

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860297

研究課題名(和文) リバースジェネティクス法を用いたエボラウイルスの病原性解析

研究課題名(英文) Investigation of pathogenetic mechanism of Ebola virus disease using reverse genetics system

研究代表者

津田 祥美 (Tsuda, Yoshimi)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：70447051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルスの主要標的細胞はマクロファージや樹状細胞であるとされているが、これらの細胞でのウイルス増殖が致死的病態や、宿主応答へどのような働きをしているのかは未だ不明である。本課題では、細胞特異的に発現している細胞内小分子RNAであるmicroRNAに着目し、microRNAのターゲット配列を組み込むことで主要標的細胞特異的に増殖が抑制されたエボラウイルスを作出した。作出したウイルスの病原性を親株と比較することにより、エボラウイルスの病原性における主要標的細胞でのウイルス増殖の重要性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Cells of the mononuclear phagocyte system, such as macrophages/monocytes, are the primary target cells of Ebola virus (EBOV). To investigate the pathological significance of targeted infection of macrophages/monocytes by EBOV, we generated recombinant EBOV possessing the target sequences of microRNA (EBOV-miRt) that is expressed in hematopoietic cells. We first characterized the replication of EBOVs in the human hepatoma cells as well as the macrophage-derived cells. Compared with control EBOV, EBOV-miRt showed reduced replication in only macrophage-derived cells. To analyze the role of macrophages/monocytes in pathogenesis, mice were inoculated with mouse-adapted-EBOV-miRt or control mouse-adapted-EBOV. Mice infected with mouse-adapted-EBOV-miRt survived. Conversely, mice inoculated with mouse-adapted-EBOV succumbed to infection. These results suggested that replication in macrophages is an important factor contributing to a lethal outcome of EBOV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 病原性

## 1. 研究開始当初の背景

エボラウイルスはヒトや類人猿に致死率最大 90% の重篤な出血熱を引き起こす。しかしながら、これまでに認可されたワクチンや治療法は存在しない。ワクチン開発とともにアウトブレイク発生後対策としても治療法の開発は喫緊の課題であり、治療法開発の基礎ともなるエボラウイルスの病原性解明は重要である。エボラウイルスに感染すると免疫抑制性傾向、全身性炎症反応に続いて血液凝固系の破綻などがおこり、全身性ショックをおこし死に至る。これまでにエボラウイルスの主要標的細胞はマクロファージや樹状細胞などであることが報告されてきたが、マクロファージや樹状細胞がエボラウイルス感染の致命的病態にどのような役割を果たしているか、また致命的病態にどのように関与しているのかは未だ多くが不明である。そこで本課題ではエボラウイルスの致命的病原性における主要標的細胞であるマクロファージや樹状細胞でのウイルス増殖に着目し解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

microRNA (miRNA) は 20-25 塩基の RNA で、生物自身の遺伝子よりつくられて、相補的な配列を持つメッセンジャー RNA (mRNA) と結合することにより遺伝子発現を抑制することで細胞機能を調節する働きを持つ小分子 RNA である。近年、ウイルスの遺伝子にコードされる miRNA や宿主細胞で産生された miRNA がウイルス増殖や病原性に関与していることが報告された<sup>1)</sup>。また特定の臓器で発現している miRNA の相補配列 (miRNAt) をウイルス遺伝子に組み込むことで、感染細胞において miRNA と結合したウイルス遺伝子 mRNA からのタンパク質生成が抑制されることから、miRNA を発現している臓器の細胞特異的に増殖が抑制されたウイルスを作出する方法が報告された。そこで本研究では、

1) マクロファージや樹状細胞で発現している miRNA の相補配列を組み込んだ組換えエボラウイルスを作出し、作出したウイルスがマクロファージや樹状細胞での増殖が抑制されているか確認する

