

## 2. オルソレオウイルス

小林 剛

大阪大学 微生物病研究所 感染症国際研究センター

レオウイルス科オルソレオウイルス属は、非エンベロープ性の正20面体構造を示し、10本の2本鎖RNA (dsRNA) ゲノムを有する。オルソレオウイルスは細胞融合能の有無により Fusogenic reovirus グループと Nonfusogenic reovirus グループに大別される。Fusogenic reovirus グループにはトリレオウイルス、ヒヒレオウイルス、コウモリレオウイルス、爬虫類レオウイルスなどが含まれ、Nonfusogenic reovirus グループには哺乳類オルソレオウイルス (MRV) が含まれる。MRVは、分節型 dsRNA ウイルスの複製機構、病原性研究のモデルウイルスとして研究されている。さらに、MRVは選択的に癌細胞を破壊することから、腫瘍溶解性ウイルスとして癌治療に対する臨床研究も進められている。本総説では、MRVのウイルス学的特徴を中心に最新の知見も含め、オルソレオウイルスについて概説する。

### はじめに

オルソレオウイルス属のウイルスは哺乳類に加えて、鳥類、爬虫類からも広く分離されている。オルソレオウイルスは Fusogenic グループと Nonfusogenic グループに分類される。Fusogenic グループに属するトリレオウイルス (Avian reovirus: ARV) は鶏に関節炎・腱鞘炎による脚弱、起立不能を誘発することから、特に肉用鶏では重要なウイルス感染症である<sup>1)</sup>。ヒヒレオウイルス (Baboon reovirus: BRV) は1995年に初めてアメリカ テキサス州のヒヒのコロニーから分離されたレオウイルスでヒヒに致死的な脳炎を起こすことが知られている<sup>2)</sup>。コウモリレオウイルス (Pteropine reovirus: PRV) は、最近、ヒトにおいて急性の呼吸器疾患との関連性が報告されたことで注目されている<sup>3-8)</sup>。Nonfusogenic reovirus である哺乳類オルソレオウ

イルス (Mammalian orthoreovirus: MRV) は広い宿主域を持ち、ヒトにも感染するが、ほとんどが不顕性感染であり、病原性は極めて低い。MRVはレオウイルス科で最初に分離、同定された2本鎖RNA (dsRNA) ウイルスであり<sup>9,10)</sup>、mRNAのキャップ構造、転写、翻訳に関する初期のRNA研究での重要な発見に先駆的な役割を果たしてきた<sup>11-16)</sup>。MRVは古くからレオウイルス科のモデルウイルスとして研究されてきたことから、レオウイルス科で最も研究が進んでいるウイルスの一つである。

### 1. オルソレオウイルスのゲノム構造

MRVは4つの血清型、MRV-1, MRV-2, MRV-3, MRV-4型に分類される。10本の分節dsRNAゲノムは、8つの構造タンパク質、 $\lambda 1$  (L3遺伝子)、 $\lambda 2$  (L2遺伝子)、 $\lambda 3$  (L1遺伝子)、 $\mu 1$  (M2遺伝子)、 $\mu 2$  (M1遺伝子)、 $\sigma 1$  (S1遺伝子)、 $\sigma 2$  (S2遺伝子)、 $\sigma 3$  (S4遺伝子) および4つの非構造タンパク質、 $\mu$  NS (M3遺伝子)、 $\mu$  NSC (M3遺伝子)、 $\sigma$  NS (S3遺伝子)、 $\sigma 1s$  (S1遺伝子) をコードしている<sup>17)</sup>。図1に示すように、MRVは2層構造をもつカプシドから構成される。外殻は、ヘテロペンタマー構造を形成する $\mu 1$ ,  $\sigma 3$ に加え、 $\sigma 1$ から構成されている。 $\sigma 1$ はCore spike proteinである $\lambda 2$ が形成するペンタマー構造の中心から突出している。内殻 (コア構造) は $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$  および $\sigma 2$ により構成される。コア粒子内には10本の分節ゲノムに加え、RNA依存性RNAポリメラーゼである $\lambda 3$ とポリメラーゼコファクターとされる $\mu 2$ が含まれる<sup>17,18)</sup>。

#### 連絡先

〒565-0871

大阪府吹田市山田丘3-1

大阪大学微生物病研究所

感染症国際研究センター

ウイルス複製研究グループ

TEL: 06-6879-8321

FAX: 06-6879-8278

E-mail: tkobayashi@biken.osaka-u.ac.jp

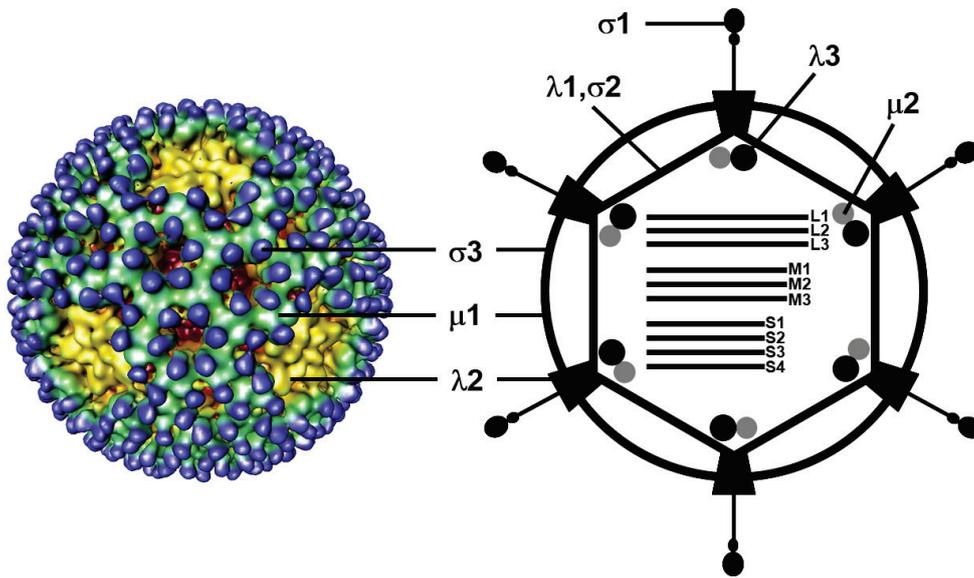


図1 哺乳類レオウイルスの粒子構造と模式図  
文献 31 から引用 (一部改変)

