

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

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

Porcine has been a good candidate for the source of organs for xenotransplantation. However, there is a risk that porcine endogenous retrovirus (PERV) integrated in the genome could infect recipients followed by emergence of new infectious diseases. Therefore, it is a serious issue to control PERV infection and replication in humans. In this study, we analyzed the mechanisms of impaired replication of PERV in 293 cells chronically infected with PERV-A, in which viral production was not observed after long-term culture (293/PERV-A LTC cells). The processing of Gag protein in 293/PERV-A LTC cells was analyzed by immunoblot analyses. Moreover, the cells were transfected with following plasmids: vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) expression plasmid (pCAG VSV-G), Moloney mouse leukemia virus gag-pol expression plasmid (pMogpIRES) and PERV-A gag-pol expression plasmid (pPAgpIRES). The release of infectious virions was assessed by LacZ pseudotype virus assay. Capsid protein was not detected in 293/PERV-A LTC cells although Gag precursor protein was detected in the cells. This result indicated the impaired processing of Gag protein in 293/PERV-A LTC cells. No viral release was observed when 293/PERV-A LTC cells were transfected with pMogpIRES or pPAgpIRES. When 293/PERV-A LTC cells were co-transfected with pCAG VSV-G and pMogpIRES, the viral release was observed whereas the infectious titer was obviously lower than that in 293 cells transfected with same plasmids. In contrast, no viral release was observed when 293/PERV-A LTC cells were co-transfected with pCAG VSV-G and pPAgpIRES. These results suggested that the process of viral release was also hindered in 293/PERV-A LTC cells.

2) Rapid quantitative assay for T-lymphotropic feline immunodeficiency virus in a feline astrocyte-derived cell line (G355-5 cells) expressing feline CD134: M. ISHIKAWA, M. OKADA, K. BABA, T. SHOJIMA, M. SHIMOJIMA, T. MIURA and T. MIYAZAWA

Few laboratory strains of feline immunodeficiency virus (FIV) can infect Crandell feline kidney cells (an epithelial-type of cells), however, most primary isolates are T-lymphotropic. T-lymphotropic FIV requires both feline CD134 (an activation marker of helper T-lymphocytes) and CXCR4 (a chemokine receptor) in infection as primary and secondary receptors, respectively. In this study, by using G355-5 cells (a feline astrocyte-derived cell line) transduced with a cDNA of feline CD134 as target cells, we developed an assay to quantify T-lymphotropic FIV strains. With

a previous method using a feline T-lymphoblastoid cell line (MYA-1 cells) highly sensitive to FIV, it took 12 days to complete the assay, however, it took only three days with the new method.

3) Establishment of a sensitive detection method for infectious RD114 virus: M. OKADA, S. SAKAGUCHI, T. SHOJIMA, K. BABA and T. MIYAZAWA

We established an assay system to detect infectious RD114 virus. Among four human cell lines examined, TE671 cells (human rhabdomyosarcoma) were most sensitive to RD114 virus. Infection was enhanced approximately 5 times by addition of polybrene® at concentrations of 2 to 8 µg/ml in the medium during viral adsorption. Ten-fold serially diluted RD114 viruses were inoculated onto TE671 cells transduced with LacZ gene, then the production of RD114 virus was determined by a LacZ marker rescue assay. We detected the endpoint dilution at 12 days post inoculation and the marker rescue assay was as sensitive as polymerase chain reaction test. Based on the results, we proposed a standard protocol to detect infectious RD114 virus.

4) Molecular cloning of a cDNA encoding the feline CD62L: Y. NISHIMURA, M. SHIMOJIMA, Y. TOHYA, and T. MIYAZAWA

We cloned a cDNA fragment encoding a feline homologue of L-selectin (CD62L). The extracellular region of the feline CD62L fragment contained a calcium-dependent (C-type) lectin domain, an epidermal growth factor-like domain, and two Sushi/CCP/SCR domains. The flow cytometric analysis confirmed that the feline CD62L molecule, which was expressed 293T cells, retained an epitope recognized by an anti-human CD62L monoclonal antibody (Leu-8).

