であった (図 5B)。

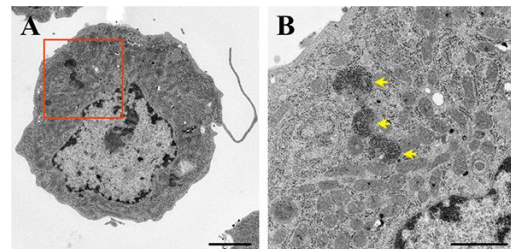


図 5 MNV-S7 持続感染細胞の TEM 像 (A, 倍率 1,000 倍; B, A の赤囲み部分の拡大像 (倍率 10,000 倍) で、矢頭は高電子密度粒子塊を示す。)

この集塊について電子線トモグラフィー解析を行うと、培養上清中ウイルスのネガティブ染色像 (図 6B) 同様の MNV の特徴的な形態を認めた (図 6A)。そのため、細胞質に集塊として認められる高電子密度粒子はウイルス粒子と考えられた。

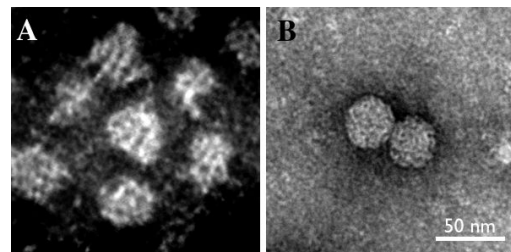


図 6 高電子密度粒子の電子線トモグラフィー解析 (A, 高電子密度粒子の電子線トモグラフィー; B, MNV-S7 持続感染細胞培養上清中ウイルスのネガティブ染色)

MNV-S7 持続感染細胞の中にはアポトーシスを起こした細胞と壊死した細胞が認められる。それら細胞を TEM 解析すると、アポトーシスを引き起こした細胞では MNV が増殖したことによる形態変化が観察された (図 7A,B)。一方、壊死した細胞では小胞のままウイルス集塊が遊離する形態が観察された (図 7C,D)。

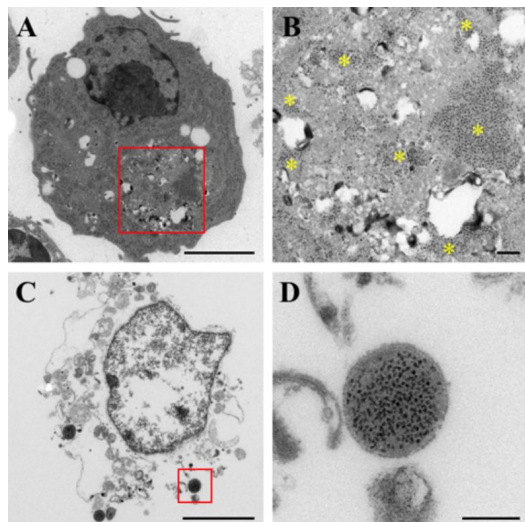


図 7 アポトーシスまたは壊死した MNV-S7 持続感染細胞の TEM 像 (A, アポトーシス細胞、倍率 2,500 倍; B, A の赤囲み部分の拡大像 (倍率 8,000 倍) で、*はウイルス集塊/増殖部位を示す。; C, 壊死細胞、倍率 2,500 倍; D, C の赤囲み部分の拡大像 (倍率 8,000 倍) で、ウイルス粒子を含む小胞。)

ウイルス粒子が集塊を形成する小胞が何かを同定するため、抗 MNV 血清と各種小胞マーカー抗体を用いた二重 IFA を行って CLSM 解析を行った。なお、MNV 抗原は AlexaFluor594 (赤)、各種小胞マーカーは AlexaFluor488 (緑) で染色した。ウイルス

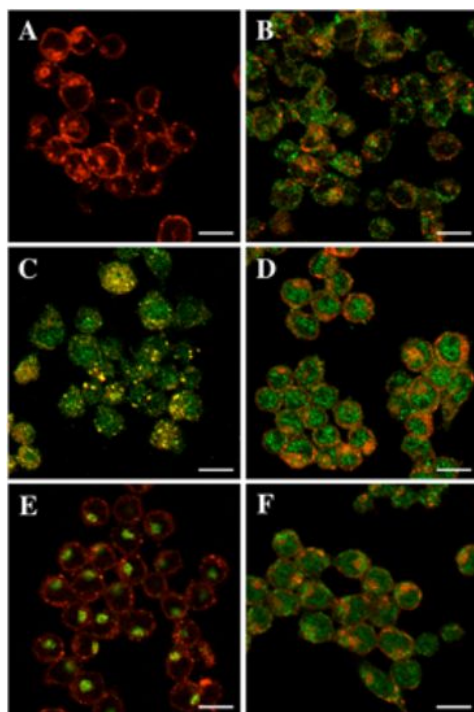


図 8 CLSM 解析 (A, MNV のみ; B, MNV+EEA1; C, MNV+Rab7; D, MNV+Rab9; E, MNV+LAMP1; F, MNV+LC3)

抗原は蛍光顕微鏡観察で認めた細胞質内顆粒の他、細胞膜にも認められた (図 8A)。そして、ウイルス抗原は各種小胞マーカーの中で唯一 Rab7 の分布と一致した (図 8C)。Rab7 は後期エンドソームに局在しているが、MNV が何故後期エンドソームに留まるかは今後の研究課題である。

MNV 持続感染培養系は RAW264.7 細胞に MNV を感染させて生存した細胞を維持して樹立していることから、MNV の持続感染の成立には細胞のウイルス感染抵抗性が重要な要素と考えられる。一方、ウイルス側についてはブラック形成に変化を認めるような変異は認められず (データ未収載) DI 粒子の存在が示唆された。持続感染成立には DI 粒子の関与が報告されており (Streissle, 1981, Adv. Virus Res. 26: 37-64) MNV の持続感染においても DI 粒子の関与が考えられる。

本研究の結果、MNV 持続感染培養系の生活環は 1) MNV に感染抵抗性を示す RAW264.7 細胞は、死細胞から放出された MNV をエンドサイトーシスにより取り込んで後期エンドソームに貯蔵する。2) MNV を貯蔵した細胞の多くは MNV が増殖することなく壊死する。3) しかし、一部の細胞では MNV が増殖してアポトーシスを引き起こし、新たなウイルスの供給源となる。と考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

花木賢二、大岡静衣、松浦絵里、小笠原勝利、花坂智人、石田欣二、平野紀夫 マウスノロウイルス持続感染細胞の性状解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 平成 26 年 11 月 10 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

花木賢二、大岡静衣、松浦絵里、小笠原勝利、花坂智人、石田欣二、平野紀夫 マウスノロウイルス持続感染細胞におけるウイルス粒子の分布 第 62 回日本実験動物学会総会 平成 27 年 5 月 28 日 京都テルサ (京都府・京都市)

花木賢二、滝本一広、石山絵里、網康至、石田欣二 RAW264.7 細胞におけるマウスノロウイルス持続感染の機序 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 平成 28 年 10 月 24 日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 1 件）

名称：マウスノロウイルス持続感染細胞
発明者：花木賢二
権利者：学校法人岩手医科大学
種類：特許
番号：特許願 2014-218741 号
出願年月日：平成 26 年 10 月 27 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 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

花木 賢一 (HANAKI, Ken-Ichi)
国立感染症研究所・動物管理室・室長
研究者番号：40376421

(2) 研究分担者

滝本 一広 (TAKIMOTO, Kazuhiro)
国立感染症研究所・動物管理室・主任研究
官
研究者番号：70280766

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()