これらのタンパク質は複製複合体を形成している。非構造タンパク質 $\mu$  NSは、複製の場である Viral Factory (VF) の形成に中心的な役割を担っており、様々な MRV タンパク質と結合し、VF内にリクルートする<sup>19-22</sup>。感染細胞では、 $\mu$  NS mRNA の2番目の開始コドンから翻訳される $\mu$  NSC の発現が認められる<sup>23,24</sup>。 $\mu$  NSC の詳細な機能は明らかにされていないが、筆者らは培養細胞での複製には少なくとも必須でないことを明らかにしている<sup>25</sup>。 $\sigma$  NSは、 $\mu$  NS と相互作用し、1本鎖RNAに高い結合能を有することから、プラス鎖ウイルスRNAのVF内へのリクルートに関与していると考えられている<sup>26,27</sup>。

MRV S1 遺伝子は吸着、侵入に関与する $\sigma$  1 および非構造タンパク質 $\sigma$  1s をコードしている (図2)。 $\sigma$  1s はウイルスの複製に必須ではないが、実験感染マウスモデルの解析結果から病原性に深く関与していることが報告されている<sup>28-31</sup>。一方、Fusogenic グループの S1 遺伝子は (BRV では S4 遺伝子)、Nonfusogenic MRV の S1 遺伝子とは異なるポリシストロニック構造を持つことが知られている<sup>32-35</sup>。Fusogenic reovirus グループの ARV S1 遺伝子には Fusion-associated small transmembrane (FAST) タンパク質、p17、 $\sigma$  C がコードされている (図2)。FAST タンパク質は Fusogenic グループに特徴的な膜融合タンパク質であり<sup>36</sup>、p17 は核と細胞質間をシャトリングする機能を有する<sup>37</sup>。 $\sigma$  C は MRV  $\sigma$  1 と同様に吸着、侵入に関与している<sup>38</sup>。Fusogenic reovirus では、ポリシストロニックな S1 遺伝子から発現されるタンパク質がどのようにウイルス複製、病原性に関与しているのかについては明らかにされていない。

## 2. オルソレオウイルスのライフサイクル (図3)

### ウイルス吸着・侵入

MRV におけるウイルス吸着過程では、 $\sigma$  1 が Cell attachment protein として、重要な役割を担っている。 $\sigma$  1 は Tail, Body, Head の3つのドメインから構成されており、3量体を形成する<sup>17</sup>。MRVのエントリーレセプターとして、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) が同定されている<sup>39</sup>。JAM-A は全ての MRV 血清型のレセプターであり、JAM-A の D1 ドメインと $\sigma$  1 のC末端側 Head ドメインが相互作用領域として同定されている<sup>40</sup>。JAM-A 遺伝子のノックアウト (JAM-A<sup>-/-</sup>) マウスを用いた感染実験の結果では、初期標的部位である腸管組織から他の組織への血行性感染が顕著に抑制されており、*in vivo* におけるレセプターとしての重要性も報告されている<sup>41</sup>。JAM-A に加えて、MRV-3型はシアル酸もレセプターとして利用しており、 $\sigma$  1 Body 領域にシアル酸結合ドメインが存在する<sup>42</sup>。他の MRV レセプターに関する研究として、MRV は JAM-A<sup>-/-</sup> マウスの中樞神経系 (CNS) で野生型マウスと同程度の増殖性を示し、JAM-A<sup>-/-</sup> マウス由来の初代皮質神経細胞でも効率よく感染が成立することから、これまで CNS においては神経細胞特異的なレセプターを利用している可能性が示唆されていた<sup>41</sup>。最近になり、Konopka-Anstadt らによって、不明であった神経細胞の MRV レセプターとして、Nogo receptor NgR1 が同定された<sup>43</sup>。さらに、Konopka-Anstadt らは、 $\sigma$  1 以外の他の外殻構造タンパク質 ( $\mu$  1,  $\sigma$  3) が NgR1 のウイルス側のリガンドと

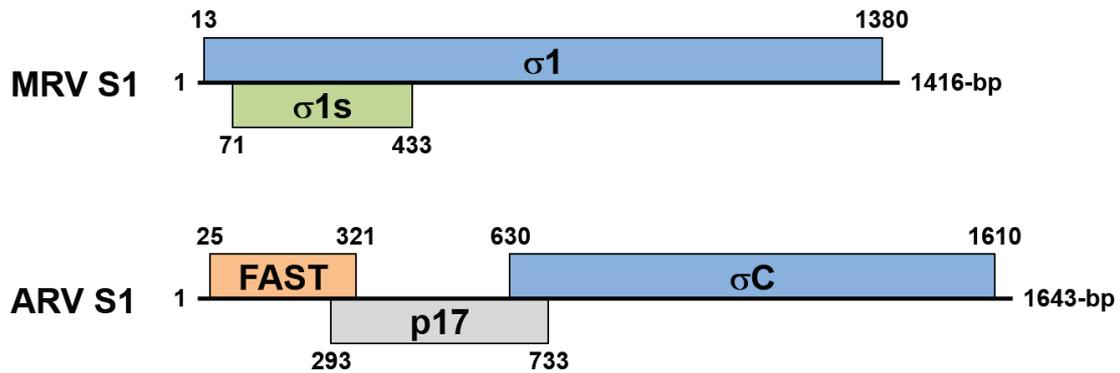


図2 オルソレオウイルスのS1遺伝子構造

Nonfusogenic MRV-3 型 (GenBank accession number EF494441), Fusogenic ARV S1133 株 (GenBank accession number AF330703) のS1 遺伝子構造を示す。

