

# ダニ媒介性脳炎治療法開発のための 核酸アナログによる ウイルス増殖抑制機序に関する研究

Mechanism of Inhibition of Multiplication  
of Tick-Borne Encephalitis virus by Nucleoside Inhibitor

好井 健太郎

Kentaro Yoshii

長崎大学高度感染症研究センター研究部門ウイルス生態研究分野(教授)  
National Research Center for the Control and Prevention of Infectious Diseases (CCPID),  
Nagasaki University (Professor)

KEYWORD ▶

ダニ媒介性脳炎

核酸アナログ

人獣共通感染症

フラビウイルス

## はじめに ～ダニ媒介性脳炎とは～

01

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis:TBE)はダニ媒介性脳炎ウイルス(Tick-borne encephalitis virus:TBEV)を原因とするウイルス性の人獣共通感染症で、感染した人に重篤な脳炎を起こす疾患である。ユーラシア大陸中北部では広くTBE患者が発生しており、マダニが媒介する重要な感染症の一つとして認知されているが、日本では殆ど知られていない感染症であった。最近になり、北海道では死亡症例を含むTBE患者が相次いで報告されている。また、調査研究によりTBEVは北海道のみならず日本に広く分布する可能性も示されており、その流行防止対策の重要性が指摘されている。本稿ではTBEについて、国内外における感染状況を概説し、その治療法開発に関わる最新の研究成果について紹介する。

## ダニ媒介性脳炎の疫学

02

TBEVは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属する人獣共通感染症の原因ウイルスである。フラビウイルス属には70種以上のウイルスが属しており、その中には人に病原性を示す多くの重要なウイルスを含んでいる<sup>1)</sup>。フラビウイルス属のウイルスの多くは節足動物媒介性であり、その感染様式から、ダニ媒介性ウイルス、蚊媒介性ウイルス、ベクター不明のウイルス、脊椎動物への感染が報告されていない節足動物固有のウイルスの4つのグループに分かれている。蚊媒介性フラビウイルスには、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス、ジカウイルス等が挙げられる。近年、これらのフラビウイルスの流行地域の拡大が報告されており、世界人口の大部分が、一つ以上のフラビウイルスの流行地に居住している状況であり、世界的に公衆衛生上重要な問題となっている。

ダニ媒介性フラビウイルスは、哺乳動物または海鳥を脊椎動物

における主要な宿主とするウイルスに分類される。海鳥を宿主とするダニ媒介性フラビウイルスは人に病原性を示すという報告はないが、哺乳動物を宿主とするウイルスには、TBEVの他にもキャサヌール森林熱ウイルス(Kyasanur forest disease virus:KFDV)、オムスク出血熱ウイルス(Omsk hemorrhagic fever virus:OHFV)、ポワソンウイルス、跳躍病ウイルス等、人に病原性を示すウイルスが含まれている。これらのダニ媒介性フラビウイルスは「TBEV血清型群」と呼ばれる血清型グループを構成しており、抗原性が非常に似通っているため、特異性が高いとされる中和試験による特異的抗体検出法においてもウイルス間の交差反応性が認められる<sup>2)</sup>。

ダニ媒介性フラビウイルスは遺伝学的にも血清学的にも非常に近縁にあるにも関わらず、KFDVやOHFVのように出血熱様症状を引き起こすものと、TBEVに代表されるように脳炎による神経症状を引き起こすウイルスが存在する。しかし、このような症状の違いを引き起こすウイルスの遺伝子要因等の情報は乏しい。

TBEVは自然界ではマダニによって媒介されており、主にIxodes属のマダニが主要な媒介マダニであるとされているが、他にもDermacentor属、Haemaphysalis属等の幅広い種のマダニからウイルスが検出されており、TBEVの感染環に関与している事が示唆されている。TBEVはマダニの中で、脱皮を経ても感染が維持されること(経齢間伝達)ならびに卵を通じて次世代にTBEVが伝達する事(経卵巣伝達)が知られており、即ちマダニの中で世代を超えて長期間ウイルスが維持されることが可能である。

