

**CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH
LABOLATORY OF VIRAL PATHOGENESIS**

1) A soluble envelope protein of endogenous retrovirus present in serum of domestic cats mediates infection of a pathogenic variant of feline leukemia virus: T. SHOJIMA, D. FUKUI, and T. MIYAZAWA

T-lymphotropic feline leukemia virus (FeLV-T), a highly pathogenic variant of FeLV, induces severe immunosuppression in cats. FeLV-T is fusion-defective because in its PHQ motif, a gammaretroviral consensus motif in the N-terminal of an envelope protein, histidine is replaced with aspartate. Infection by FeLV-T requires FeLIX, a truncated envelope protein encoded by an endogenous FeLV, for transactivation of infectivity and Pit1 for binding FeLIX. Although Pit1 is present in most tissues in cats, the expression of FeLIX is limited to certain cells in lymphoid organs. Therefore, the host cell range of FeLV-T was thought to be restricted to cells expressing FeLIX. However, because FeLIX is a soluble factor and expressed constitutively in lymphoid organs, we presumed it to be present in blood and evaluated its activities in sera of various mammalian species using a pseudotype assay. We demonstrated that cat serum has FeLIX activity at a functional level, suggesting that FeLIX is present in cats and FeLV-T may be able to infect cells expressing Pit1 regardless of the expression of FeLIX *in vivo*. In addition, FeLIX activities in sera were detected only in domestic cats and not in other feline species tested. In this study, we proved that a large amount of truncated envelope protein of endogenous retrovirus is circulating in the blood to facilitate the infection of a pathogenic exogenous retrovirus. Our results have important implications for overcoming species barriers and the risks of xenotransplantation.

2) Defective viral replication in human embryonic kidney-derived 293 cells chronically infected with porcine endogenous retrovirus: K. BABA, K. NAKAMURA, H. KOIZUMI, T. SHOJIMA, M. OKADA, R. NAKAMURA, M. ISHIKAWA, and T. MIYAZAWA

The pig is a good candidate for the source of organs for xenotransplantation. However, there is a safety issue that porcine endogenous retroviruses (PERVs) integrated in the genome could infect recipients, followed by the emergence of new infectious diseases in humans. Previously we found that human 293 cells chronically infected with subgroup A PERV (termed 293/PERV-A LTC) ceased the production of virions in culture supernatant after long-term culture (LTC). In this study, to elucidate the mechanism of PERV suppression in human cells, we analyzed the 293/PERV-A LTC cells. Production of the virus from the cells is suppressed gradually as the cells are serially passaged and becomes undetectable by pseudotype infection and reverse transcriptase activity assays.

However, PCR analysis revealed that the proviruses of PERV-A are abundant in the 293/PERV-A LTC that had ceased the viral production. In addition, when the cells were cocultured with uninfected 293 cells, virus production was dramatically restored. Real-time RT-PCR analysis revealed that the suppression of the viral production was at the post-transcriptional level; transcription of the viral RNA had not been suppressed in the 293/PERV-A LTC cells. Moreover, we detected the Gag precursor polyprotein in the 293/PERV-A before coculture at a comparable level to the cells after coculture. These results suggest that suppression of the PERV-A production from 293/PERV-A cells occurred at the posttranslational level. To further elucidate the mechanism of the suppression of viral production, we transfected expression plasmids of VSV-G (pCAG VSV-G) and Moloney MLV Gag-Pol (pgpIRES). By transfection with pCAG VSV-G and pgpIRES, the viral production was not restored in 293/PERV-A LTC cells. By cotransfection of pgpIRES with pCAG VSV-G, the titers of pseudotype virus reached to 7.0×10^8 and 8.0×10^6 IU/ml in 293 and 293/PERV-B cells, respectively. On the contrary, the titer of the pseudotype virus reached only to 1.9×10^3 IU/ml in 293/PERV-A LTC cells. In addition, by cotransfection of PERV-A Gag-Pol expression plasmid (pPAgIRES) with pCAG VSV-G, the titers of pseudotype virus reached to 2.3×10^3 and 2.0×10^4 IU/ml in 293 and 293/PERV-B cells, respectively. However, we could not detect any viral production in 293/PERV-A LTC cells by cotransfection of pPAgIRES with pCAG VSV-G. From these data, we conclude that PERV-A production is suppressed at a post-translation level in the 293/PERV-A LTC cells. This impairment may be due to the presence of PERV-A variant that suppresses wild-type PERV-A acting as a dominant negative mutant.