して機能している可能性も示唆している<sup>43)</sup>。他のオルソレオウイルスの吸着、侵入過程の解析はあまり進んでいないが、興味深いことに、BRV の分節遺伝子には、MRV  $\sigma 1$  と相同性を有する Cell attachment protein  $\sigma C$  がコードされておらず、BRV では他のオルソレオウイルスとは異なる吸着、侵入機構の存在が示唆されている<sup>34,44)</sup>。

MRV はクラスリン依存性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる<sup>45)</sup>。この侵入過程には、ウイルス粒子とインテグリン $\beta 1$  との結合が必要とされている<sup>46)</sup>。インテグリン $\beta 1$  に結合する MRV タンパク質として、インテグリン結合モチーフ (RGD, KGE) を有する $\lambda 2$  がリガンドとして考えられているが、直接的な根拠は示されていない。エンドソーム内で MRV 粒子は酸性 pH 依存的タンパク質分解作用により、 $\sigma 3$  が除去され、 $\mu 1$  が部分的に分解されることで Infectious subvirion particle (ISVP) へと構造変化する<sup>17)</sup>。ISVP の構造がさらにエンドソーム内で変化することで、 $\mu 1$  分解フラグメントおよび $\sigma 1$  が除去され、細胞質中にコア粒子が放出される<sup>17)</sup>。

### ウイルス複製・アセンブリー

細胞質に放出されたコア粒子は、プラス鎖 RNA の転写を開始する。プラス鎖 RNA はキャップ構造を有し、5' 末端 (5'-GCUA) および 3' 末端 (UCAUC-3') に存在する共通配列は全ての分節ゲノム間で保存されている<sup>17,47)</sup>。コア粒子内で合成された 10 分節のプラス鎖 RNA はウイルス mRNA として、直接翻訳され、各種ウイルスタンパク質が合成される。一方で、プラス鎖 RNA は dsRNA ゲノム合成の鋳型としても機能する。MRV のプラス鎖 RNA の 3' 末端にポリ A 鎖は付加されていない。ポリ A 鎖はポリ A 鎖結合タンパク質 (PABP) を介して、宿主 mRNA の安定化、翻訳促進に重要な役割を持っている。PABP と 5' 末端のキャップ構造を認識する翻訳開始因子とが結合し、

mRNA は環状構造をとることで、翻訳効率を上昇させ、分解から逃れていると考えられている。MRV と同様の RNA 構造を有するロタウイルスでは効率的な翻訳のため、非構造タンパク質の一つである NSP3 が特異的にプラス鎖 RNA の 3' 末端の共通保存配列 (5'-UGACC) と翻訳開始因子 eIF4G に結合することで、PABP と同様の機能を示し、ロタウイルス mRNA を環状化することが知られている<sup>48-51)</sup>。MRV のプラス鎖 RNA にそのような特異な翻訳機構はこれまで報告されていないが、S4 遺伝子の 3' 末端領域には翻訳制御配列が存在し、宿主因子と相互作用することが示されている<sup>52)</sup>。S4 遺伝子で同定された翻訳制御配列が他の分節ゲノム内にも共通して保存されているのであれば、オルソレオウイルス独自の翻訳調節機構の存在も考えられる。

翻訳されたウイルスタンパク質、プラス鎖 RNA は複製の場である VF に集積する<sup>17)</sup>。 $\mu NS$  により形成される VF の形態は株間で異なり、細胞質内で Filamentous inclusion あるいは Globular inclusion として観察される<sup>53)</sup>。この VF の形態には VF の構成タンパク質の一つである $\mu 2$  が関与し、 $\mu 2$  領域内の 208 番目のアミノ酸の重要性が報告されている<sup>53)</sup>。しかし、この VF の形態の違いがどのようなウイルス学的意義を持つのかについては明らかとなっていない。VF 内には翻訳装置の本体であるリボソームが含まれていないことから、VF 内のコア粒子から転写されたプラス鎖 RNA は、一旦、ウイルスタンパク質の翻訳のため VF 外に移行し、翻訳されたタンパク質が再び VF 内にリクルートされると考えられていた。しかし、最近の知見から、VF 内にも翻訳装置が存在し、RNA の転写、翻訳の一連のステップが VF 内で行われていることが明らかにされている<sup>54)</sup>。

VF 内での分節ゲノムのパッケージング、ウイルス粒子のアセンブリーのメカニズムについては解明がほとんど進んでおらず、ブラックボックスである。MRV の 10 分節ゲ