自然界において、TBEVはウイルスを保有するマダニの吸血を介して、小型野生げっ歯類を中心に様々な野生動物との間で感染環が維持されているが、犬等の伴侶動物や羊や山羊等、幅広い哺乳動物種に感染する事が報告されている。ヒトへの感染は主にマダニの吸血によるが、山羊等のTBEVに感染した家畜動物の生乳やそれに由来する乳製品の飲食を介した人への感染もヨーロッパで報告されている<sup>3)</sup>。

TBEはユーラシア大陸の広域で、年間一万人前後の患者が発生

して、患者報告地域も拡大している。TBEVは遺伝子性状から、ヨーロッパ型、シベリア型、極東型の3つの主要なサブタイプに分類される。各サブタイプの地理的分布については、重複する地域もあり、韓国でヨーロッパ型が分離される等、ユーラシア大陸内でTBEVが頻繁に移動していることが示唆されている。

日本においては、1990年代の前半までTBEVは存在しないと考えられてきた。しかし1948年に発生した日本脳炎流行時に、脳炎疑い患者からTBEV血清型群ウイルスの一つである跳躍病ウイルスが分離されており、感染者が本州において発生していた事が明らかになっている<sup>4)</sup>。そして1993年に北海道南部において、国内初のTBE確定診断症例が発生し<sup>5)</sup>、2016~2018年には4例の症例が北海道各地で報告されており、内2名は死亡している<sup>6,7)</sup>。

我々は国内初のTBE確定診断症例の発覚以来、継続的に動物を対象とした血清疫学調査を行ってきているが、北海道の広範な地域および西日本において、抗TBEV抗体を保有する動物が生息している事を明らかにしており、日本の広域にTBEVの流行巣が存在している可能性を示してきている<sup>8)</sup>。また、過去のTBEV感染者についての遡及調査を行い、神経疾患を呈した患者の中にTBEV患者がいたこと、マダニに吸血される機会の多い職業への就業者の中にTBEV感染歴のある人がいた事等、見逃されてきたTBEV感染を明らかにしている<sup>9,10)</sup>。

痛、発熱、関節痛や筋肉痛等のいわゆるインフルエンザ様の症状が見られる。この第1期の症状はヨーロッパ型TBEVの感染ではよく見られるが、シベリア型および極東型TBEVでは殆ど症状が認められないまま第2期に進む事が多い。第1期は数日程続き、中枢神経系に侵入した場合は第2期に進み重症化する。この場合、髄膜炎により精神錯乱・昏睡・痙攣及び麻痺等の中枢神経症状が認められる。致死率はヨーロッパ型TBEVでは1%~2%程度と報告されているが、極東型TBEVの場合、致死率は数十%にも上るとの報告がある。また第2期から回復した場合においても40%~60%の患者で知覚障害、運動障害等の後遺症が残る。

TBEの予防のためのワクチンは海外で数社から製造されている。中でもPfizer社やGSK社から製造されているワクチンは信頼性が高く、疫学的にもワクチン接種により患者数が減少することがオーストリアでの研究等において示されている<sup>12)</sup>。これらのワクチンは日本に分布しているTBEVにも防御効果があることが、ワクチン接種者血清の日本分離TBEV株に対する中和試験や、マウスモデルを用いた感染防御試験により報告されている<sup>13)</sup>。しかしこれらのワクチンは日本では未承認であり、一部のトラベルクリニック等において保険適用外で接種可能である。

また、ウイルス特異的な治療法はなく、過去にTBE特異的な免疫グロブリン製剤が有効として使われてきたが、近年の研究では副作用の懸念から推奨はされていない。従って、TBE患者への対応には対症療法が中心となるため、抗TBEV作用を示す特異的な治療薬の探索ならびに開発が強く望まれている。

## 核酸アナログによる ダニ媒介性脳炎ウイルスの増殖抑制

# 03

### 1. TBEV感染による臨床症状と予防・治療の現状

フラビウイルス属のウイルス遺伝子は+鎖、一本鎖のRNAであり、約11,000塩基で構成される。ウイルス遺伝子RNAは1つのopen reading frameをコードしており、ここから約3,400アミノ酸の一つのタンパク質として翻訳された後、宿主又はウイルスのプロテアーゼにより3つの構造タンパク(C, prM, E)と7つの非構造タンパク(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)へと切断される<sup>11)</sup>。NSタンパク質は複製複合体と呼ばれる構造を形成し、主にウイルスゲノムRNAの複製に関与しており、NS5はRNA依存性RNAポリメラーゼ(RNA-dependent RNA polymerase: RdRp)とメチルトランスフェラーゼとしてゲノム複製における重要な機能を果たしている。

