

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

**1) Potential risk of endogenous retrovirus infection by vaccines for companion animals:
R. YOSHIKAWA, M. OKADA, T. SHOJIMA and T. MIYAZAWA**

All cats have RD114 virus that is a replication-competent endogenous retrovirus in their genome. The RD114 virus is a recombinant comprising a *gag-pol* gene from a gammaretrovirus and an *env* gene from a betaretrovirus. RD114 virus can infect several feline cell lines as well as cells from various mammalian species including dogs. Several feline cell lines produce RD114 virus and these cells are used for manufacturing live vaccines for companion animals. Therefore, RD114 virus could be contaminated in the live vaccines. Recently, we established three methods to detect RD114 virus, *i.e.*, PCR test, LacZ marker rescue assay and focus assay. In this study, we examined the presence of RD114 virus in live attenuated vaccines for companion animals. Commercial live vaccines were inoculated into TE671 cells derived from human rhabdomyosarcoma. Then, the RD114 virus was detected by PCR test and LacZ marker rescue assay. In addition, three dogs were inoculated three times with a contaminated canine vaccine and we examined the presence of RD114 provirus in various tissues by the nested PCR test. As a result, one feline and one canine live vaccines were contaminated with RD114 viruses. The amounts of RD114 viruses in the vaccines for cats and dogs were 1.8 and 1,800 50% tissue culture infective dose, respectively. So far, we have not obtained any evidence that the RD114 provirus was present in the vaccine recipients. The infectivity and pathogenesis of RD114 virus in cats and dogs are still open question. The *in vivo* infection experiment of RD114 virus in dogs is currently underway to elucidate these issues.

**2) Identification and characterizaiton of novel subtypes of koala retrovirus: T.
SHOJIMA, T. OHATA, K. BABA and T. MIYAZAWA**

Koala retrovirus (KoRV) is an endogenizing gammaretrovirus in koalas in northern Australia. Studies on KoRV will be useful for elucidating the process of endogenization of gammaretroviruses in mammals. KoRV induces immunosuppression and leukemia in koalas. KoRV/koalas is an ideal model for studying the pathogenesis when an exogenous gammaretrovirus or endogenous type I retrovirus infects a new species. We conducted a survey of KoRV infection in koalas in Japanese zoos and succeeded in isolating KoRVs. We identified 4 genotypes whose receptor binding sites are different with each other and named as subgroups A, B, C and D, respectively. By using pseudotype viruses harboring these subgroups, we found that two subgroups (A and B) infect human cell lines. Subgroup A psudotype virus shares the receptor with gibbon ape leukemia virus and feline leukemia virus subgroup B and utilizes human Pit-1 molecule as a viral

entry receptor. All koalas which are positive for KoRV provirus had KoRV-A in common and many koalas harbor additional subgroups. The long terminal repeat (LTR) of KoRV-B has three tandem repeats in enhancer region. The promoter activity of LTR of KoRV-B was stronger than that of KoRV-A LTR in HEK293 cells.

3) Receptor switching of feline immunodeficiency virus in a feline astrocyte cell line: M. ISHIKAWA, K. BABA and T. MIYAZAWA

Feline immunodeficiency virus (FIV) induces acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats. A feline cell line derived from astrocytoma, termed G355-5 cells, becomes susceptible to various lymphotropic strains (for example strain TM2) of FIV by expressing feline CD134 (fCD134) (another common name is feline OX40 (fOX40)). In this study we analyzed a receptor switching mechanism in the G355-5/fOX40 cells. We prepared a viral stock from G355-5/fOX40 cells persistently infected with strain TM2, and designated as strain TM2PI. Then the stock virus was inoculated into G355-5, CRFK (an epithelial-type cell line derived from feline kidney), 3201 (feline thymic lymphoma) and FeTJ (feline T lymphocytes) cells and examined the infectivity of the strain TM2PI in these cells. The strain TM2PI infected and replicated well in fCD134-negative G355-5 cells and the cells released virions into culture supernatants. In addition, the strain TM2PI infected fCD134-negative CRFK, 3201, and FeTJ cells; however it did not replicate well in these cells. By sequencing analysis of the *env* region, we identified two specific mutations at Env amino acid positions 357 (W to R) and 407 (E to K). The infection of TM2PI was blocked by addition of AMD3100, indicating that TM2PI infected these cells by using CXCR4 molecule as an entry receptor. These results also suggest that additional mutation(s) is required for productive infection in CRFK, 3201 and FeTJ cells.

