HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the virulence factor involved in the pathogenicity in tick-borne encephalitis virus infection [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	境, 瑞紀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11737号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59313
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mizuki_Sakai_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：境　瑞紀

学位論文題名

Studies on the virulence factor involved in the pathogenicity in tick-borne encephalitis virus infection

（ダニ媒介性脳炎ウイルス感染における病原性発現に関与するウイルス側因子に関する研究）

ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はフラビウイルス属に分類され、人に重篤な脳炎を起こす人獣共通感染症の原因ウイルスである。自然界において、*Ixodes* 属のマダニと、げっ歯類を中心とした哺乳類動物の間で本ウイルスの感染環が成立している。ヒトは主に感染マダニの吸血によってTBEV に感染する。ヨーロッパ諸国とロシアを中心に年間約 10,000 人の患者が報告されているが、TBEV の病原性メカニズムはほとんど明らかになっておらず、未だ生ワクチンやウイルス特異的な治療法はない。また本ウイルスにはヨーロッパ型、シベリア型、極東型の 3 つのサブタイプが存在し、それぞれ異なる病態を示す他、同一のサブタイプにおいても株間で異なる病原性を有する株が報告されている。しかしそれらの病原性の相違を決定するウイルス側因子は、現在特定されていない。

日本では北海道で患者が発生し、発生地域の犬の血液から Oshima 5-10 株が分離された。Oshima 株は、遺伝子解析により高病原性の極東型に分類されるが、ロシアの脳炎患者由来である標準株の Sofjin-HO 株よりもマウスに対する病原性は低い。その一方で両株の塩基配列の相同性は95%以上と高いため、両株の病原性の相違に関わるウイルスの配列・領域を特定することで、極東型TBEV の病態発現機序の解明に重要な知見が得られると考えられる。本研究では異なる病原性を持つ両株のキメラウイルスを作製し、病原性の相違に関わるウイルス側因子の特定とそれが関わる病態発現機構の解明を試みた。

本研究ではリバースジェネティクス法を用いて、ウイルスゲノムの全領域を 11 の領域に分け、高病原性の Sofjin 株の各領域を低病原性の Oshima 株に導入後したキメラウイルスを作製した。これらのキメラウイルスをマウスに皮下接種し、その病原性を親株である Oshima 株と比較することで、病原

性決定因子の特定を試みた。その結果、多くのキメラウイルスで病原性の上昇が見られ、一部の非構造蛋白，及び 5'-，3'-非翻訳領域（UTR）などの、複数のウイルス側因子によって高い病原性が発現することが示唆された。その中でも、Sofjin 株の 3'-UTR variable region を導入したキメラウイルスでは、最も著明な病原性の上昇が見られ、本領域が病原性に重要であることが明らかとなった。

3'-UTR variable region は株間での多様性が高く、ヒトの患者由来株や、実験室継代を繰り返した株においては、本領域における欠損や polyA の挿入が見られることが知られている。しかし病態発現機構における本領域の役割はまだ明らかにされていない。本研究における RNA 二次構造予測の結果、Oshima 株の 3'-UTR variable region 内には、6 つの stem loop (SL) 構造が存在することが分かった。このうち Sofjin 株では 2、3 及び 4 番目の SL 構造（SL2、SL3 及び SL4）を欠損している。病態発現機構における本領域の役割を調べるため、Oshima 株から SL2 及び SL3 を含む領域、或いは SL4 を含む領域をそれぞれ欠損させた変異ウイルスを作製した。また他の株に見られる polyA 配列と病原性との関連性を明らかにするため、Sofjin 株の variable region の欠損箇所に、35 塩基の polyA 配列を挿入した Oshima 株由来の変異ウイルスを作製した。これらのウイルスと Sofjin 株及び Oshima 株をマウスに皮下接種し、病原性の比較解析を行なった。その結果、今回導入した variable region の変異により、いずれのウイルスの病原性も Sofjin 株と同程度に上昇する事が示された。その一方でマウス脳内での増殖性は、Sofjin 株と比較して、Oshima 株及び変異ウイルスで有意に低く、変異導入により脳内でのウイルス増殖性は上昇しなかった。本研究結果から、3'-UTR variable region への変異導入により、脳内でのウイルス増殖性の影響が認められないにも関わらず、マウスにおける病原性が上昇する事が明らかとなった。また本領域内の特定の RNA 配列や二次構造ではなく、本領域全体が構成する RNA の高次構造が病原性の相違に大きく関与していることが予想される。

3'-UTR が関連する病態発現機構として、3'-UTR から産生され、宿主のインターフェロン系に影響し、病原性に関与することが他のフラビウイルスで報告されている subgenomic flavivirus RNA (sfRNA)に着目した。TBEV の病態発現における sfRNA の病原性への関与及び variable region の部分的欠損による影響を調べるため、TBEV に感染させた培養細胞及び感染マウス脳より抽出した RNA を用い、本領域の部分的欠損或いは polyA の挿入の有無と sfRNA の産生への影響を調べたところ、いずれのウイルスにおいても sfRNA の産生量や長さには相違はなく、病原性との関

連性は見られなかった。これに加えて、Sofjin 株、Oshima 株及び変異ウイルス間で、感染時の培養細胞におけるインターフェロン（IFN）-βの誘導と IFN 応答遺伝子群の発現状況をレポーターアッセイにより比較したが、これらの発現と病原性との間にも、関連性は見られなかった。

以上の本研究結果から、極東型 TBEV の株間の病原性の相違は、複数のウイルス側因子によって決定され、その中でも特に 3'-UTR variable region が重要であることが明らかとなった。さらに variable region 全体が構成する高次構造が、未知の病態発現メカニズムを介して病原性に関与することが示唆された。これらの成績は、今後 TBEV をはじめとするフラビウイルスの病態発現機構の解明と、ワクチン及び予防・治療法の開発に大きく貢献するものと期待される。