

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860308

研究課題名(和文) チクングニア熱関節炎におけるC型レクチンの関与

研究課題名(英文) The role of C-type lectin in Chikungunya arthritis

研究代表者

中山 絵里 (Nakayama, Eri)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究員

研究者番号：40645339

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)：チクングニアウイルス(CHIKV)は蚊によって媒介され、感染患者は関節炎を特徴とした発熱症状を示す。本研究では、CHIKVが細胞への吸着にC型レクチンを使用することを明らかにし、CHIKVは蚊と哺乳類との間でまわる感染の過程でウイルス膜蛋白質上に纏う糖鎖構造を変え、複数のレクチン発現細胞に効率よく感染する可能性を示した。また、CHIKV感染により関節炎を発症するマウスモデルを確立し、炎症部位ではレクチン関連分子の遺伝子発現量が上昇することを明らかにした。この結果より、発現が増加したレクチン関連分子を介して炎症部位ではCHIKVの細胞への吸着効率が増加する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chikungunya virus is transmitted to human by mosquitoes. The most common symptoms of Chikungunya virus infection are fever and arthritis. Here we showed that C-type lectins, which bind to carbohydrates in a calcium-dependent manner, bound to Chikungunya virus and mediated the attachment of the virus to the cell surface. Our data suggested that Chikungunya virus attached to the cells expressing different C-type lectins using the different glycan structures on the viral glycoprotein added in the cycle between mosquito and mammalian hosts. Furthermore, we developed the mouse model of Chikungunya arthritis seen in patients using the viral isolates from Chikungunya imported cases. The gene expression of the lectin-related molecules was upregulated in the mouse lower legs showing the arthritis by Chikungunya virus infection. These results implied that the Chikungunya viral attachment to the cell surface might increase by upregulated lectin-related molecules at the site of arthritis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：チクングニアウイルス 関節炎 レクチン 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

2004年以降、チクングニア熱は世界的に流行し、日本では2013年10月現在で47例の輸入症例が確認されている。チクングニアウイルス(CHIKV)を保有する蚊に刺されることによって感染し、患者は熱、筋肉痛、関節痛を主症状とする急性熱性疾患の症状を呈する。一部の患者では、急性症状から回復した後も日常生活に支障をきたす程の関節リウマチ様後遺症が残る。CHIKV感染による関節炎と類似した病態を示す関節リウマチでは、患者の関節内マクロファージでC型レクチン(DC-SIGN)の発現量が増加することが報告されている。しかし、CHIKV感染による関節炎とC型レクチンの関連については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、近年のCHIKV臨床分離株を用い、CHIKV感染による関節炎の病態形成にC型レクチンが関与するかどうかを明らかにする。具体的に以下の点について研究を実施する。

- (1) CHIKVが細胞への吸着・侵入にC型レクチンを利用するかどうかを明らかにする。
- (2) CHIKV感染により関節炎を発症するマウスモデルを確立する。
- (3) 関節炎発症部位でレクチンやレクチン関連分子の発現量が増加するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 輸入症例からのCHIKVの分離および分離株の系統解析

CHIKV感染症の輸入症例検体をC6/36細胞またはVero細胞に接種することでウイルス分離を行った。分離株の全長配列を次世代シーケンサーを用いて解読した。解読した配列をもとに分子系統学的解析を実施した。

(2) CHIKVのC型レクチン発現細胞への感染性解析

輸入症例検体より分離したCHIKVのEタンパク質をクローニングし、それぞれのEタンパク質を被ったGFP発現シュードタイプVesicular Stomatitis Virusを作出した。各シュードタイプウイルスのC型レクチン(DC-SIGN、DC-SIGNR、LSECtin)発現RajiおよびJurkat細胞への感染率をフローサイトメーターを使用して測定した。

C6/36細胞またはVero細胞にて増殖させた4種のCHIKV臨床分離株(Mal09-02、SL10571、IDN09-58、BaH306)をDC-SIGN、DC-SIGNR、LSECtin発現Jurkat細胞へ接種した。接種後、経時的に回収した培養上清中のウイルス力価をプラーク法により測定した。