4) Unusual physical instability of porcine endogenous retrovirus subgroup A: Y. NAKAYA, T. SHOJIMA and T. MIYAZAWA

Infection with porcine endogenous retroviruses (PERVs) is one of the risk factors in xenotransplantation from pigs to humans. In this study, we found that a pseudotype virus harboring envelope (Env) from PERV subgroup A (PERV-A), termed (*LacZ*(PERV-A)), which have filtrated through a disc filter of 200 nm in pore size had lost the ability to infect susceptible human cells. This unusual character was not observed in other pseudotype viruses harboring Env from feline leukemia virus subgroup B and amphotropic murine leukemia virus. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis revealed that the *LacZ*(PERV-A) can be passed through the 200 nm filter. Additionally, infectivity of *LacZ*(PERV-A) was also significantly decreased by repeats (twice) of freeze/thaw treatment and incubation at 42 °C for 3 hours. These

data suggest that PERV-A Env is physically labile.

LIST OF PUBLICATIONS

Center for Emerging Virus Research

Laboratory of Viral Pathogenesis

- Ishikawa, M., Okada, M., Baba, K., Shojima, T., Shimojima, M., Miura, T., and Miyazawa, T. 2008. Establishment of a felineastrocyte-derived cell line (G355-5 cells) expressing feline CD134 and a rapid quantitative assay for T-lymphotropic feline immunodeficiency viruses. *J. Virol. Methods* 151: 242-248.
- Sakaguchi, S., Okada, M., Shojima, T., Baba, K. and Miyazawa, T. 2008. Establishment of a LacZ marker rescue assay to detect infectious RD114 virus. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 785-790.
- Sakaguchi, S., Baba, K., Ishikawa, M., Yoshikawa, R., Shojima, T., and Miyazawa, T. 2008. Focus assay on RD114 virus in QN10S cells. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 1283-1286.
- 宮沢孝幸 2008 ネコレトロウイルス研究の進展状況 *Small Animal Clinic* 154: 18-27.
-

- 宮沢孝幸 異種移植における内在性レトロウイルスのリスク評価 第 11 回日本異種移植研究会 (大阪) (招待講演) (平成 20 年 2 月 23 日)
- 庄嶋貴之、馬場健司、浜夏樹、宮沢孝幸 コアラレトロウイルスの新しいサブタイプとその性状 第 145 回日本獣医学会 (神奈川) (2008 年 3 月 29 日)
- 石川美恵子、馬場健司、庄嶋貴之、岡田雅也、宮沢孝幸 ネコアストロサイト (G355-5 細胞) に持続感染した FIV リンパ球指向性分離株の性状解析 第 6 回沖縄感染症フォーラム (沖縄) (2008 年 2 月 14 日)
- 宮沢孝幸、庄嶋貴之、馬場健司、坂口翔一、浜夏樹 コアラレトロウイルスの生態学 第 6 回沖縄感染症フォーラム (沖縄) (2008 年 2 月 15 日)
- 宮沢孝幸 コアラレトロウイルス: 先行調査結果と今後の調査について 第 25 回種保存委員会コアラ種別繁殖検討委員会拡大会議、社団法人日本物園水族館協会、天王寺動物園 (大阪) (招待講演) (2008 年 7 月 9 日)
- Miyazawa, T., Sakaguchi, S., Okada, M., Shojima, T., and Baba, K.: Potential risks of contamination of biological materials by endogenous retroviruses. 9th International Feline Retrovirus Research Symposium, Vienna, Austria. (24-27 August 2008)
- Ishikawa, M., Baba, K., Shojima, T., Shimojima, M., and Miyazawa, T.: A rapid quantitative assay for T-lymphotropic feline immunodeficiency viruses using G355-5 cells expressing feline CD134. 9th International Feline Retrovirus Research Symposium, Vienna, Austria. (24-27 August 24-27 2008)
- 庄嶋貴之、馬場健司、大畑拓司、浜夏樹、宮沢孝幸 コアラレトロウイルスの検出系確立と病原性解明の疫学のおよび分子生物学的アプローチ 第 14 回日本野生動物医学会