LIST OF PUBLICATIONS

Center for Emerging Virus Research

Laboratory of Viral Pathogenesis

Nishimura, Y., Shimojima, M., Tohya, Y., and Miyazawa, T. 2007. Molecular cloning of a cDNA encoding the feline CD62L. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 81-84.

宮沢孝幸、岡田雅也、馬場健司 2007. 内在性レトロウイルスとワクチン *JVM 獣医畜産新報* **60**: 722-730.

宮沢孝幸 2007. 動物のレトロウイルス:新しいレトロウイルスはヒトにやってくるのか *化学療法の領域* **23**: 1629-1634.

岡田雅也、庄嶋貴之、馬場健司、石川美恵子、宮沢孝幸 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（つくば市）第 143 回日本獣医学会学術集会（2007 年 4 月 3 日）

石川美恵子、岡田雅也、馬場健司、庄嶋貴之 ネコ免疫不全ウイルス（FIV）分離用付着系細胞の樹立（つくば市）第 143 回日本獣医学会学術集会（2007 年 4 月 3 日）

馬場健司、中村一哉、小泉響、庄嶋貴之、岡田雅也、中村理加、石川美恵子、宮沢孝幸 ウイルス産生が認められなくなったブタ内在性レトロウイルス持続感染ヒト由来細胞株におけるウイルス複製に関する解析（つくば市）第 143 回日本獣医学会学術集会（2007 年 4 月 3 日）

馬場健司、庄嶋貴之、岡田雅也、石川美恵子、中村仁美、宮沢孝幸 ウシ内在性レトロウイルスエンベロープ遺伝子の探索と胎盤における発現（江別市）第 144 回日本獣医学会学術集会（2007 年 9 月 2 日）

宮沢孝幸、中村仁美、庄嶋貴之、馬場健司、浜夏樹 コアラレトロウイルスの分離法の確立（江別市）第 144 回日本獣医学会学術集会（2007 年 9 月 2 日）

中村仁美、浜夏樹、庄嶋貴之、馬場健司、宮沢孝幸 日本のコアラにおけるコアラレトロウイルスの検出系の確立と系統解析（江別市）第 144 回日本獣医学会学術集会（2007 年 9 月 2 日）

庄嶋貴之、中村仁美、馬場健司、浜夏樹、宮沢孝幸 コアラレトロウイルスの宿主細胞域の評価（江別市）第 144 回日本獣医学会学術集会（2007 年 9 月 2 日）

石川美恵子、馬場健司、庄嶋貴之、岡田雅也、宮沢孝幸 G355-5 細胞に持続感染したネコ免疫不全ウイルス（FIV）リンパ球指向性分離株の性状解析（江別市）第 144 回日本獣医学会学術集会（2007 年 9 月 2 日）

岡田雅也、庄嶋貴之、馬場健司、石川美恵子、宮沢孝幸 ネコ用 3 種混合ワクチンにおける RD114 ウイルスの迷入（江別市）第 144 回日本獣医学会学術集会（2007 年 9 月 2 日）

宮沢孝幸、庄嶋貴之、中村仁美、馬場健司 国内飼育コアラからのコアラレトロウイルスの分離（札幌市）第 55 回日本ウイルス学会学術集会（2007 年 10 月 22 日）

岡田雅也、庄嶋貴之、馬場健司、石川美恵子、宮沢孝幸 動物用生物学的製剤への RD114 ウイルスの迷入の可能性（札幌市）第 55 回日本ウイルス学会学術集会（2007 年 10 月 22 日）

宮沢孝幸、岡田雅也 ネコ用生ワクチンにおける内在性レトロウイルスの存在（横浜市）第 11 回日本ワクチン学会学術集会（2007 年 12 月 9 日）

Miyazawa, T.: Endogenous retroviruses detected in biological materials for animals. National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kokubunji-city, Tokyo, 2007.

Miyazawa, T.: Xenotransplantation and porcine endogenous retroviruses. Medical Engineering Seminar, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, 2007.

