

氏名（本（国）籍）	岡 田 和 真（愛知県）
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 杉 山 誠
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第483号
学位授与年月日	平成29年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	狂犬病ウイルスP蛋白質アイソフォームが関与する病原性発現機構の解明
審査委員	主査 岐 阜 大 学 教 授 浅 井 鉄 夫 副査 帯広畜産大学 教 授 横 山 直 明 副査 岩 手 大 学 教 授 村 上 賢 二 副査 東京農工大学 教 授 水 谷 哲 也 副査 岐 阜 大 学 教 授 杉 山 誠

学位論文の内容の要旨

狂犬病は、狂犬病ウイルス（RV）によって引き起こされる神経症状を主徴とする致死性の人獣共通感染症である。RVのP遺伝子上には、同じアミノ酸の読み枠内に、既知のRV株間で高度に保存される5つの開始コドンが存在する。各々の開始コドンからは、P蛋白質の全長であるP1、ならびにN末端を様々な長さで欠損しているP2~P5（tPs）の計5つのP蛋白質アイソフォームが翻訳される。中でもP1はRNAポリメラーゼの共因子、ならびにI型インターフェロン（IFN）の産生および応答を抑制するIFNアンタゴニストとしての活性を有し、ウイルス感染に重要な役割を果たすことが知られている。一方で、tPsについては、いくつかのアイソフォームがIFN応答を抑制することが示唆されているものの、その詳細は明らかにされておらず、病原性との関連性も不明である。

RVの病原性は、末梢組織から中枢神経系まで感染を拡大する「神経侵入性」ならびに中枢神経系内で感染拡大し、致死的な神経症状を引き起こす「神経病原性」によって決定される。これまで、RVの神経侵入性および神経病原性を検討するために、手法としてマウスへの筋肉内接種および脳内接種が行われてきた。以前、神経侵入性および神経病原性が減弱したNi-CE株のゲノムに強毒の西ヶ原株のP遺伝子を有するCE(NiP)株が、筋肉内接種および脳内接種によってマウスに致死的な感染を引き起こすことが報告されている。この結果は、神経侵入性および神経病原性においてP蛋白質が重要な役割を持つことを示している。本研究では、RVの病原性発現機構におけるtPsの重要性を解明する目的で、tPsの発現能を欠失したCE(NiP)変異株〔CE(NiP)ΔP2-5株〕を作製し、CE(NiP)株との比較解析を行った。

第1章では、CE(NiP)株のP遺伝子上に存在するP2~P5の4つの開始コドン（AUG）を全てAUAに変異させ、CE(NiP)ΔP2-5株を作出した。同株感染細胞において、tPsの発現が欠失していることを示した。以上より、CE(NiP)ΔP2-5株の作出の成功を確認した。

第2章では、CE(NiP)ΔP2-5株およびCE(NiP)株のP1のRNAポリメラーゼ共因子としての活性ならびにIFNアンタゴニスト活性を比較した。その結果、CE(NiP)ΔP2-5株P1は、CE(NiP)株P1と同程度にRNA合成能を有し、またIFN産生および応答を司るIFN-βプロモーターおよびIFN応答配

列の活性化を抑制した。従って、CE(NiP)ΔP2-5 株 P1 に導入されたアミノ酸変異は、上記の機能に影響しないことを示した。

第 3 章では、神経病原性における tPs の重要性を検証するため、マウスへの脳内接種によって CE(NiP)ΔP2-5 株および CE(NiP)株の神経病原性を比較した。その結果、両株のマウスの脳内での増殖性および神経病原性は同等であることから、RV の神経病原性ならびに脳内でのウイルス増殖に tPs は重要ではないことを示した。

第 4 章では、神経侵入性における tPs の重要性を検討するため、マウスへの筋肉内接種により CE(NiP)ΔP2-5 株および CE(NiP)株の病原性を比較検討した。CE(NiP)株接種群における発症率および致死率がいずれも 80%であったのに対し、CE(NiP)ΔP2-5 株接種群では各々 35%および 30%であった。この結果より、tPs が神経侵入性において重要な役割を果たしていることを示した。さらに、感染マウスにおいて、CE(NiP)ΔP2-5 株の末梢神経への感染効率および筋肉における増殖効率が、CE(NiP)株よりも減弱し、培養筋肉細胞においても、CE(NiP)ΔP2-5 株の増殖効率が減弱していることが確認された。これらの結果は、tPs が筋肉細胞におけるウイルス増殖を促進し、末梢神経への感染効率を高めることにより、RV の神経侵入性に寄与していることを示唆している。

第 5 章では、筋肉細胞において tPs が IFN 産生を抑制する可能性を検討するため、CE(NiP)ΔP2-5 株もしくは CE(NiP)株を感染させた培養筋肉細胞における IFN 遺伝子および IFN 誘導性遺伝子の発現量を比較した。その結果、CE(NiP)ΔP2-5 株感染細胞において、CE(NiP)株感染細胞よりも、上記の遺伝子の発現量が有意に高いことを明らかにした。さらに、P1~P5 の各アイソフォームを発現させた培養筋肉細胞において IFN-β プロモーター活性が抑制されたことから、全てのアイソフォームが IFN 産生抑制活性を有することを示した。従って、筋肉細胞において、tPs が IFN の産生を抑制することにより、ウイルスの増殖効率を高めていることが示唆された。

以上の結果より、tPs が筋肉細胞での IFN 産生を抑制し、ウイルス増殖を促進することにより、末梢神経への感染効率を高める役割を果たしていることが示唆された。本研究では、初めて RV の病原性発現機構における tPs の重要性を示すことができた。本研究により得られた知見は、狂犬病の新たな暴露後発症予防法および安全な生ワクチンの開発に有用であると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