(3) CHIKV感染により関節炎を発症するマ

ウスモデルの開発

10^4 または 10^5 pfu の CHIKV を 11 種類の近交系マウス (A/JJmsSlc、AKR/NSlc、BALB/cCrSlc、C3H/HeSl、C3H/HeJYokSlc、C3H/HeNSlc、C57BL/6NCrSlc、C57BL/6JmsSlc、DBA/2CrSlc、DBA/1JmsSlc、NZW/NSlc) の下腿皮下に接種し、臨床症状を観察した。また、血清および組織中のウイルス力価測定を実施した。

マウス順化 CHIKV を作出するため、IFNAR1 欠損マウスまたは乳のみマウスで CHIKV を継代した。10 継代したウイルスを C57BL/6J マウスに接種し、臨床症状の観察、血中および組織中のウイルス力価測定を実施した。

10^4 CCID₅₀ の CHIKV を C57BL/6J マウスおよび IFNAR1 欠損マウスの足背部に皮下接種し、臨床症状を観察した。また、血清および組織中のウイルス力価測定、病理学的解析を実施した。

(4) 関節炎発症局所におけるレクチン関連分子の遺伝子発現量解析

CHIKV 感染により関節炎症状を呈したマウスの後肢から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを使用して遺伝子発現量解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 輸入症例からの CHIKV の分離および分離株の系統解析

2016年6月までに国内で診断されたCHIKV感染症輸入症例89例のうち54例の実験室診断を実施した。2013年以前は南アジア、東南アジアからの輸入症例のみに限られていたが、2014年以降、CHIKVの流行拡大に伴い、太平洋諸国、カリブ海諸国、アメリカ大陸からの帰国者においてもCHIKV感染症が診断された(図1)。2016年には、それまでCHIKVの流行が報告されていなかったキューバからの帰国者においてCHIKV感染症を実験室診断し、キューバ国内でCHIKVが流行していることを初めて明らかにした。

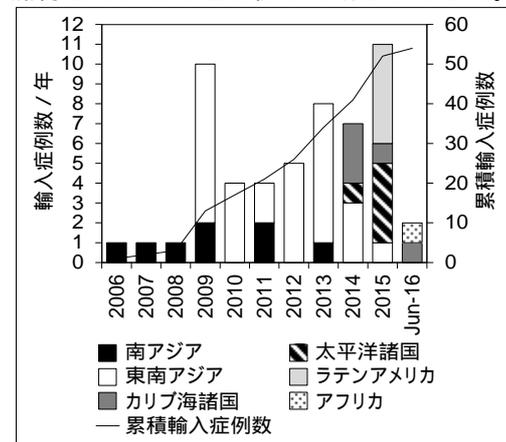


図 1. CHIKV 感染症の輸入症例数

診断した輸入症例検体から 14 株の CHIKV を分離し、分離株の全長遺伝子配列を決定した。決定した遺伝子配列をもとに分子系統学的解析を行い、4 株は東/中央/南アフリカ (ECSA) 遺伝子型、10 株はアジア遺伝子型に属することを明らかにした (図 2. 赤字)。また、系統解析の結果、インドネシアおよびアンゴラには複数の異なる CHIKV 株が存在したことを明らかにした。

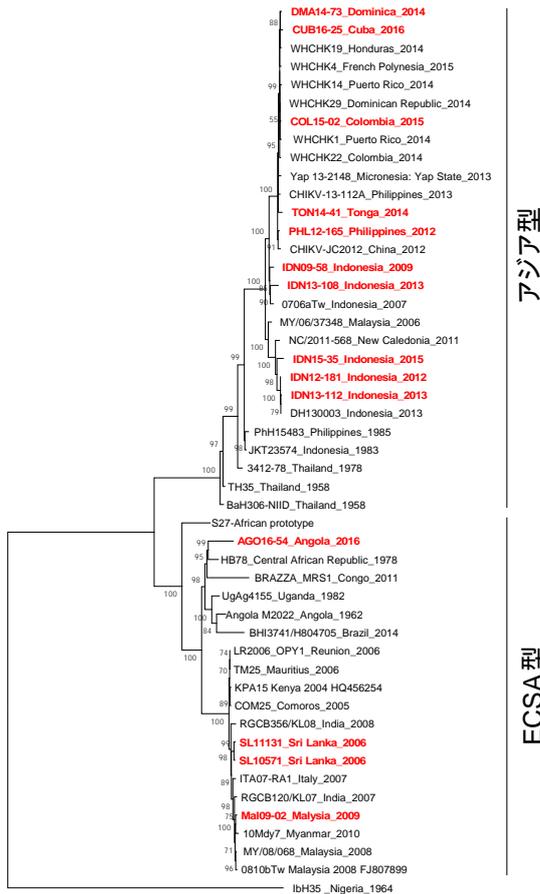


図 2. CHIKV の系統樹 (株名_国_分離年)