学術集会（兵庫）（2008 年 9 月 6 日）

宮沢孝幸 生物学的製剤中の内在性レトロウイルスの迷入とそのリスク 日本レトロウイルス研究会夏季セミナー（静岡）（2008 年 9 月 5 日）

坂口翔一、岡田雅也、庄嶋貴之、馬場健司、石川美恵子、吉川禄助、宮沢孝幸 感染性ネコ内在性（RD114 ウイルス）検出系の確立 第 146 回日本獣医学会学術集会（宮崎）（2008 年 9 月 24 日）

庄嶋貴之、馬場健司、大畑拓司、浜夏樹、宮沢孝幸 コアラ内在性レトロウイルスサブタイプ B の末端反復配列（LTR）の機能解析 第 146 回日本獣医学会学術集会（宮崎）（2008 年 9 月 24 日）

石川美恵子、馬場健司、庄嶋貴之、下島昌幸、三浦智行、宮沢孝幸 グリア細胞におけるネコ免疫不全ウイルスの受容体スイッチング 第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山）（2008 年 10 月 26 日）

古田里佳、宮沢孝幸、杉山武毅、木村貴文 献血者ならびに前立腺がん患者における新規ヒトレトロウイルス XMRV に対する血清学的解析 第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山）（2008 年 10 月 27 日）

庄嶋貴之、馬場健司、宮沢孝幸 コアラレトロウイルスの多様性と病原性サブタイプの探索 第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山）（2008 年 10 月 27 日）

馬場健司、庄嶋貴之、石川美恵子、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同定と性状解析 第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山）（2008 年 10 月 27 日）

坂口翔一、石川美恵子、庄嶋貴之、馬場健司、宮沢孝幸 動物用生物学的製剤中の感染性ネコ内在性レトロウイルス迷入否定試験法の検討 第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山）（2008 年 10 月 27 日）

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 月に宮沢孝幸が特別教育研究所助教授として着任し、スタートした。2007 年 12 月をもって秘書の蚊野が京都大学医学部に異動し、新たに 2007 年 12 月より正玄が秘書として加わった。2008 年 3 月に人間・環境学研究科大学院生の石川が修士号を取得し、引き続き 4 月より補佐員として研究室に 2008 年 12 月まで在籍した。また 4 月には、岩手大学農学部獣医学科から医学研究科大学院生（博士課程）として仲屋が、帯広畜産大学畜産学部から人間・環境学研究科大学院生（修士課程）として吉川が、また信州大学理学部から同じく人間・環境学研究科大学院生（修士課程）として大畑が新たに研究室に加わった。10 月にはポストクの馬場が山口大学農学部獣医学科に助教として転出した。2008 年 12 月末時点での構成員は、医学研究科大学院生（博士課程）3 年の庄嶋、同 1 年の仲屋、人間・環境学研究科大学院生（修士課程）1 年の大畑、吉川、秘書の正玄、そして私の総勢 6 名である。

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、ガンマレトロウイルスの内在化と種間感染のモデルとしてコアラレトロウイルス（KoRV）を、エイズの動物モデルとしてネコ免疫不全ウイルス（FIV）についての研究も行っている。