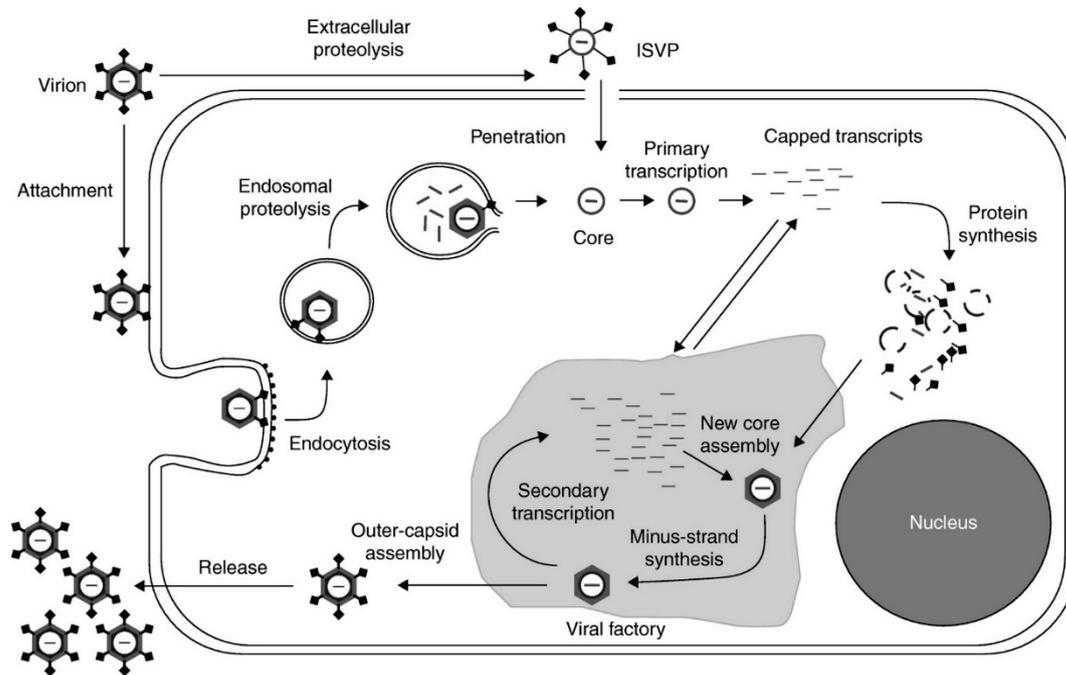


図3 哺乳類レオウイルスのライフサイクル  
文献 83 から引用

ノムのパッケージング機構については、ウイルス粒子中に分節ゲノムの数や種類がランダムに取り込まれ、10分節全ての種類が取り込まれた粒子が効率よく増殖するという説もあるが、各分節ゲノムが特異的に選択され、10種類の分節ゲノムがワンセットで粒子中に取り込まれるとする説が有力である。リバーシジェネティクス系による解析から、MRV L1, M1, S2 遺伝子のパッケージングシグナルとして5'末端側129-bp, 124-bp, 96-bpの領域および3'末端側139-bp, 172-bp, 98-bpの領域がそれぞれ同定されている<sup>55-58)</sup>。これらの分節遺伝子間における5'末端側および3'末端側のパッケージングシグナルの組換えキメラウイルスを用いた解析から、5'末端側のパッケージングシグナルが分節遺伝子の特異的な認識に重要であることが報告されている<sup>57)</sup>。これらの知見はMRV分節ゲノムの選択的なパッケージング説を支持している。VF内で10本の分節ゲノムは $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 2$ ,  $\sigma 2$ と相互作用し、コア様粒子を形成する。コア粒子内に取り込まれたプラス鎖RNAを鋳型としてマイナス鎖RNAが転写され、dsRNAゲノムが合成される<sup>17)</sup>。新規のコア粒子からはプラス鎖RNAが転写される一方、外殻構造タンパク質 $\mu 1$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 3$ がコア粒子にアセンブリーすることでプラス鎖RNAの転写が抑制され、成熟ウイルス粒子が産生される<sup>17)</sup>。

### 3. MRVにおけるリバーシジェネティクス系

リバーシジェネティクス系は遺伝子から人工的にウイルスを合成する手法であり、遺伝子の機能や病原性解析、ウ

イルスベクター開発を行う上で必須の基盤技術である。レオウイルス科におけるリバーシジェネティクス系の開発は他のRNAウイルスと比較すると遅れていたが、近年、MRVを初めとして、ロタウイルス、ブルータンゲウイルス、アフリカ馬疫ウイルスでリバーシジェネティクス系が確立されている<sup>59-65)</sup>。

1990年、Ronerらは、MRVのコア粒子から合成したプラス鎖RNAを培養細胞に導入することで感染性のウイルス粒子を得ることに成功した<sup>66)</sup>。この方法がレオウイルス科におけるリバーシジェネティクス系に関する最初の報告である。Ronerらは、MRV-3型粒子からコア粒子を精製し、精製したコア粒子を用いてMRV-3型由来の10分節全てのプラス鎖RNAを*in vitro*で合成した。次いで、プラス鎖RNA、dsRNAおよび*in vitro*でプラス鎖RNAをウサギ網状赤血球ライセートにより翻訳した反応産物をマウスL929細胞に導入し、その後、ヘルパーウイルスとしてMRV-2型を感染させ、培養後、目的とするMRV-3型を回収した。ヘルパーウイルスであるMRV-2型からMRV-3型の単離は、型間におけるブランク形成時期の違いを利用して行った。さらに、Ronerらはこのシステムを応用し、レポーター遺伝子(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ: CAT)を発現する組換えMRVも作製している<sup>65)</sup>。しかし、Ronerらのヘルパーレオウイルスを用いるリバーシジェネティクス系は、操作が非常に複雑で技術的難易度が高く、これまで他の研究室でこの系の再現、追試には成功していないことから、より汎用性の高