2) マクロファージで増殖が抑制された組換えエボラウイルスをマウスなどの実験動物へ実験感染し、親株である通常の増殖能力をもつエボラウイルスと病原性を比較することにより、エボラウイルスの致命的病原性にマクロファージや樹状細胞でのウイルス増殖がどのように関与しているか解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 組換えエボラウイルス遺伝子の作製  
エボラウイルスの部分遺伝子を組み込んだサブクローニングプラスミドを用いて、エボラウイルスの L 遺伝子の停止コドン後に miRNAt を組み込んだエボラウイルス遺伝子

を作製した。作出したサブクローニングプラスミドを用いて miRNAt を組み込んだエボラウイルスの全長遺伝子を作成した。

(2) リバースジェネティクス法による感染性ウイルスの作出

リバースジェネティクス法を用いて感染性ウイルス粒子を作成した。作出した miRNAt 組換えエボラウイルスの遺伝子配列を確認後、種々の培養細胞におけるウイルスの増殖能力を、親株と機能を持たない対照配列を組み込んだ対照株を用いて比較した。

(3) マウスモデルにおける感染実験

ヒトや類人猿に病原性をもつエボラウイルスはマウスに病原性をもたないため、マウスに致死性病原性を示すマウス馴化株に miRNAt を組み込んだマウス馴化型 miRNAt 組換えウイルスを作成した。作出した miRNAt 組換えエボラウイルスをマウスに実験感染し、マクロファージでウイルス増殖が抑制された組換えエボラウイルスと親株であるマウス馴化株との病原性を比較した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞内において miRNA が mRNA に組み込まれた miRNAt を認識することで目的の蛋白質の発現が抑制されることが予測される。一方で細胞内には多種の miRNA が存在している。マクロファージや樹状細胞で特異的に増殖できない組換えウイルスを作出するため、初めにマクロファージや樹状細胞に特異的に発現している miRNA を選択することとした。実際のウイルスを用いる実験を行う前に、エボラウイルス遺伝子の 5' および 3' UTR の間にレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を導入したエボラウイルスのミニゲノムシステムの作成を試みた。エボラウイルスの増殖の代わりにルシフェラーゼ活性の抑制率を比較するため BSL2 施設で使用可能であることから、このシステムを用いてマクロファージ特異的に遺伝子発現を抑制する miRNAt の配列を検討する予定であった。しかしながらミニゲノムシステムの構築に予定より時間がかかったこと、さらに同時に検討していたエボラウイルス部分遺伝子のサブクローニングプラスミドへの遺伝子導入が効率よく行えたことから、ウイルスの作出を試みることにした。

(2) エボラウイルスおよびエボラウイルスの遺伝子全長配列を扱う実験は日本国内では許可されていないため米国の BSL4 施設において実施した。これまでの報告<sup>2)</sup> よりマクロファージ及び樹状細胞特異的に発現する miRNA をいくつか選択し、エボラウイルスの L 遺伝子の後に miRNAt 配列もしくは対照配列を組み込んだ全長遺伝子を作成し、BSL4 施設において組換えウイルスの作出を試みた。ヒトに病原性を持つ野生株とともに、マウスモデルを用いた解析に用いるためにマウスに馴化させることでマウスやハムスターに対し致死性病原性を示すようになったマウス馴

化株について miRNA 組換えウイルスを作出した。作出したウイルスの遺伝子解析により、全てのウイルスで組込んだ miRNA 配列の 4 回繰り返し配列は途中欠損や変異することなくウイルス遺伝子に組込まれたことが確認できた。また力価測定に用いたアフリカミドリザル腎由来細胞 (Vero 細胞) では、作出した miRNA 組換えウイルスは親株と同程度の増殖能力をもつことが確認された。