(2) CHIKV の C 型レクチン発現細胞への感染性解析

ECSA 型に属す Mal09-02 株、SL10571 株および、アジア型に属す IDN09-58 株、BaH306 株の E 蛋白質を被ったシュードタイプウイルスを作成した。各シュードタイプウイルスの C 型レクチン (DC-SIGN、DC-SIGNR、LSECtin) 発現 Raji および Jurkat 細胞への感染率を非発現細胞と比較した結果、いずれのシュードタイプウイルスにおいてもレクチン発現細胞で感染性が増加した (図 3)。CHIKV は DC-SIGN、DC-SIGNR、LSECtin を介して細胞へ吸着・侵入可能であることを明らかにした。

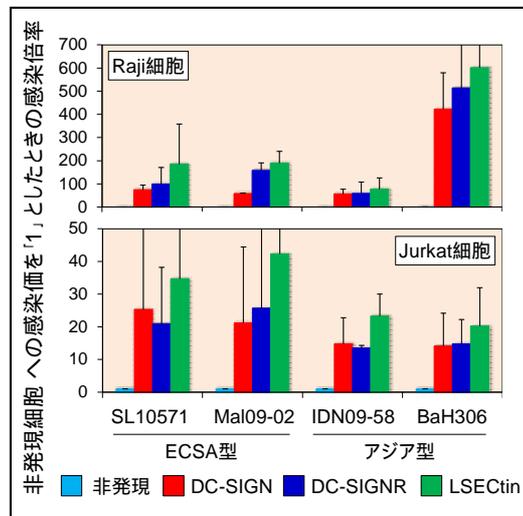


図 3. シュードタイプウイルスの C 型レクチン発現細胞への感染効率

蚊由来 C6/36 細胞または哺乳類由来 Vero 細胞にて増殖させた Mal09-02 株、SL10571 株、IDN09-58 株、BaH306 株を DC-SIGN、DC-SIGNR、LSECtin 発現 Jurkat 細胞へ接種した後、経時的に培養上清中のウイルス力価を測定した。SL10571 株、IDN09-58 株、BaH306 株と比較して、Mal09-02 株でレクチン発現細胞への感染性が増加した (図 4)。また、C6/36 細胞で増殖させた Mal09-02 株の感染性は DC-SIGN 発現細胞で最も高く、Vero 細胞で増殖させた Mal09-02 株の感染性は DC-SIGNR および LSECtin 発現細胞で高かった (図 4)。

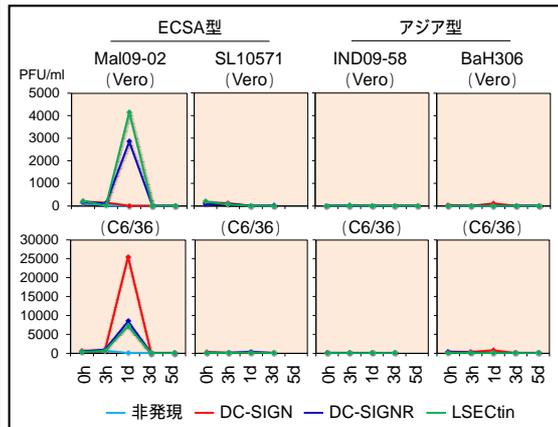


図 4. CHIKV の C 型レクチン発現 Jurkat 細胞への感染効率

C 型レクチンはカルシウム依存性に糖鎖を認識して結合する蛋白質である。蚊細胞と哺乳類細胞では付加される糖鎖構造が異なることから、ウイルスを調整した細胞種によって各レクチン発現細胞への感染効率が異なることが示された。この結果より以下のことが考えられた。蚊の体内で増殖した CHIKV は DC-SIGN と結合しやすい糖鎖構造を纏う。蚊の吸血時にヒトの皮内に侵入した CHIKV は、DC-SIGN を発現する単球系細胞に感染する。ヒト単球系細胞で増殖したウイルスは、DC-SIGNR や LSECtin を発現する内皮細胞に