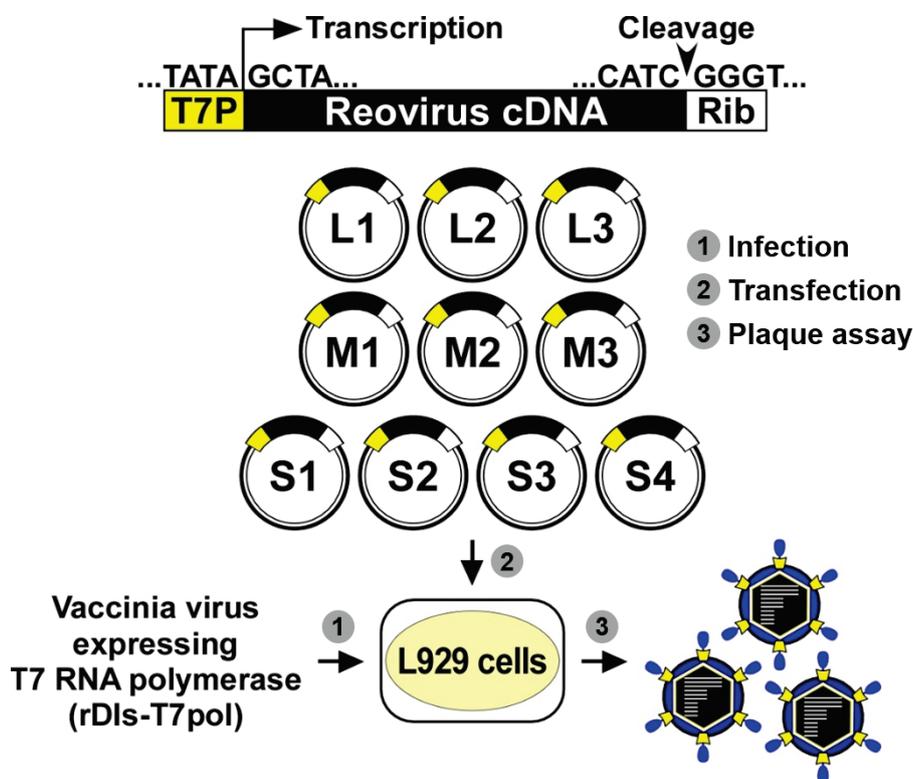


図4 哺乳類レオウイルスにおけるリバーシジェネティクス系

いリバーシジェネティクス系の開発が切望されていた。

2007年、筆者らは、ヘルパーレオウイルスを必要とせず、簡便で効率が高く、ウイルスcDNAのみから感染性のウイルス粒子を作製できる完全なシステムの開発に成功した(図4)<sup>64</sup>。このPlasmid-basedのリバーシジェネティクス系を確立するため、筆者らは、10分節全てのMRV-3型由来cDNAをT7プロモーター配列およびD型肝炎ウイルス由来リボザイム配列の間に配置したコンストラクトを作製した。組換えウイルスのレスキューについては、T7 RNAポリメラーゼを発現するワクシニアウイルス(rDIs-T7pol)<sup>67</sup>を感染させたL929細胞に10分節全てのcDNAをトランスフェクションし、培養後、プラークアッセイにより単離した。筆者らのシステムでは、培養細胞に導入した10分節のウイルスcDNAがT7 RNAポリメラーゼによる転写、リボザイムによる自己切断反応により、MRVコア粒子由来のRNAと同様の構造を持つプラス鎖RNAが合成され、タンパク質翻訳およびdsRNAゲノム合成の鋳型として機能することで、MRVの複製サイクルを再現していると考えられる。T7 RNAポリメラーゼの供給に用いたワクシニアウイルスは高度に弱毒化されており、ニワトリ胎児初代培養細胞では増殖するが、哺乳動物細胞ではほとんど増殖せず、L929細胞ではプラークを形成しないことから組換えMRVの単離に非常に有用である。筆者らはこのシステムを用いて、Green fluorescent protein (GFP)

を発現するMRVの作製にも成功している<sup>64</sup>。GFP発現組換えMRVの作製のため、MRV-3型S4遺伝子の5'末端領域(149-bp)および3'末端領域(428-bp)の間にGFP遺伝子を配置したコンストラクトを構築した。次いで、構築したS4遺伝子改変プラスミドをMRV-3型由来の他の9つの分節遺伝子プラスミドと共に培養細胞に導入することで目的とする組換えウイルスを作製した。GFP発現組換えMRVは、S4遺伝子がコードする外殻構造タンパク質 $\sigma$ 3を欠損していることから、GFP発現組換えMRVの作製、増殖実験は $\sigma$ 3を持続的に発現するL929細胞を用いて行っている。

筆者らは、同様の手法を用いて、MRV-1型のリバーシジェネティクス系の開発にも成功した<sup>68</sup>。MRV-1型とMRV-3型の混合感染によるリアソートメントはランダムに起こっているわけではなく、ある特定の分節遺伝子の組合せが優先的に選択されることから、これまで、全てのリアソータントの組合せは分離されていなかった<sup>69</sup>。しかし、MRV-1型とMRV-3型のリバーシジェネティクス系を組み合わせることで任意のリアソータントウイルスを自由自在に作製することが可能となった。さらに、1個のプラスミドに複数のMRV分節ゲノムcDNAの発現カセットを挿入することで、細胞に導入するプラスミドの個数を10個から4個に減らし、全分節遺伝子由来cDNAの導入効率を大幅に向上させたシステムの開発にも成功した<sup>68</sup>。従来