Baba, K., Nakamura, K., Koizumi, H., Shojima, T., Okada, M., Nakamura, R., Ishikawa, M. and

Miyazawa, T. Defective viral replication in human embryonic kidney-derived 293 cells chronically infected with porcine endogenous retrovirus. The 21st Century COE Program. Fifth International Student Seminar. Kyoto, 2007.

附属新興ウイルス感染症研究センター、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所教授として着任し、スタートした。当研究室は、ポスドクとして馬場健司が、医学研究科大学院生（博士課程）として庄嶋貴之、岡田雅也が、人間・環境学研究科大学院生（修士課程）として石川美恵子、中村仁美が在籍している。また、研究室の立ち上げ時から研究ならびに事務の補佐でお世話になった蚊野（田中）理加が京都大学医学部に転出し、かわりに12月より正玄裕子が研究補佐員として研究室に加わった。

我々は現在、異種間臓器移植や再生医療などの新たな医療や、生ワクチンなどの生物学的製剤の製造の際に問題となる動物由来内在性レトロウイルスの研究を主に行っている。また、ヒトに感染し前立腺ガンを引き起こすとされるマウス白血病ウイルス関連ウイルスや、この100年ほどにコアラに蔓延して内在化したと考えられているコアラレトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルスのワクチン開発モデルとして有効なネコ免疫不全ウイルスについての研究も行っている。

（1）ブタ内在性レトロウイルス（PERV）

臓器移植や細胞移植用の臓器不足を解消するために、ブタの臓器や細胞をヒトに移植するという、いわゆる異種移植が行われようとしている。現在日本を始め、アメリカやヨーロッパを中心にして異種移植用のブタの開発が行われている。異種移植の際大きな問題になっているのがPERVである。PERVには受容体を異にする3つのサブグループ（A、BおよびC）が存在する。ヒトではPERV-Aの受容体が2種類（HuPAR-1およびHuPAR-2）存在することが明らかになっている。HuPAR-1分子は、末梢血リンパ球や様々なヒト由来株化細胞で広く発現しているが、HuPAR-2分子は主にヒトの胎盤で発現している。PERV-Aの受容体分子の利用効率を調べたところ、株によってその利用効率は異なるものの、HuPAR-2分子をより効率よく利用することが分かった。HuPAR-2のヒト胎盤での発現を調べたところ、栄養膜細胞層や栄養膜合体層において特異的に発現していた。また現在、PERV-Bの受容体遺伝子のクローニングを試みている。まずPERV-BのEnv蛋白をバキュロウイルス発現系で発現させて、精製を行った。Env蛋白の細胞結合試験から、ミンク由来のMv1-Lu細胞がもっともEnv蛋白の結合能力が高いことがわかった。来年度は、ミンクとヒトのPERV-B感受性細胞から発現レトロウイルスcDNAライブラリーを作成し、パンニング法を応用して受容体分子のcDNAをクローニングする予定である。

（2）コアラレトロウイルス（KoRV）

KoRVはわずか100年という短期間にオーストラリア北部のコアラに蔓延し、生殖細胞に感染、内在化した。そこでKoRVはレトロウイルスの内在化機構を調べる格好のモデルにな

ると考えられている。また、KoRV はコアラに免疫抑制を引き起こしており、内在性レトロウイルスが他の宿主に感染した場合の病原性発現機構の解明にも良いモデルになると考えられる。我々は神戸市立王子動物園ならびに大阪府立天王寺動物園のコアラの KoRV 感染状況を調査するとともに、ウイルスを分離し、その性状解析を行った。神戸市立動物園飼育のコアラ 6 頭から KoRV のウイルス分離に成功した。うち胸水貯留を呈する個体から分離された KoRV の Env 領域を解析したところ、現在までに報告されている KoRV に近縁なもの以外に、受容体結合部位が大きく異なる KoRV を 3 種類（全部で 4 種類）同定し、サブグループ A、B、C および D と命名した。うち 2 種類（A および B）はヒト由来細胞に感染し、1 種類（A）はギボン白血病ウイルスやネコ白血病ウイルスサブグループ B と同じ受容体 (Pit-1 分子) を使用していることが明らかとなった。現在、この 4 種類のウイルスのシュードタイプウイルスを作製し、宿主域を様々な動物種由来の細胞で調べている。来年度はヒト細胞に効率よく感染するサブグループ B の受容体クローニングを行う。また全国で飼育されているコアラ全頭について、サブタイプ別にウイルスの感染状況を調査し、どのサブグループが内在化しているか、免疫抑制に関与しているかを調べる予定である。