感染しやすい糖鎖構造を纏う。このように、蚊と哺乳類で付加される糖鎖構造の違いが CHIKV の宿主内での動態に影響を与えている可能性が示唆された。

(3) CHIKV 感染により関節炎を発症するマウスモデルの開発

11 種類の近交系マウス (A/JJmsSlc、AKR/NSlc、BALB/cCrSlc、C3H/HeSl、C3H/HeJYokSlc、C3H/HeNSlc、C57BL/6NcrSlc、C57BL/6JmsSlc、DBA/2CrSlc、DBA/1JmsSlc、NZW/NSlc) の下腿皮下に 10^4 または 10^5 pfu の Mal09-02 株を接種したが、いずれのマウス系統においても症状が認められず、また、血清および接種部位直下の筋組織においてウイルスの増殖が認められなかった。

CHIKV に易感染性の IFNAR1 欠損マウスまたは乳のみマウスでウイルスを継代することによりマウス順化 CHIKV の作出を試みた。マウスで 10 継代したウイルスを C57BL/6J マウスの下腿皮下に接種したが、臨床症状および各組織でのウイルスの増殖は認められず、マウス組織へのウイルスの順化は確認できなかった。

一方、足背部皮下に 10^4 CCID₅₀ の Mal09-02 株、IDN09-58 株、DMA14-73 株を接種することで、C57BL/6J マウスにウイルス血症および後肢腫脹 (筋炎・関節炎) を起こすことに成功した (図 5、6)。IFNAR1 欠損マウスにおいても足背部皮下に CHIKV を接種することでウイルス血症および後肢腫脹を観察可能であったが、感染後 4 日程度で致死的症状を示した。CHIKV 感染患者において死亡例は稀であることから、IFNAR1 欠損マウスはヒト患者での症状を模倣しなかった。

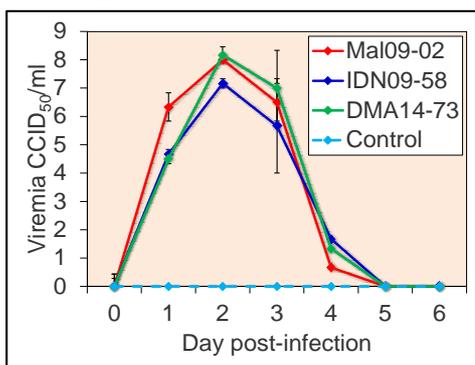


図 5. CHIKV 感染 C57BL/6J マウスにおけるウイルス血症の経時的変化

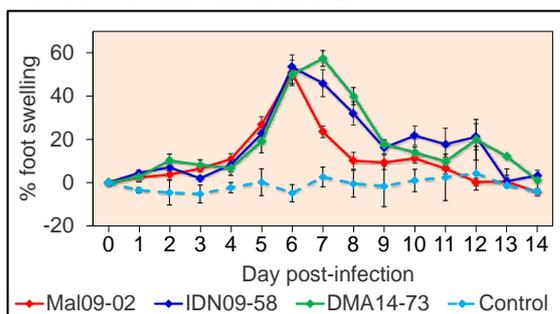
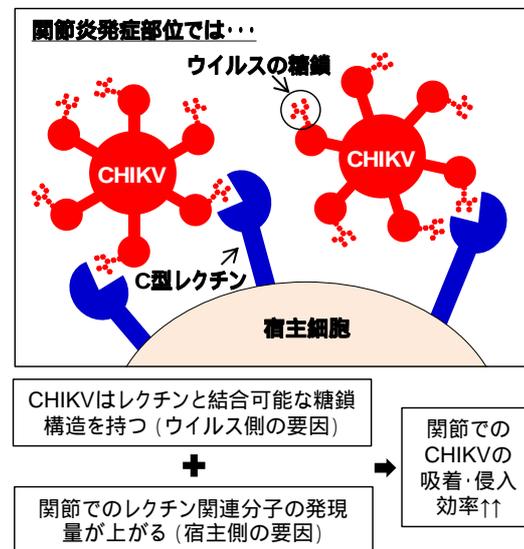