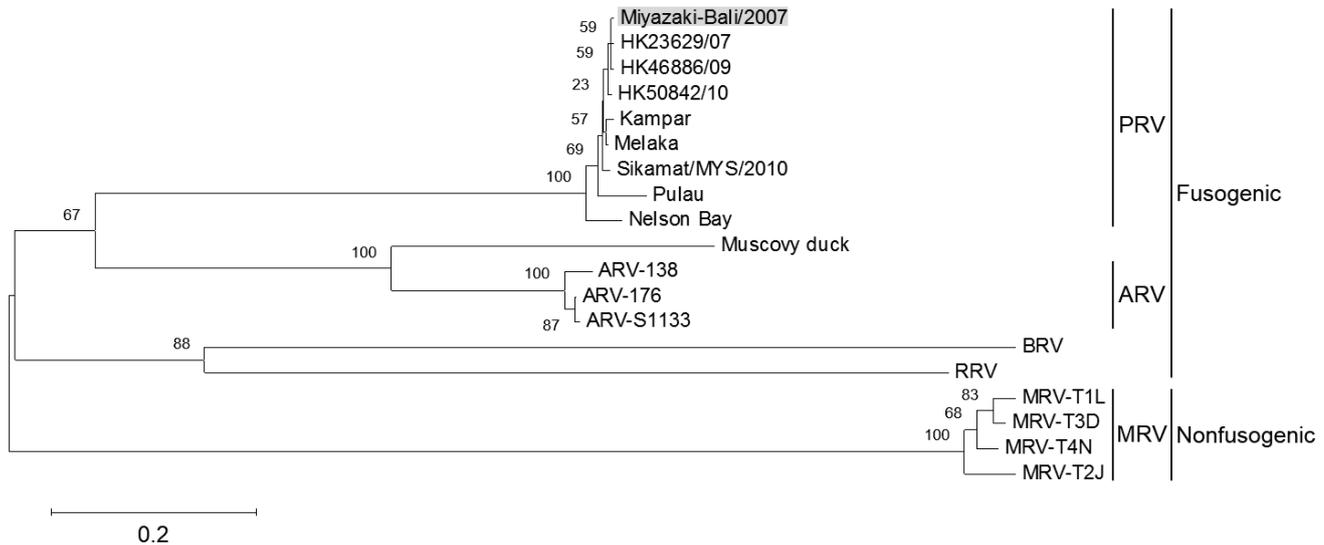


図5 オルソレオウイルス Major capsid protein (S4 遺伝子) の系統樹解析

Miyazaki-Bali/2007 株は PRV のクラスターに属する。ARV については S3 遺伝子を系統樹解析に使用した。

のシステムでは、組換え MRV-3 型はトランスフェクション 48 時間後からようやく回収できたのに対し、改良システムではトランスフェクション 24 時間後からウイルスの回収が可能であった。また、筆者らは、T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを培養細胞に導入することでワクシニアウイルス感染を必要としない、より操作が簡便なシステムの開発にも成功している<sup>68,70)</sup>。

現在、MRV の Plasmid-based のリバースジェネティクス系は、多くの研究室で導入され、様々な遺伝子の変異体による解析が精力的に行われており、MRV の複製機構ならびに病態発現機序の解明に大きな貢献をしている<sup>17)</sup>。さらに、基礎研究に加えて、MRV の特性を利用した新規のワクチンベクターや腫瘍溶解性ウイルス療法開発の試みもなされており、今後の展開が期待される。オルソレオウイルス属では、現在まで病原性を持つ Fusogenic グループのリバースジェネティクス系は確立されていない。このグループのみが持つ FAST タンパク質の機能解析を含む Fusogenic reovirus 特有の感染現象の理解のため、リバースジェネティクス系の開発が待たれる。

#### 4. MRV を用いた癌治療研究

MRV は、癌細胞において特異的に増殖し、破壊・死滅させることから、腫瘍溶解性ウイルスとして癌治療への臨床応用が期待されている。MRV は Ras 経路が活性化した癌細胞で効率よく増殖し、細胞溶解能を示すことが知られている<sup>71)</sup>。これは Ras が活性化された癌細胞において、ウイルス増殖に抑制的に働く dsRNA 依存性プロテインキナーゼ活性が顕著に低下しているためと考えられている。

MRV-1, MRV-2, MRV-3 型は Ras 活性を伴う癌細胞において、腫瘍溶解能を示すことが報告されており<sup>72)</sup>、その中でも殺腫瘍能の高い MRV-3 型が腫瘍溶解性ウイルスとして研究されている。カナダの Oncolytics Biotech 社は抗癌ウイルス製剤として、野生型の MRV-3 型を Reolysin という薬剤名で癌治療研究を進めており、これまで様々な癌種（膵臓癌、前立腺癌、大腸癌、乳癌、頭頸部癌等）を対象とした基礎・臨床研究が行われている<sup>73-77)</sup>。特に頭頸部癌患者を対象とした化学療法（パクリタキセル、カルボプラチン）と併用する臨床試験では、第 II 相試験で良好な成績を収め、第 III 相試験が実施されており、今後の経過が待たれる<sup>77)</sup>。

他の腫瘍溶解性ウイルスとして、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた癌治療研究が精力的に行われている。これらのウイルスでは遺伝子改変により安全性の向上、癌細胞での選択的増殖能の付加、感染指向性の制御、抗腫瘍活性の増強などを行うことで、様々な癌に対する治療効果が検討されている<sup>78-80)</sup>。近年、より効果的な治療効果を得るため、IL-2, GM-CSF などのサイトカイン遺伝子を搭載し、癌免疫誘導能を高める工夫が施された組換えウイルスを用いた研究成果が目ざされている。Bio Vex 社の GM-CSF を搭載した単純ヘルペスウイルス 1 型 (OncoVEX GM-CSF) は転移性悪性黒色腫を対象とした第 III 相試験まで進んでおり<sup>81)</sup>、今後の成果が期待されている。一方、MRV については、これまで野生型のウイルスのみが癌治療研究に用いられていることから、安全性や殺腫瘍効果の観点からさらなる改良が望まれている。腫瘍溶解活性を増強した MRV 作製の試みは、培養細胞での継代により得られた殺腫瘍能の高い MRV-3 型ク

ローンの分離報告例のみであり<sup>82)</sup>、遺伝子改変技術を応用した腫瘍溶解性組換え MRV の開発研究は皆無である<sup>83)</sup>。MRV の安全性、元来の選択的腫瘍溶解性、既に多くの臨床研究から得られている癌治療に対する有用性を考慮すると遺伝子改変技術による腫瘍溶解性 MRV の開発研究の進展が今後の MRV による癌治療研究の発展において重要な鍵になるものと考えられる。