TBEVに感染すると、局所リンパ節でウイルスは初期増殖する。その後、ウイルス血症を起こして各組織へ伝播し、血液脳関門を直接通過もしくはその機能を破綻させることで脳内へ侵入すると考えられている。しかし、ウイルス増殖に最適な組織や、血液脳関門を突破するメカニズム等のウイルスの体内動態については不明な点が多い。

ヒトがTBEVを保有するダニに吸血された場合の発症率は5%~30%と報告されており、通常7日間~14日間の潜伏期を経て発症する。症状はウイルス血症が起こっている第1期とウイルスが中枢神経系に侵入した後の第2期に分かれる。第1期では頭

### 2. TBEVの増殖を抑制する核酸アナログ

ウイルス特異的な治療薬を開発するためには、どのウイルスタンパク質を標的として、ウイルスの増殖過程のどの段階に作用させるかを検討する必要がある。その中で、ウイルスゲノムの複製過程を標的とした薬剤の開発が進んできた<sup>14)</sup>。特に、ウイルス由来のDNA/RNAポリメラーゼは、ウイルス特異的かつ複製過程に直接的に作用する酵素であり、抗ウイルス剤の標的タンパク質として注目されている。フラビウイルスのゲノム複製においてもウイルス由来のNS5がRdRpとして重要な機能を果たすことが明らかになっているため、NS5のRdRp機能を阻害する化合物の探索が広く行われてきた<sup>15)</sup>。

核酸アナログは、DNAやRNAの構成単位であるヌクレオシドと構造が類似した化合物で、ヌクレオシドに代わってウイルス由来DNA/RNAポリメラーゼに取り込まれることにより、ウイルスゲノムの合成阻害効果を示すことが知られている<sup>16)</sup>。代表的な核酸アナログの治療薬としては、抗ヘルペスウイルス薬としてアシクロビルやガンシクロビル、抗B型肝炎ウイルス薬であるラミブジンやエンテカビル等が知られている<sup>17)</sup>。フラビウイルス科のC型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus: HCV)に対しても核酸アナログであるソフィブシンが治療薬として使用されている。

### 3. 7-D'-2'-CMAによるTBEVの耐性変異

私達の研究グループは、TBEVに対して抗ウイルス効果を示す核酸アナログの検証を試みてきた。この中で他のフラビウイル

スにおいても効果を示していた核酸アナログの内、7-deaza-2'-C-methyladenosin (7-D-2'-CMA; 図1) が、培養細胞においてTBEVに対しても抗ウイルス効果を示すことを明らかにしてきた<sup>18)</sup>。さらに、TBEVを7-D-2'-CMA存在下で継代培養を繰り返すことにより、7-D-2'-CMA存在下においても増殖可能な耐性ウイルスが回収された。回収されたウイルスをシークエンス解析した結果、NS5の603番目のセリンがスレオニンに置換されていた(S603T)。

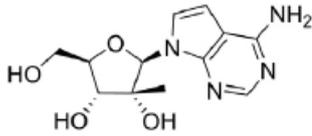


図1 7-deaza-2'-C-methyladenosine (7-D-2'-CMA)

そこで、S603T変異を持つTBEVの性状を解析するために、ウイルスに任意の変異を導入できる極東型TBEV Oshima5-10株の感染性cDNAクローンを使用して、NS5領域にS603T変異を導入したクローンウイルス(Oshima-IC S603T)を作製した。作製したクローンウイルスについて、BHK細胞に接種して形成されるウイルス感染細胞のフォーカスのサイズを検討した所、野生型(WT)接種細胞では、感染後36時間でフォーカスが検出されたのに対し、Oshima-IC S603T接種細胞では、感染後36時間ではフォーカスが検出されなかった。感染後72時間でフォーカスが検出されたものの、そのフォーカスサイズはWTのものと比較して小さかった(図2)。これにより、S603Tの変異はTBEVの増殖性を低下させることが示唆された。