ウイルスの増殖能力を比較するため、まずエボラウイルスの感染実験に汎用されている細胞株およびマウスより採取した初代腹腔内マクロファージ細胞についてターゲットとした miRNA の発現を qRT-PCR により確認した。その結果 Vero 細胞や Huh7 細胞 (ヒト肝癌由来細胞株) などでは対象とした miRNA の発現が確認されなかったが、ヒトマクロファージ由来細胞株 (THP-1) および非感染マウスより採材したマウス腹腔内マクロファージ細胞では miRNA の発現が確認された。そこで作出した miRNA 組換えウイルスのウイルス増殖を Huh7 細胞およびヒトマクロファージ由来細胞株を用いて親株と比較した。その結果、miRNA を組込んだ miRNA 組換えウイルスは親株と比較してヒトマクロファージ由来細胞株でのみウイルス増殖が抑制されることが確認された (図 1)。一方で Vero 細胞と同様に Huh7 細胞では両ウイルスともに同様のウイルス増殖を示すことが確認された。

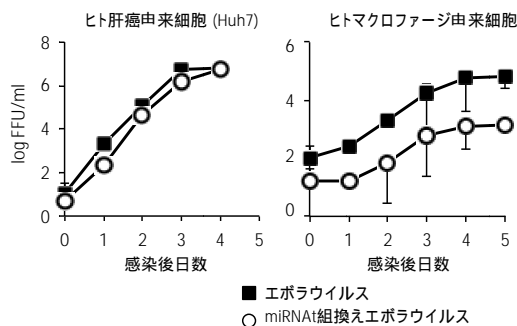


図 1 . 培養細胞におけるウイルス増殖比較

さらに Huh7 細胞に miRNA をトランスフェクションにより導入して miRNA を強制発現した細胞およびマウス腹腔内マクロファージ細胞でも同様に miRNA 組換えウイルスの増殖が抑制されることが確認された。

(3) 培養細胞でのマクロファージ細胞特異的ウイルス増殖抑制が確認されたことから、親株であるマウス馴化株と miRNA 組換えウイルスをマウスに実験感染してその生残率を比較した。その結果、マウス馴化株で致死量と確認されたウイルス力価の接種において miRNA 組換えウイルス ( ) を接種されたマウスはほぼ生残したのに対し、親株のマウス馴化株 ( ) を接種したマウスは接種後 8 日以内にすべて死亡したことから、miRNA 組換えウイルスは親株と比較して病原性が

減弱していると考えられた (図 2)。

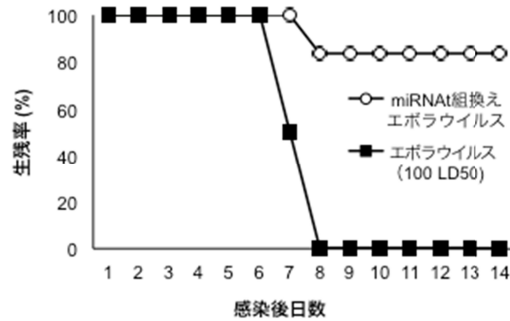


図 2 . 実験感染マウスの生残率

これらの結果よりエボラウイルスの病原性にはマクロファージ細胞でのウイルス増殖が重要である可能性が示唆された。本課題で得られた知見をもとに、作成した組換えウイルスを用いて感染後宿主応答やウイルス増殖について更に解析することで、致命的病態の鍵となる宿主応答の解明に繋がることが期待される。

#### 参考文献

- 1) He L. and Hannon GJ., Nat Rev Genet. (2004) 5: 522-531.
- 2) Pham AM., et al., PLoS Pathog. (2012) 8: e1002465

#### 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 2 件)

津田祥美、海老原秀喜：エボラウイルスのリバースジェネティクスの改良とその応用, 4th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2015 年 1 月 19-21 日, 沖縄  
Tsuda Y: The pathogenetic mechanism of Ebola virus disease and improved reverse genetics system, US - Japan Viral Diseases Panel Meeting, September 12-15, 2016, North Bethesda, MD

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 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

津田 祥美 (TSUDA, Yoshimi)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70447051

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者