狂犬病は、狂犬病ウイルス (RV) によって引き起こされる神経症状を主徴とする致死性の人獣共通感染症である。RV の P 遺伝子上には、同じアミノ酸の読み枠内に、既知の RV 株間で高度に保存される 5 つの開始コドンが存在する。各々の開始コドンからは、P 蛋白質の全長である P1 ならびに N 末端を様々な長さで欠損している P2~P5 (tPs) の計 5 つの P 蛋白質アイソフォームが翻訳される。P1 はウイルス感染に重要な役割を果たすことが知られているものの、tPs については、機能の詳細は明らかにされておらず、病原性との関連性も不明である。これまでに、神経侵入性および神経病原性が減弱した Ni-CE 株のゲノムに強毒の西ヶ原株の P 遺伝子を有する CE(NiP)株が、マウスに致死的な感染を引き起こすことが知られている。本研究では、RV の病原性発現機構における tPs の重要性を解明する目的で、CE(NiP)株から tPs の発現能を欠失した CE(NiP)変異株 [CE(NiP)ΔP2-5 株] を作製し、マウスでの感染モデルを用いて CE(NiP)株との比較解析を行った。第 1 章では、CE(NiP)株の P 遺伝子上に存在する P2~P5 の 4 つの開始コドン (AUG) を全て AUA に変異させた CE(NiP)ΔP2-5 株を作出した。第 2 章では、CE(NiP)ΔP2-5 株および CE(NiP)株の P1 の機能を比較し、tPs 欠損の結果 CE(NiP)ΔP2-5 株 P1 に導入されたアミノ酸変異が P1 の機能に影響しないことを示した。第 3 章では、マウスへの脳内接種によって両株の神経病原性を比較し、RV の神経病原性ならびに脳内でのウイルス増殖に、tPs は重要ではないことを示した。第 4 章では、マウスへの筋肉内接種によって両株の病原性を比較し、tPs が神経

侵入性において重要な役割を果たしていることを示した。さらに、両株の末梢神経への感染効率および筋肉における増殖効率を比較検討し、tPs が筋肉細胞におけるウイルス増殖を促進し、末梢神経への感染効率を高めることにより、RV の神経侵入性に寄与している可能性を示した。第5章では、両株を感染させた培養筋肉細胞における IFN 関連遺伝子について検討し、筋肉細胞において、tPs が IFN の産生を抑制することにより、ウイルスの増殖効率を高めていることを示した。

以上、本研究により、初めて、RV の病原性発現機構における tPs の重要性が示された。本研究で得られた知見は、狂犬病の新たな暴露後発症予防法および安全な生ワクチンの開発に有用であると考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Roles of the rabies virus phosphoprotein isoforms in pathogenesis
著 者 名 : Okada, K., Ito, N., Yamaoka, S., Masatani, T., Ebihara, H., Goto, H., Nakagawa, K., Mitake, H., Okadera, K. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : Journal of Virology
巻・号・頁・発行年 : 90(18):8226-8237, 2016

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness
著 者 名 : Yamaoka, S., Ito, N., Ohka, S., Kaneda, S., Nakamura, H., Agari, T., Masatani, T., Nakagawa, K., Okada, K., Okadera, K., Mitake, H., Fujii, T. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : Journal of Virology
巻・号・頁・発行年 : 87(22):12327-12338, 2013
- 2) 題 目 : Interaction of rabies virus P-protein with STAT proteins is critical to lethal rabies disease
著 者 名 : Wiltzer, L., Okada, K., Yamaoka, S., Larrous, F., Kuusisto, H.V., Sugiyama, M., Blondel, D., Bourhy, H., Jans, D.A., Ito, N. and Moseley, G.W.
学術雑誌名 : The Journal of Infectious Diseases
巻・号・頁・発行年 : 209(11):1744-1753, 2014
- 3) 題 目 : Detection of avian-like rotavirus A VP4 from a calf in Japan
著 者 名 : Mitake, H., Ito, N., Okadera, K., Okada, K., Nakagawa, K., Tanaka, T., Katsuragi, K., Kasahara, K., Nihongi, T., Tsunemitsu, H. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 77 (2) : 221-224, 2015
- 4) 題 目 : Persistence of the rotavirus A genome in mesenteric lymph nodes

of cattle raised on farms

著 者 名 : Mitake, H., Ito, N., Okadera, K., Okada, K., Nakagawa, K., Tanaka, T., Katsuragi, K., Kasahara, K., Nihongi, T., Sakurai, S., Tsunemitsu, H. and Sugiyama, M.

学術雑誌名 : Journal of General Virology

巻・号・頁・発行年 : 96(9):2708-2713, 2015

- 5) 題 目 : Isolation and characterization of a novel type of rotavirus species A in sugar gliders (*Petaurus breviceps*)

著 者 名 : Okadera, K., Abe, M., Ito, N., Mitake, H., Okada, K., Nakagawa, K., Une, Y., Tsunemitsu, H. and Sugiyama, M.

学術雑誌名 : Journal of General Virology

巻・号・頁・発行年 : 97(5):1158-1167, 2016

- 6) 題 目 : Isolation of a sp. nov. Ljungan virus from wild birds in Japan

著 者 名 : Mitake, H., Fujii, Y., Nagai, M., Ito, N., Okadera, K., Okada, K., Nakagawa, K., Kishimoto, M., Mizutani, T., Okazaki, K., Sakoda, Y., Takada, A. and Sugiyama, M.

学術雑誌名 : Journal of General Virology

巻・号・頁・発行年 : 97(8):1818-1822, 2016