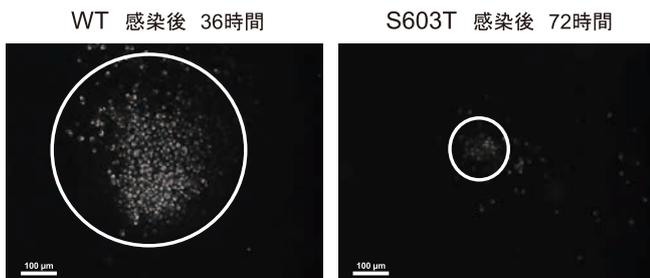


図2 WTとS603Tのフォーカス形状の比較  
BHK細胞へ、TBEV Oshima-IC WT、Oshima-IC S603Tを感染させ、培養後に固定し、間接蛍光抗体法によってフォーカスを検出した。フォーカスが形成された箇所を丸で示した。

導入したS603T変異の野生型配列への復帰性を評価するために、Oshima-IC S603T mRNAをBHK細胞に遺伝子導入し、7-D-2'-CMA存在下において培養し、細胞内で増殖したウイルスゲノムの変異導入領域の塩基配列を解析した。25 μmol/L以上の7-D-2'-CMA存在下でOshima-IC S603T mRNA遺伝子導入細胞を培養した場合、S603Tをコードする配列(9471-9473番目の塩基)に変化は認められなかった(図3)。しかし、12.5 μmol/Lの7-D-2'-CMA存在下で培養した場合、9471番

目の塩基はAとTの二重波形を示しており、603番目のアミノ酸がスレオニンとセリンのウイルスが混在していた。さらに低濃度での培養を行った場合、9471番目の塩基はTの単一の波形を示した。以上の結果から、低濃度の7-D-2'-CMA存在下では、野生型配列(セリン)への復帰変異体が出現することが示された。

WT	nt 9460	ACCAAAGAGGT	T	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 50μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	A	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 25μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	A	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 12.5μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	T	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 6.25μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	T	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 0μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	T	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490

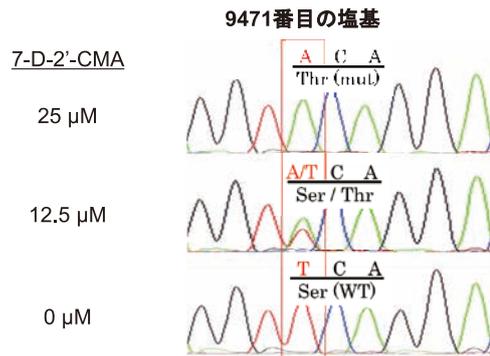


図3 S603T変異の安定性  
BHK細胞にOshima-S603TのmRNAを遺伝子導入し、7-D-2'-CMA存在下で培養後、細胞を回収し変異を導入した領域の塩基配列を解析した。

ウイルスのゲノム複製過程における、7-D-2'-CMAの薬剤耐性変異の影響を解析するために、ウイルス遺伝子から構造タンパク領域を欠損させ、非構造タンパクの機能によりゲノムの自己複製機能のみを保持したレプリコンを用いた解析を行った。レポーター遺伝子としてレプリコンにLuciferase遺伝子を挿入し、レプリコンの複製をLuciferase活性の測定により調べた。レプリコンを遺伝子導入した細胞では、WTと比較してS603TはLuciferase活性が低下しており、クローンウイルス感染細胞と同様に、S603T変異によりウイルスのゲノム複製能力は低下することが示された(図4)。

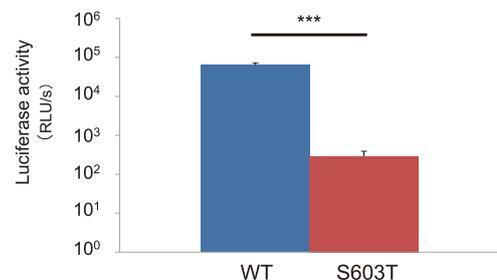


図4 Luciferase発現レプリコン導入細胞のLuciferase活性  
BHK細胞にOshima-rep-luc2AのmRNAをトランスフェクションし、培養後、細胞内のLuciferase活性を測定した。  
\*\*\* p<0.001