### 5. MRV を用いたワクチンベクターの開発研究

MRV は安全性が極めて高いこと、高力価のウイルス調製が容易であること、高粘膜炎誘導能を有すること等、ウイルスベクターとして優れた特性を保持している。そのため、腫瘍溶解性ウイルスとしての研究が進む一方、MRV をワクチンベクターとして利用する試みも行われている。これまで、外来遺伝子を発現する MRV として、CAT 遺伝子、GFP 遺伝子を発現する組換えウイルスが作製されている<sup>64,65)</sup>。しかし、これらの組換えウイルスは MRV 分節遺伝子の ORF とレポーター遺伝子を置換したものであり、構造タンパク質が発現されないことから、複製能を欠損している。増殖能をもつ外来遺伝子発現組換え MRV の作製については、 $\sigma 1$  の C 末端領域にヒスチジンタグやヘマグルチニンタグ等の短いペプチド配列を付加した組換え MRV が最初に報告された<sup>84)</sup>。次いで、2013 年、Demidenko らは、サル免疫不全ウイルス (SIV) の *gag* 遺伝子 (~900-bp) を発現するウイルスの作製に成功した<sup>85)</sup>。Demidenko らはこの SIV Gag 発現 MRV を作製するため、自己切断活性を有する *Thosea asigna virus* 由来 2A ペプチド配列を介して SIV *gag* 遺伝子を MRV-3 型 L1 遺伝子上流に連結したコンストラクトを構築した。次いで、構築した SIV Gag と MRV  $\lambda 3$  のバイシストロニック発現が可能な L1 遺伝子改変プラスミドを他の 9 つの MRV-3 型由来分節遺伝子プラスミドと同時に培養細胞に導入することで目的の組換え MRV を作製した。さらに、Demidenko らは感染マウスにおいて Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞応答も確認しており、これらの成果は、MRV のワクチンベクターとしての有用性を示している。

MRV のワクチンベクター開発研究は、歴史も浅く、今後、検討されなければならない課題も多く存在する。しかし、MRV は動物実験において、効率的に腸管組織 (M 細胞) に感染し、粘膜免疫を誘導することが知られている<sup>17,86-88)</sup>。また、腫瘍溶解性ウイルスとしての研究から既にヒトへの安全性も確認されていることから、MRV は粘膜を介して感染する病原体に対して非常に有効性が高い経口投与型の新規ワクチンベクターとして、今後、さらなる基礎研究の進展が望まれる。

### 6. ヒトに病原性を示すコウモリ由来レオウイルス

近年、コウモリは SARS コロナウイルス、ニパウイルス、

エボラウイルス、狂犬病ウイルスなど多くの致死感染を引き起こす人獣共通感染症の自然宿主として考えられている<sup>89)</sup>。オルソレオウイルス属のウイルスについては、これまで重大なヒト疾患との関連性は報告されてこなかった。しかし、2007 年、Chua らはマレーシアにおいて重篤な呼吸器疾患を呈した患者から新規の呼吸器系ウイルスを分離し、電子顕微鏡学的解析およびシーケンス解析の結果から、過去にオオコウモリから分離されている PRV と非常に相同性が高いウイルス (PRV Melaka 株) であることを報告した<sup>3,90,91)</sup>。PRV 感染患者は、発症する 1 週間前にコウモリとの接触歴があったことから、コウモリから直接感染し、発症に至ったものと考えられている。感染患者の発症後に家族も同様の症状を呈し、血清学的解析から感染患者家族も PRV に感染していたことが明らかにされていることから、水平感染も示唆されている。さらに、発生地域における大規模な疫学調査結果から、有意な抗体保有率 (約 13%) が示されたことで、流行・常在化が懸念されている<sup>3)</sup>。Melaka 株の報告以降、東南アジア、中国で同様の PRV 感染例が報告されている<sup>4-7,92)</sup>。

日本国内においては、宮崎県衛生環境研究所、日南保健所、宮崎市保健所、県立宮崎病院、宮崎県健康増進課、国立感染症研究所および筆者らの共同研究グループが、PRV のヒト感染例を報告している<sup>8)</sup>。感染患者は、2007 年にインドネシアから帰国後、急性の呼吸器症状を呈した。当初は高病原性鳥インフルエンザ感染が疑われたが、検査の結果は陰性であり、他の既知の呼吸器ウイルス感染症についても検出されなかった。そこで、新興ウイルス感染症の網羅的検出方法 (RDV 法)<sup>93)</sup> を用いて解析を行った結果、PRV グループにきわめて類似した遺伝子を検出した。さらに、PRV 特異的プライマーを設計し、増幅した S 分節遺伝子のシーケンス解析の結果から、本分離ウイルスは、PRV グループに属するウイルス (PRV Miyazaki-Bali/2007 株) と同定された (図 5)。この感染患者にコウモリとの接触は確認されていないことから、感染経路は不明であった。本事例では、感染患者家族や医療関係者を含む濃厚接触者の血清学的解析結果は全て陰性であったことから、水平感染は認められていない。

これまでコウモリのみから分離されていた PRV のヒト感染例の報告は、PRV が種の壁を越え、ヒトに感染伝播した結果と推察される。コウモリを起源とする PRV がどのような機序でヒトに対して病原性を獲得したのかは明らかにされていない。今後、このような新型レオウイルス感染症に対して、ウイルスの同定・診断法、予防・治療法の開発研究だけでなく、複製機構や病原性発現機序に関する研究も推進することで、基礎的知見を蓄積し、感染制御基盤を確立することが急務である。