3) Expression of RD114 virus and its receptor in feline cell lines: potential risk of contamination of live attenuated vaccines by RD114 virus: M. OKADA, T. SHOJIMA, K. BABA, M. ISHIKAWA, and T. MIYAZAWA

RD114 virus is a replication-competent feline endogenous retrovirus, with a xenotropic host range. In this study, we examined the expression of RD114-like viruses and RD114 receptors in feline cell lines by conducting pseudotype virus infection assays. Six out of eight feline cell lines were sensitive to RD114 pseudotype virus, while two cell lines (MCC and FER cells) were resistant. The two resistant cell lines, and CRFK cells weakly sensitive to the RD114 pseudotype virus, produced replication-competent RD114-like viruses. The amino acid sequences of RD114-like viruses were identical to each other and similar to the fully characterized RD114 virus. Moreover, we found RD114 virus in a commercially produced feline live attenuated vaccine against feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus. Although it is unknown whether RD114 present in this vaccine adversely affects domestic cats, use of non RD114-producing cell lines to manufacture feline vaccines is clearly preferable, as is avoiding use of contaminated vaccine in non-*Felis* species (*i.e.* those not harboring endogenous RD114 virus in their genome).

LIST OF PUBLICATIONS

Center for Emerging Virus Research

Laboratory of Viral Pathogenesis

- Nakamitsu, S., Miyazawa, T., Horiuchi, M., Onoe, S., Ohoba, Y., Kitagawa, H., and Ishiguro, N. 2006. Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese black). *J. Vet. Med. Sci.* 68: 27-33.
- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., and Akashi, H. 2006. Junctional adhesion molecule-1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J. Virol.* 80: 4482-4490. (06/05).
- Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Nakagawa, T., Kondo, A., Matunami, K., Yamada, J., Miyazawa, T., and Shirakura, R. 2006. A novel strategy for preventing PERV transmission to human cells by remodeling the viral envelope glycoprotein. *Xenotransplantation.* 13: 258-263. (06/05)
- Shojima, T., Nakata, R., and Miyazawa, T. 2006. Host cell range of T-lymphotropic feline leukemia virus in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 1466-1470.
- Sassa, Y., Fukui, D., Takeshi, K., and Miyazawa, T. 2006. Neutralizing antibodies against feline parvoviruses in nondomestic felids inoculated with commercial inactivated polyvalent vaccines. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 1195-1198.

【学会発表等】

- 宮沢孝幸 FIV の病理発生機構の新知見 第 141 回日本獣医学会 (つくば) (2006 年 3 月 21 日)
- 岡田雅也、宮沢孝幸 Functional receptors for RD114 are expressed in feline cell lines. 日本レトロウイルス研究会夏季セミナー2006 (2006 年 7 月 28 日)
- 西村順裕、下島昌幸、遠矢幸伸、明石博臣、宮沢孝幸 ネコ末梢血における CD16 分子の発現 第 142 回日本獣医学会学術集会 (山口) (2006 年 9 月 23 日)
- Miyazawa, T. Fukui, D., and Shojima, T. A soluble envelope protein of endogenous retrovirus present in serum of domestic cats mediates infection of a pathogenic variant of feline leukemia virus. 8th International Feline Retrovirus Research Symposium. (2006 年 10 月 11 日)

附属新興ウイルス感染症研究センターは 2005 年 4 月に発足し、3つの研究チーム（複製基盤解析、病態解明、宿主要因解析）からなっている。病態解明チームは、2005 年 12 月に宮沢孝幸が帯広畜産大学畜産学部獣医学科応用獣医学講座より特別教育研究助教授として着任し、スタートした。2006 年 1 月には研究補助員として田中理加子が、2006 年 4 月には、帯広畜産大学畜産学部獣医学科から医学研究科大学院生（博士課程）として庄嶋貴之が、佐賀大学農学部生物生産学科から人間・環境学研究科大学院生（修士課程）として石川恵美子が、当研究チームに加わった。2006 年 6 月にはポスドクとして馬場健司が東京大学大学院農学生命科学研究科から加わり、宮沢も入れて 5 名の構成員となった。

現在の研究テーマとしては昨年度に引き続き以下の 2 つをメインにしている。1) 異種移植、特にブタからヒトへの異種間細胞移植ならびに異種間臓器移植の実現を目指し、その際に問題になるウイルス感染症（ブタ内在性レトロウイルス）のモニタリング系の確立と制御を行う。2) 動物由来レトロウイルスの感染増殖機構を解明する。また、3) 生物学的製剤中の内在性レトロウイルスの混入問題についても研究を行っている。