さらにWTのレプリコン導入細胞では7-D-2'-CMAの濃度依存的にLuciferase活性の低下が認められたのに対し、S603T導入細胞では7-D-2'-CMAの存在下においてもLuciferase活性の有意な変化は認められず、S603T変異により、7-D-2'-CMAに対する感受性が低下し、薬剤耐性を獲得していることが示された(図5)。

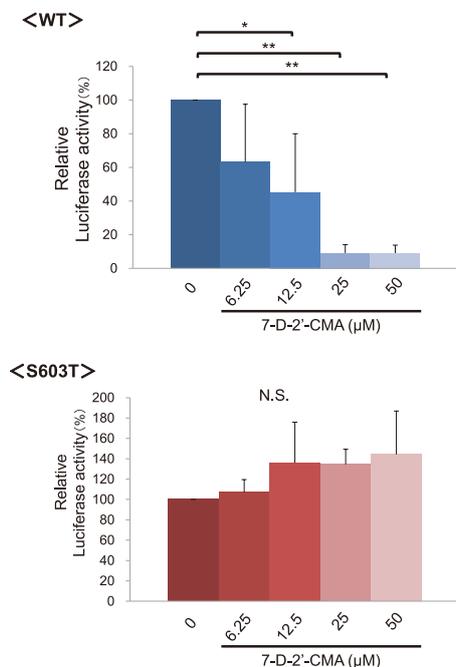


図5 7-D-2'-CMA存在下におけるレプリコン導入細胞のLuciferase活性 BHK細胞にOshima-rep-luc2A WTもしくはS603TのmRNAをトランスフェクションし、7-D-2'-CMA存在下で培養後、細胞内のLuciferase活性を測定した。  
\* p<0.05, \*\* p<0.01, N.S. 有意差無し。

続いて各種核酸アナログ誘導体のTBEVゲノム複製阻害効果の評価を行ったところ、WTでは7-D-2'-CMA、2'-C-methylguanosine (2'-CMG)、および2'-C-methylcytidine (2'-CMC)によりLuciferase活性の低下が認められたのに対し、S603T導入細胞では、2'-CMCを作用させた細胞のみでLuciferase活性の低下が認められた(図6)。

マウスモデルにおけるS603Tの変異の病原性への影響を解析するために、ウイルスを6週齢のC57BL/6マウスにそれぞれ50 PFU (Plaque-Forming Unit) ずつ脳内接種し症状を観察した。WTとS603Tともにウイルス接種後の発症率と生存率に有意差は認められなかったが、WT接種マウスでは平均生存期間は9.33日であったのに対し、S603T接種群では14.75日と有意に延長しており、S603T変異により感染マウスにおける病原性が低下したことが示された。さらに、S603T接種マウスにおけるウイルスの復帰変異体の出現の検討を行ったところ、10検体中9検体で、導入したS603Tのアミノ酸変異が維持されていたが、新たにNS5のQ620L、C666Sのアミノ酸変異が観察された。この2カ所のアミノ酸変異のウイルス増殖への影響を解析するために、マウスから回収したウイルスのフォーカス形成を検証

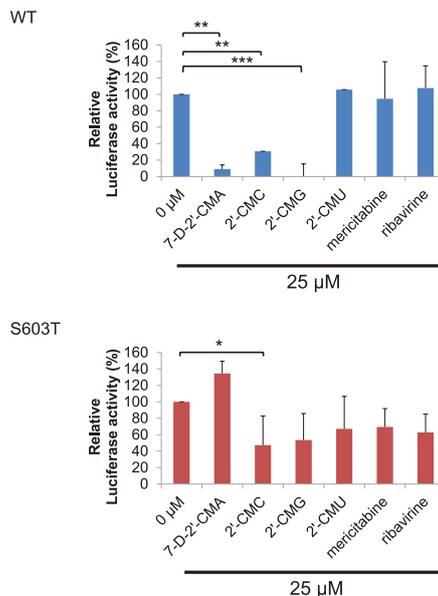


図6 各核酸アナログ存在下におけるレプリコン導入細胞のLuciferase活性 BHK細胞にOshima-rep-luc2A WTもしくはS603TのmRNAをトランスフェクションし、各核酸アナログ存在下で培養後、細胞内のLuciferase活性を測定した。\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001。