図 6. CHIKV 感染 C57BL/6J マウスにおける後肢腫脹

(4) CHIKV 感染マウスの炎症局所におけるレクチン関連分子の遺伝子発現量解析

(3) において、CHIKV 感染により炎症を認めた C57BL/6J マウスの後肢より RNA を抽出し、次世代シーケンサーを使用して遺伝子発現量解析を実施した。非感染コントロールと比較して、炎症を示したマウスでは 5 種類の C 型レクチン関連遺伝子 (CLEC4A1, 4A3, 4D, 4E, 7A, 12A) の発現が増加していた。

本研究の結果、CHIKV は蚊と哺乳類との間でまわる感染の過程でウイルス膜タンパク質上に纏う糖鎖構造を変え、複数の C 型レクチン発現細胞に効率良く感染する可能性が考えられた。また、CHIKV 感染による炎症発症部位ではレクチン関連分子の発現量が上昇することから、発現が増加したレクチン関連分子を介して CHIKV の細胞への吸着・侵入効率が炎症部位で増加する可能性が考えられた (下図)。



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 20 件)

- Hashimoto T, Kutsuna S, Tajima S, Nakayama E, Maeki T, Taniguchi S, Lim CK, Katanami Y, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Ohmagari N. Importation of Zika Virus from Vietnam to Japan, November 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017 Jul;23(7):1223-1225. doi: 10.3201/eid2307.170519. (査読有)
- Takaya S, Kutsuna S, Nakayama E, Taniguchi S, Tajima S, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N. Chikungunya Fever in Traveler from Angola to Japan, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017 Jan;23(1):156-158. doi:

10.3201/eid2301.161395. (査読有)
Kutsuna S, Kato Y, Nakayama E, Taniguchi S, Takasaki T, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. A case of consecutive infection with Zika virus and Chikungunya virus in Bora Bora, French Polynesia. *J Infect Chemother*. 2017 Feb;23(2):114-116. doi: 10.1016/j.jiac.2016.08.003. (査読有)
Tsuboi M, Kutsuna S, Kato Y, Nakayama E, Shibasaki K, Tajima S, Takasaki T, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. Autochthonous Chikungunya Fever in Traveler Returning to Japan from Cuba. *Emerg Infect Dis*. 2016 Sep;22(9):1683-5. doi: 10.3201/eid2209.160603. (査読有)
Nakayama E, Kotaki A, Tajima S, Kawada M, Miura K, Gemma A, Adachi T, Sekizuka T, Kato K, Yamashita A, Moi ML, Ikeda M, Yagasaki K, Shibasaki K, Saijo M, Kuroda M, Takasaki T. Two different dengue virus strains in the Japanese epidemics of 2014. *Virus Genes*. 2016 Oct;52(5):722-6. doi: 10.1007/s11262-016-1356-4. (査読有)
Tajima S, Nakayama E, Kotaki A, Moi ML, Ikeda M, Yagasaki K, Saito Y, Shibasaki KI, Saijo M, Takasaki T. Whole Genome Sequencing-Based Molecular Epidemiologic Analysis of Autochthonous Dengue Virus Type 1 Strains Circulating in Japan in 2014. *Jpn J Infect Dis*. 2017 Jan 24;70(1):45-49. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.086. (査読有)
Imai K, Nakayama E, Maeda T, Mikita K, Kobayashi Y, Mitarai A, Honma Y, Miyake S, Kaku K, Miyahira Y, Kawana A. Chikungunya Fever in Japan Imported from the Caribbean Islands. *Jpn J Infect Dis*. 2016;69(2):151-3. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.063. (査読有)
中山絵里, 高崎智彦. 先天性ジカウイルス感染症. 成人病と生活習慣病. 46 巻 11 号. 2016 年 11 月. 1407-1410. (査読無)
中山絵里, 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. 感染症セミナーシリーズ. 一類感染症の特徴と注意点. 272 号. 2016 年 11 月. (査読無)
中山絵里, 高崎智彦. 蚊が媒介するウイルス感染のわが国への脅威と今後(Dengue, チクングニア, ジカ). 感染・炎症・免疫. 46 巻 3 号. 59-61. 2016. (査読無)
Tajima S, Yagasaki K, Kotaki A, Tomikawa T, Nakayama E, Moi ML, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. In vitro growth, pathogenicity and serological characteristics of the Japanese encephalitis virus genotype V Muar strain. *J Gen Virol*. 2015 Sep;96(9):2661-9. doi: 10.1099/vir.0.000213. (査読有)