1) ブタ内在性レトロウイルスのモニタリング系の確立と制御

ヒトおよび類人猿と旧世界ザルでは、進化の過程で約 3,000 万年前に糖鎖を合成する酵素の一つである α -1,3 ガラクトース転移酵素 (α -1,3GT) の遺伝子が不活化された。そのため、人は α -ガラクトース (α -Gal) 抗原をもたず、外来抗原として認識し、自然界に存在する α -Gal 抗原の暴露により、抗 α -Gal 抗体が大量に誘導されている。この抗体は他の動物由来のエンベロープウイルスの感染防御に役に立っている。すなわち、他の動物の細胞で増殖したエンベロープウイルスは、エンベロープに α -Gal 抗原をもち、ヒトがこのウイルスに暴露されたとしても、抗 α -Gal 抗体と補体により速やかにウイルスが中和され、感染は成立しにくい。

現在、臓器移植のための臓器不足の解消や、新しい細胞移植治療法の開発に向けて、ブタの臓器や細胞を異種間移植する方法が研究されている。ブタの細胞は α -Gal 抗原を大量に発現しているため、ヒトの抗 α -Gal 抗体と補体を介する超急性拒絶反応が起こるが、これを抑えるために補体制御遺伝子や糖転移酵素遺伝子を導入したブタ、さらには α -1,3GT そのものをノックアウトしたブタなどが開発されている。しかしそのような手法は、抗 α -Gal 抗体を介したウイルスに対する自然抵抗性を減弱させてしまう。そのため、これらの遺伝子改変ブタからのウイルスが患者に感染し、さらには人社会に広まる危険性がある。

ヒトに感染する可能性があるブタのウイルスのうち、最大の問題はブタ内在性レトロウイルス (PERV) である。内在性レトロウイルスは生まれつきすべての体細胞のゲノムに存在するため、ブタから取り除くことは現時点では不可能である。1996 年にヒトの細胞に感染する PERV が 2 種類 (PERV-A、PERV-B) 発見された (A と B はそれぞれ異なる受容体を認識する)。PERV はヒトの細胞で増殖はするが、一般にその増殖力は弱い。しかし、わずかな変異によりヒトに馴化したウイルスが生じたり、ヒトの内在性レトロウイルスと組換わることで、より増殖性の高いウイルスが出現する可能性もある。ブタを用いた異種間臓器移植の実用化には PERV 制御と感染動物モデル作出が必要不可欠の課題となっている。

PERVはブタでは病原性をもたないとされるが、突然変異や組換えにより、病原性を発現する可能性がある。そして、その感染は移植患者だけではなく、社会全体にも広がることも危惧される。そこで、交配によりPERVが産生されないブタの系を確立したり、ロックアウト技術によりPERVゲノムを破壊したり、トランスジェニック技術によるPERV産生抑制法などの取り組みが必要である。現在我々は様々なウイルス学的手法を用いて、PERVの産生抑制法の開発を試みている。本年度は、大腸菌由来のRNaseHをPERV-Aのヌクレオカプシドと融合させた蛋白を発現させることで、PERVの感染・増殖抑制を試み、感染価を約70%減弱させることに成功した。今後、この方法を改良・応用することで、PERVの産生を抑えたブタが作出出来ると考えている。また現在、HEK293細胞におけるPERV-Aの産生抑制メカニズムを研究している。PERV-Aはヒト細胞に感染するものの、ほとんど増殖しない。HEK293細胞においてもわずかに増殖するものの、ウイルス産生は一過性であり、やがて産生は抑制される。ウイルス産生が認められなくなったPERV-A持続感染HEK293細胞(293/PERV-A LTC細胞)におけるGag蛋白のプロセッシングをイムノブロット法により評価した。さらに水疱性口炎ウイルスG蛋白発現プラスミド、Moloney mouse leukemia virusのGag-Pol発現プラスミドおよびPERV-AのGag-Pol発現プラスミドを293/PERV-A LTC細胞にtransfectし、LacZシールドタイプアッセイを用いてウイルス粒子の放出を検討した。その結果、293/PERV-A LTC細胞ではウイルスのライフサイクルの後期過程、特にassemblyからbuddingまでの間が阻害されていることが明らかとなった。