（3）ウシ内在性レトロウイルス (BERV)

最近ウシの全ゲノムデータが公開された。ウシゲノムのデータベースの検索により、 β レトロウイルスに属する 2 種類の BERV の *env* 遺伝子を同定し、これらの遺伝子をクローニングした。胎盤および栄養膜細胞由来株化細胞において、これらの *env* 遺伝子の完全長 mRNA および ORF 内でスプライシングされた mRNA の発現が認められた。*env* ORF および 3' LTR を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入することにより、エンベロープ蛋白およびアクセサリー蛋白の発現が確認された。またこの アクセサリー蛋白は、細胞内において核に局在することが示された。来年度は、BERV Env 蛋白の胎盤における発現状況を調べ、受容体遺伝子をクローニングする予定である。

（4）異種指向性マウスレトロウイルス関連レトロウイルス (XMRV)

XMRV がヒトに感染し、前立腺ガンを引き起こしていることが最近報告された。日本における XMRV の感染状況を把握するために、日本赤十字社、西脇市立西脇病院などと共同で XMRV の感染調査を行うこととした。第一段階として我々は、XMRV の検出系を確立することとした。異種指向性マウスレトロウイルスのエンベロープ蛋白をバキュロウイルス発現系で発現させ、抗体検出用の抗原とした。また nested PCR 法による XMRV 検出系を確立した。来年度は、前立腺ガンの患者血液由来 DNA から XMRV の検出を行うとともに、XMRV 抗体陽性の血液献体からウイルス分離を試みる予定である。

（5）ネコ内在性レトロウイルス

我々はネコ内在性レトロウイルスである RD114 ウイルスをネコの三種混合生ワクチンから検出した。ワクチン製造でのシードロットシステム導入において、内在性レトロウイルス

スの問題は大きな障害となっている。現在、農林水産省動物医薬品検査所およびワクチン会社と連絡を取り合い、RD114 ウイルス迷入問題への対応を協議している。RD114 ウイルスの検査方法の最適化を行い、ワクチン検査用の標準プロトコールを作成した。さらに、動物医薬品検査所から研究員を当センターに受け入れ、検査の再現試験、検査方法の講習を行った。今後は、動物医薬品検査所、ワクチンメーカーの協力の下、RD114 ウイルスの動物感染実験を行い、感染性や病原性を調べる。また、ネコ以外の動物用ワクチンにおいても RD114 ウイルスの迷入試験を行う予定である。

(6) ネコ免疫不全ウイルス (FIV)

FIV には様々なサブタイプ (A~E) が存在する。近年、一部のサブタイプ (A および D) をもとにしたワクチンが開発されアメリカ等で販売されているが、その効果は不完全であり、ワクチン接種ネコでも FIV 感染の検査をする必要がある。しかし、抗体を検出する現行の検査法ではワクチン接種ネコで FIV 感染を判定することはできない。そこでこの検査法に代わる、ウイルス分離法による FIV 感染の診断が求められている。ネコ星状細胞腫由来 G355-5 細胞にネコ CD134 (fCD134) を発現させ、リンパ球指向性分離株である FIV TM2 株 (サブタイプ B) が同細胞 (G355-5/FOX40 細胞) に効率よく感染することを明らかにした。さらに樹立した細胞を用いて新規 FIV 感染価測定法を開発した。また、G355-5/FOX40 細胞に持続感染した TM2 株 (TM2PI 株と命名) の性状解析を行い、親株である TM2 株の性状とは異なり、TM2 PI 株が fCD134 非依存的に感染可能であるということを証明した。この研究において分離された TM2 PI 株は様々な細胞に感染することが期待され、サブタイプ B に対するワクチンの製造に寄与すると考えられた。