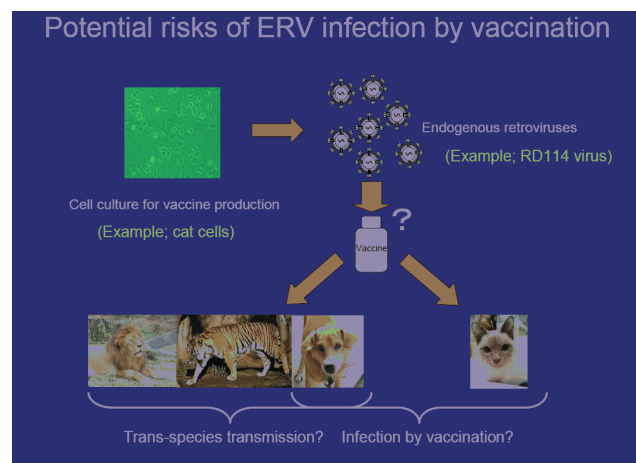
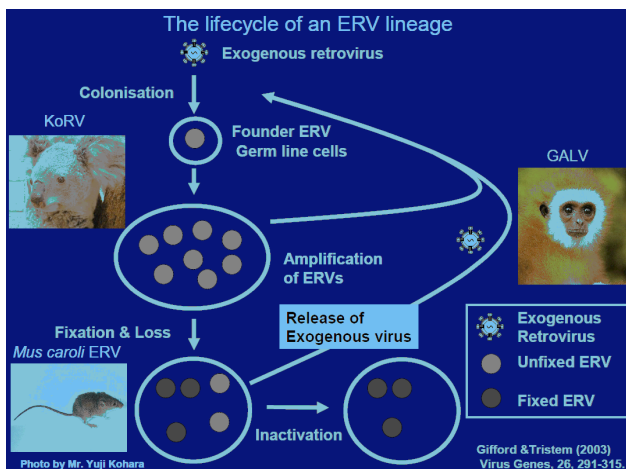
（１）KoRV の新規サブグループの同定とその性状解析

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（図 1）。また、KoRV はコアラに免疫抑制や白血病を引き起こしている。そこで KoRV はレトロウイルスの内在化機構の解明ならびに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おいて、非常に良いモデルになると考えられる。我々は日本の動物園で飼育されているコアラの KoRV 感染状況を調査するとともに、ウイルスの性状解析を行っている。現在までに受容体結合部位が大きく異なる KoRV を 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）はヒト由来株化細胞に感染し、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)を使用していた。オーストラリア北部由来のコアラはすべて KoRV-A ゲノムを保持していた。また、多くのコアラは A 以外のサブグループも保持していた。LTR の転写活性は KoRV-B の方が KoRV-A より高く、KoRV-B の方がより活発にウイルスが複製されている可能性が示唆された。今後は *in vitro* での性状解析を進めるとともに、*in vitro* の試験結果をもとに感受性動物を探索、KoRV 分離株の感染実験を行い、実験的に KoRV の内在化が再現できるかどうか調べる予定である。