したところ、S603T感染細胞よりも大きなフォーカスが認められ(図7)、マウスの脳内で生じたQ620LとC666Sの2つの変異はS603Tにより減少したウイルスの増殖性を代償的に高める変異である可能性が示唆された。

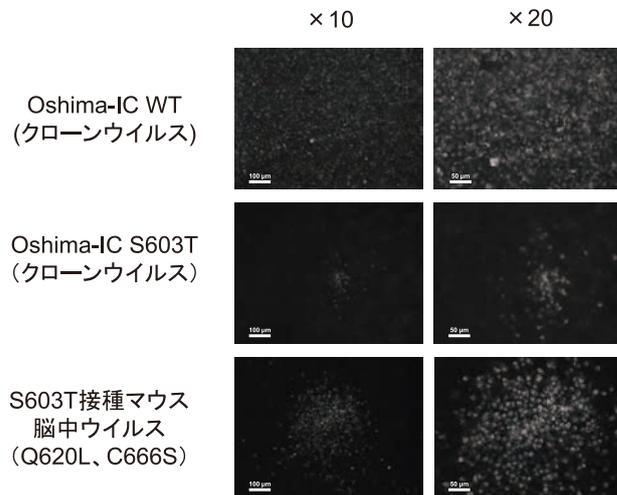


図7 S603T接種群マウス脳乳剤のFocus形状の比較 Oshima-IC S603T接種マウス脳から回収したウイルスをBHK細胞へ感染させ、フォーカスを検出し、比較した。

## 終わりに

04

TBEVのNS5のRdRp領域のホモロジーモデリングにより構築した立体構造の解析によると、S603T変異はRdRp領域中のFingers、Palm、Thumbという3つのサブドメインの中のFingerサブドメイン内に存在し、ゲノムの複製の際にヌクレオ

シドが取り込まれる中心部に近接している(図8)。HCVでは、NS5Bの酵素活性部位近傍に位置する282番目のセリンがスレオニンに変異(S282T)することで、核酸アナログである2'-C-methyladenosineに対する耐性を獲得することが報告されており<sup>19)</sup>、TBEV NS5のS603T変異はこのS282T変異と立体構造上同様な位置に存在している。以上のことから、TBEVの7-D-2'-CMAに対する薬剤耐性獲得のメカニズムは、S603T変異によってRdRp酵素活性部位近傍の構造に変化が生じ、薬剤との結合性に変化が生じることによるものと考えられる。

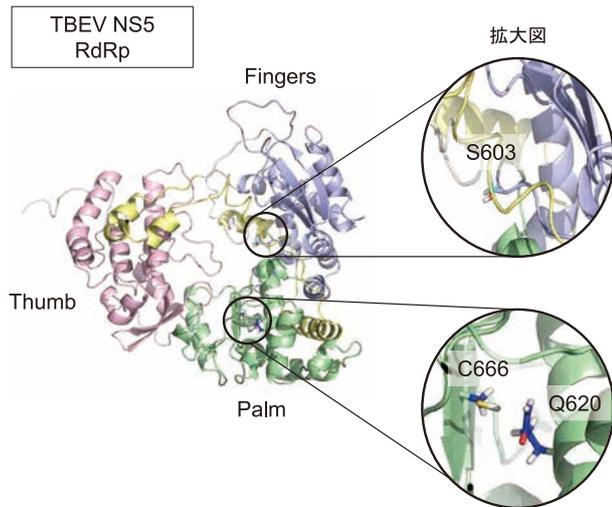


図8 デングウイルスのRdRp立体構造(PDB code 2J7W)を基にホモロジーモデリングにより作製したTBEVのNS5 RdRp蛋白質立体構造における7-D-2'-CMA耐性変異部位(S603)とS603T接種マウスで生じた変異部位(C666、Q620)