Ogawa H, Miyamoto H, Nakayama E, Yoshida R, Nakamura I, Sawa H, Ishii A, Thomas Y, Nakagawa E, Matsuno K, Kajihara M, Maruyama J, Nao Changula K, Hang'ombe B, Namangala B, Nambota A, Katampi J, Igarashi M, Ito K, Feldmann H, Sugimoto C, Moonga L, Mweene A, Takada A. Seroepidemiological Prevalence of Multiple Species of Filoviruses in Fruit Bats (*Eidolon helvum*) Migrating in Africa. *J Infect Dis*. 2015 Oct 1;212 Suppl 2:S101-8. doi: 10.1093/infdis/jiv063. (査読有)
中山絵里, 西條政幸. エボラウイルス感染症. *Surgery Frontier* 22(3):44-49, 2015. (査読無)
中山絵里, 西條政幸. エボラ出血熱: 疫学、臨床、治療薬・ワクチン開発. *Infection Front*. 2015. Jun; No. 34. 5-7. (査読無)
中山絵里, 高崎智彦. デング熱. 化学療法の領域. Vol.31 No.6. 44-50. 2015. (査読無)
中山絵里, 高崎智彦. チクングニア熱. *臨床と微生物*. 42 巻 3 号. 51-55. 2015. (査読無)
三浦邦治, 川田真幹, 柿本年春, 渡辺卓郎, 廣瀬立夫, 小山卓史, 高崎智彦, モイメンリン, 中山絵里, 田島茂. 約 70 年ぶりに確認された国内感染 Dengue 熱の第 1 例に関する報告. *IASR*. Vol. 36 p. 35-37: 2015 年 3 月号. (査読無)
中山絵里, 高崎智彦. Dengue 熱輸出症例. *IASR*. Vol. 36 p. 39-40: 2015 年 3 月号. (査読無)
Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: a case of coinfection. *Arch Virol*. 2014 Nov;159(11):2969-75. doi: 10.1007/s00705-014-2152-x. (査読有)
Moi ML, Kotaki A, Tajima S, Ikeda M, Yagasaki K, Lim CK, Kinoshita H, Nakayama E, Saito Y, Kurane I, Oishi K, Saijo M, Takasaki T. Trends of imported dengue fever cases in Japan, 2010 to 2013. *Dengue Bulletin*. 2014. 38. 113-119. (査読有)

[学会発表](計 7 件)

中山絵里. IFNAR1 欠損マウスにおけるジカウイルスの病原性解析. 第 23 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 2016 年 10 月. 北海道大学(北海道・札幌市)
中山絵里, 田島茂, 谷ヶ崎和美, 小滝徹, 富川拓海, モイメンリン, 林昌宏, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. 遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルス株の性状解析. 第 119 回日本小児科学会学術集会. 2016 年 5 月. ロイトン札幌, 札幌芸術文化の館

(北海道・札幌市)
Tajima S, Tomikawa T, Nakayama E, Kotaki A, Moi ML, Ikeda M, Yagasaki K, Saito Y, Shibasaki K, Saijo M, Takasaki T. Complete nucleotide sequences of two groups of autochthonous DENV-1 strains in Japan, 2014. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
Nakayama E. Next-Generation Sequencing of Dengue Virus Genome. 第22回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 2015年11月. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
中山絵里. デング熱. 平成26年度獣医公衆衛生講習会. 2015年1月. 北海道獣医師会館(北海道・札幌市)
中山絵里, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林昌宏, 西條政幸, 高崎智彦. チクングニア熱の輸入症例の報告および血清学的診断法の開発. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
田島茂, 谷ヶ崎和美, 小滝徹, 中山絵里, Moi ML, 林昌宏, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. 遺伝子型V型日本脳炎ウイルス株に対する日本脳炎ワクチンの中和効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔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

<http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 絵里 (Nakayama, Eri)
国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究員
研究者番号：40645339

(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

Andreas Suhrbier (Suhrbier, Andreas)
QIMR Berghofer Medical Research Institute

Natalie Prow (Prow, Natalie)
QIMR Berghofer Medical Research Institute