(2) 生ワクチンにおけるネコ内在性レトロウイルス (RD114 ウイルス) の迷入

ネコは RD114 ウイルスという感染性の内在性レトロウイルス (ERV) をもっている。RD114 ウイルスは培養細胞では時に活性化し、感染性のウイルス粒子として放出される。ネコやイヌのワクチンはネコの細胞を用いて製造することが多いが、その過程で RD114 ウイルスが迷入する危険性がある。我々は日本で市販されている伴侶動物用生ワクチンを TE671 細胞 (ヒト横紋筋肉腫由来株化細胞) に接種し、PCR 法ならびに LacZ マーカーレスキューアッセイにて調べた。その結果、市販のネコ用生ワクチン 1 種類とイヌ用生ワクチン 1 種類に感染性の RD114 ウイルスの迷入を認めた。迷入ウイルス量を定量したところ、迷入が認められたネコ用ワクチンでは 1 ショットあたり 10 TCID₅₀ 以下であったが、イヌ用ワクチンでは約 1,800 TCID₅₀ であった。in vitro では、RD114 ウイルスは犬由来細胞や猫由来細胞で非常に良く増殖する。また RD114 ウイルスのエンベロープを被ったベクターは遺伝子治療用に実験的に使用されており、イヌを実験モデルとして用いた場合、静脈内接種により骨髓細胞に外来遺伝子が導入可能である。しかし、これまでに RD114 ウイルスをネコやイヌに実験的に接種した報告はなく、同ウイルスのイヌ・ネコへの感染性や感染した場合の病原性については不明である。RD114 ウイルスの動物への感染試験とワクチンを接種した動物の感染調査が必要であると考えられる。

図説明 (左図) KoRV は生殖細胞に感染し、100 年程度という極めて短い間にコアラに内在化した



と考えられている。ゲノムの約 1 割は ERV 由来の配列であるが、レトロウイルスの内在化の機構についてはまったく分かっていない。KoRV とコアラの系はレトロウイルスの内在化メカニズムの解明に役に立つと考えられる。(右図) 生ワクチンは様々な動物由来の細胞で製造されている。製造用細胞からは時に感染性の ERV が産生される。ERV がワクチンに迷入した場合、接種動物に感染する可能性がある。ここではネコの細胞を用いた場合の感染の可能性について示す。

(3) ネコ免疫不全ウイルス (FIV) の受容体スイッチング機構の解析

FIV はネコに後天性免疫不全症候群を引き起こす。我々はネコ星状細胞腫由来 G355-5 細胞にネコ CD134 (fCD134; 別名ネコ OX40 (fOX40)) を発現させることで、同細胞 (G355-5/fOX40 細胞) が

様々なリンパ球指向性分離株（TM2 株など）に高感受性になることを明らかにした。今回我々は G355-5/FOX40 細胞における FIV の受容体スイッチング現象を解析した。TM2 株が持続感染した G355-5/FOX40 細胞からウイルス（TM2PI 株と命名）を回収し、G355-5 細胞、G355-5/FOX40 細胞、CRFK 細胞（ネコ腎由来細胞）、3201 細胞（ネコ胸腺細胞腫）、FeTJ 細胞（ネコリンパ球株化細胞）に接種、ウイルスの増殖性を調べた。TM2PI 株は G355-5 細胞に効率よく感染し、培養上清中にウイルスが放出された。また、TM2PI 株は fCD134 陰性の CRFK 細胞、3201 細胞、FeTJ 細胞に感染したが、増殖はほとんど見られなかった。TM2PI 株では env 領域にアミノ酸配列の変異（W357R、E407K）が見られた。また、TM2PI 株の感染は AMD3100 で阻止されたことから、CXCR4 分子を受容体とすると考えられた。TM2PI 株は fCD134 非依存的 CXCR4 依存的に感染することが明らかとなった。しかし、CRFK 細胞、3201 細胞、FeTJ 細胞で増殖するためには、さらなる変異が必要であることが示唆された。

（４）ブタ内在性レトロウイルス（PERV）サブグループ A 受容体の発現制御

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は株によって異なるものの、HuPAR-2 分子をより効率よく利用する。HEK293 細胞と HeLa 細胞では HuPAR1 がよく発現していたが、HuPAR2 はほとんど発現していなかった。一方、ヒトトロフォブラスト細胞株（BeWo 細胞）、ヒト胎盤では、HuPAR2 がよく発現していた。HEK293 細胞、HeLa 細胞では脱メチル化剤の処理により、HuPAR2 の発現が見られるようになった。また、DNA のメチレーションの程度を BeWo 細胞と HeLa 細胞で比べたところ、転写開始直前の CpG アイランドにおいて、メチレーションの度合いに差が見られ、HuPAR2 の発現がエピジェネティクに制御されていることが分かった。