S603T変異によって7-D-2'-CMAに対する薬剤耐性を獲得する一方で、ウイルス本来の増殖性が低下することも我々の実験によって示された。過去の研究でも、核酸アナログによりRdRpの酵素活性部位近傍の変異が生じたウイルスで増殖性が著しく低下することがHCVで報告されている<sup>20)</sup>。このウイルスの増殖性の変化についても、S603T変異によってRdRp酵素活性部位近傍の立体構造が変化したことで、RdRp活性中心とウイルスゲノムRNAの結合性の変化や、PalmドメインでのウイルスゲノムRNA伸長反応の酵素活性が低下したと考えられる。

S603T接種マウス脳内では、復帰変異は殆ど認められず、代わりにQ620LとC666Sという2つの新たなアミノ酸変異が認められた。この2つのアミノ酸はいずれもPalmドメインに位置し、両残基の側鎖が向き合って相互作用していると予想された。マウスの脳内では、S603T変異による増殖性の低下を補うQ620LとC666S変異が代償的に生じ、脳内におけるウイルスの増殖性も向上したため、S603T変異の野生型配列への復帰変異が生じなくなると考えられる。

培養細胞系における復帰変異体の出現確率から、生体組織中で復帰変異が起こる可能性は否定できないが、我々の研究グループによる別の実験により、7-D-2'-CMAをヨーロッパ型TBEV接

種マウスに投与した場合に明らかな症状の軽減と生存率の回復が認められている。したがって、薬剤の適切な投与計画の検討を行うことによって、重症化の回避に繋がると考えられる。以上のことから、7-D-2'-CMAは感染早期段階での抗TBEV候補化合物として十分に有用な化合物であると考えられ、今後さらなる検討を重ねることによって、臨床現場への応用が期待される。

#### 参考文献

1. E. A. Gould and T. Solomon, Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 2008, 371, 9611, 500-509.
2. H. Holzmann et al., Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J. Med. Virol.* 1996, 48, 102-107.
3. P. Bogovic and F. Strle, Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases.* 2015, 3, 5, 430-441.
4. K. Ando et al., Studies on the viruses isolated during epidemic of Japanese B encephalitis in 1948 in Tokyo area. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 1952, 24, 3-4, 557-562.
5. I. Takashima et al., A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 8, 1943-1947.
6. 山口 宏樹, 好井 健太郎, 荻和 宏明 他, 2017年の北海道におけるダニ媒介脳炎. *IASR*. 2018, 39, 3, 46-47.
7. 好井 健太郎, 守内 玲寧 他, 2016年に北海道で発生したダニ媒介性脳炎症例. *IASR*, 2017, 38, 6, 126.
8. K. Yoshii et al., Epizootiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2011, 73, 3, 409-412.
9. K. Yoshii et al., A Retrospective Epidemiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus in Patients with Neurological Disorders in Hokkaido, Japan. *Microorganisms.* 2020, 8, 11, 1672.
10. K. Yoshii et al., Unrecognized Subclinical Infection with Tickborne Encephalitis Virus, Japan. *Emerging Infect. Dis.* 2017, 23, 10, 1753-1754.
11. F. X. Heinz and C. W. Mandl. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. *APMIS.* 1993, 101, 735-745.
12. F. X. Heinz et al., Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine.* 2007, 25, 43, 7559-7567.
13. N. Chiba et al., Protection against tick-borne encephalitis virus isolated in Japan by active and passive immunization. *Vaccine.* 1999, 17, 11-12, 1532-1539.
14. E. De Clercq, A 40-year journey in search of selective antiviral chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011, 51, 1-24.
15. P. Niyomrattanakit et al., Inhibition of dengue virus polymerase by blocking of the RNA tunnel. *J. virol.* 2010, 84, 11, 5678-5686.
16. E. De Clercq et al., Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2, 704-720.
17. E. De Clercq, Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* 2004, 30, 2, 115-133.
18. L. Eyer et al., Nucleoside inhibitors of tick-borne encephalitis virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59, 9, 5483-5493.
19. H. Ji et al., Next generation sequencing of the hepatitis C virus NS5B gene reveals potential novel S282 drug resistance mutations. *Virology.* 2015, 477, 1-9.
20. X. Tong et al., In vivo emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. *J. Infect. Dis.* 2014, 209, 5, 668-675.