2) 動物由来レトロウイルスの感染増殖機構の解明

非霊長類動物由来のレトロウイルス（レンチウイルス属、ガンマレトロウイルス属、スプーマウイルス属）のエントリーレセプターと細胞内宿主因子の解明を行っている。

レンチウイルス属に分類されるウイルスには、霊長類レンチウイルス、有蹄類レンチウイルスおよびネコ免疫不全ウイルス（FIV）がある。霊長類レンチウイルスは、CD4分子をプライマリーレセプターに、CXCR4などのケモカインレセプターをコレセプターに使用している。近年、FIVのレセプター分子がクローニングされ、プライマリーレセプターにCD134分子を、コレセプターにCXCR4分子を使用することがわかった。CD134は、活性化CD4陽性細胞に発現する副刺激分子であり、FIVはHIVの標的細胞とほぼ同様の細胞群に感染する。またFIVの野外分離株は、ヒトCXCR4を使用するが、ヒトCD134は使用できず、FIVの宿主特異性をレセプターレベルで規定しているのは、プライマリーレセプターであることがわかった。さらに、FIVの一部の実験室株は、CXCR4のみを介してCD134非依存的にヒト細胞に感染することが可能である。霊長類レンチウイルスも一部の株はCD4非依存的にケモカインレセプターのみを介して感染することから、自然界では宿主の壁を飛び越えて感染する場合、プライマリーレセプター非依存の変異株が主役である可能性が考えられる。FIVに遺伝的に近縁なウイルスは、ライオンやピューマにも存在しており、それぞれFIV_{Ple}、FIV_{Pco}と命名されている（家ネコのFIVはこれと区別するためにFIV_{Fca}とも呼ばれる。）。FIV_{Fca}のメインレセプターとしてCD134がクローニングされた当初、FIV_{Ple}やFIV_{Pco}のプライマリーレセプターもCD134であると予想されたが、その後の研究によりこれらのメインレセプターは、CD134でない可能性が高いことがわかった。FIV_{Ple}やFIV_{Pco}のレセプターや宿主抵抗性因子を解析することにより、霊長類由来レンチウイルスの研究だけではみえてこなかった宿主特異性決定機構やAIDSの病原性発現機構の解明につながると我々は考え、

研究を行っている。また、HIV 脳症のモデルとして、ネコのグリア細胞への FIV の感染メカニズムを研究している。

最近、一部の前立腺ガン患者において、マウスのガンマレトロウイルスであるマウス白血病ウイルス (MLV) が感染していることが明らかとなった。また、異種間臓器移植で問題になっている PERV は、ガンマレトロウイルス属に分類される。近年、MLV の感染メカニズムに関して、cognate レセプター非依存性の感染経路があることが報告された。さらに、感染後速やかに (数ヶ月以内)、ネコに AIDS を誘導するネコ白血病ウイルスの変異体が存在する。この変異体 (FeLV-T と命名されている) の感染には、内在性レトロウイルスの truncate した形のエンベロープ蛋白 (FeLIX 蛋白と呼ばれている) が必要であり、cognate レセプター非依存性であることがわかった。PERV の感染においても、ギボンザル白血病ウイルスのエンベロープ蛋白により、cognate レセプター非依存的に感染することが報告されている。現在、この cognate レセプター非依存的な感染メカニズムを解明するとともに、体内で発現している内在性レトロウイルスの蛋白が外来性レトロウイルスの感染・増殖に及ぼす影響を調べている。

3) ネコ由来株化細胞における RD114 ウイルスの産生およびその受容体の発現: ネコ用 3 種混合ワクチンへの内在性レトロウイルスの混入

RD114 ウイルスは感染・増殖可能なネコ内在性レトロウイルスの 1 つであり、ネコ属のみ存在する。RD114 ウイルスの受容体は、Na⁺依存性中性アミノ酸トランスポーターであり、RD114 ウイルスはヒト内在性レトロウイルスやタイプ D サルレトロウイルスなどと同じ受容体干渉グループに属する。本研究で我々は、ネコ由来株化細胞における RD114 ウイルスの産生とその受容体の発現を調べた。その結果、これまで RD114 ウイルスは異種指向性とされてきたが、複数のネコ由来株化細胞に効率良く感染することがわかった。また、RD114 ウイルスが感染しないネコ由来株化細胞からは、感染・増殖可能な RD114 ウイルスが産生されていた。これらの結果から、RD114 ウイルスは多指向性であることがわかった。ネコ用 3 種混合生ワクチンの弱毒ウイルス株は、ネコ由来株化細胞を用いて製造されているので、もしその細胞から RD114 ウイルスが産生されているのならば、ワクチンに RD114 ウイルスが混入している可能性がある。市販の 4 種類の 3 種混合生ワクチンを調べた結果、1 種類に RD114 ウイルスが実際に混入していることがわかった。ライオンやピューマなどのネコ属以外のネコ科動物は RD114 を内在性レトロウイルスとしてもっていないので、これらの展示ネコ科動物に 3 種混合生ワクチンを接種することは避けるべきであると考えられた。また、ネコが RD114 ウイルスの機能的受容体をもっていることが明らかとなったことから、今後、RD114 ウイルスの活性化が白血病などの増殖性疾患を引き起こすか否かを調べる必要があると考えられた。