### おわりに

MRVはレオウイルス科のモデルウイルスとしてウイルス複製機構や病態発現機序の理解にこれまで大きな役割を果たしてきた。オルソレオウイルス属にはヒト疾患に関連するウイルスが含まれていないこともあり、この分野における研究はマイナーである。しかし、ヒトに病原性を示すPRVのようなウイルスが報告されたことを考慮すると、今後一層の研究の推進が望まれる。レオウイルス科において、簡便で効率の高いPlasmid-basedのリバースジェネティクス系が確立されているのはMRVのみである。今後さらに、MRVの基礎研究を進展させることで、レオウイルス科の研究分野の発展を牽引することが期待される。MRVはその安全性と選択的腫瘍溶解能から癌治療への医薬品応用が有望視されている。さらに、遺伝子改変技術によるワクチンベクター開発の試みも行われている。現在、筆者らのグループもMRVのリバースジェネティクス系を駆使し、殺腫瘍能を向上させたMRV、様々な外来遺伝子発現MRVベクターの開発研究を精力的に行っている。これらのMRV研究の進展が基礎ウイルス研究ばかりでなく、医学応用分野の発展にも大きく貢献することを切に願う。

### 参考文献

- 1) Rosenberger, JK, Fries, PA, Cloud, SS, Wilson, RA. In vitro and in vivo characterization of avian Escherichia coli. II. Factors associated with pathogenicity. Avian Dis 29, 1094-1107, 1985.
- 2) Duncan, R, Murphy, FA, Mirkovic, RR. Characterization of a novel syncytium-inducing baboon reovirus. Virology 212, 752-756, 1995.
- 3) Chua, KB, Cramer, G, Hyatt, A, Yu, M, Tompang, MR, Rosli, J, McEachern, J, Cramer, S, Kumarasamy, V, Eaton, BT, Wang, LF. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 11424-11429, 2007.
- 4) Chua, KB, Voon, K, Cramer, G, Tan, HS, Rosli, J, McEachern, JA, Suluraju, S, Yu, M, Wang, LF. Identification and characterization of a new orthoreovirus from patients with acute respiratory infections. PLoS One 3, e3803, 2008.
- 5) Cheng, P, Lau, CS, Lai, A, Ho, E, Leung, P, Chan, F, Wong, A, Lim, W. A novel reovirus isolated from a patient with acute respiratory disease. J Clin Virol 45, 79-80, 2009.
- 6) Chua, KB, Voon, K, Yu, M, Keniscope, C, Abdul Rasid, K, Wang, LF. Investigation of a potential zoonotic transmission of orthoreovirus associated with acute influenza-like illness in an adult patient. PLoS One 6, e25434, 2011.
- 7) Wong, AH, Cheng, PK, Lai, MY, Leung, PC, Wong, KK, Lee, WY, Lim, WW. Virulence potential of fusogenic orthoreoviruses. Emerg Infect Dis 18, 944-948, 2012.
- 8) Yamanaka, A, Iwakiri, A, Yoshikawa, T, Sakai, K, Singh, H, Himeji, D, Kikuchi, I, Ueda, A, Yamamoto, S, Miura, M, Shioyama, Y, Kawano, K, Nagaishi, T, Saito, M, Minomo, M, Iwamoto, N, Hidaka, Y, Sohma, H, Kobayashi, T, Kanai, Y, Kawagishi, T, Nagata, N, Fukushi, S, Mizutani, T, Tani, H, Taniguchi, S, Fukuma, A, Shimojima, M, Kurane, I, Kageyama, T, Odagiri, T, Saijo, M, Morikawa, S. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. PLoS One 9, e92777, 2014.
- 9) Sabin, AB. Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. Science 130, 1387-1389, 1959.
- 10) Rosen, L. Serologic grouping of reoviruses by hemagglutination-inhibition. Am J Hyg 71, 242-249, 1960.
- 11) Furuichi, Y, Morgan, M, Muthukrishnan, S, Shatkin, AJ. Reovirus messenger RNA contains a methylated, blocked 5'-terminal structure: m-7G(5')ppp(5')G-MpCp. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 362-366, 1975.
- 12) Furuichi, Y, Muthukrishnan, S, Shatkin, AJ. 5'-Terminal m-7G(5')ppp(5')G-m-p in vivo: identification in reovirus genome RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 742-745, 1975.
- 13) Furuichi, Y, Muthukrishnan, S, Tomasz, J, Shatkin, AJ. Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m7GpppGmpC. J Biol Chem 251, 5043-5053, 1976.
- 14) Kozak, M, Shatkin, AJ. Characterization of ribosome-protected fragments from reovirus messenger RNA. J Biol Chem 251, 4259-4266, 1976.
- 15) Kozak, M. Nucleotide sequences of 5'-terminal ribosome-protected initiation regions from two reovirus messages. Nature 269, 391-394, 1977.
- 16) Kozak, M, Shatkin, AJ. Identification of features in 5' terminal fragments from reovirus mRNA which are important for ribosome binding. Cell 13, 201-212, 1978.
- 17) Dermody, TS, Parker, JS, Barbara, S. Orthoreoviruses. in Fields Virology (eds. Knipe, DM, Howley, PM) 1304-1346 (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, PA, 2013).
- 18) Coombs, KM. Stoichiometry of reovirus structural proteins in virus, ISVP, and core particles. Virology 243, 218-228, 1998.
- 19) Broering, TJ, Parker, JS, Joyce, PL, Kim, J, Nibert, ML. Mammalian reovirus nonstructural protein muNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein mu2 in transfected cells. J Virol 76, 8285-8297, 2002.
- 20) Becker, MM, Peters, TR, Dermody, TS. Reovirus sigma NS and mu NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection. J Virol 77, 5948-5963, 2003.
- 21) Miller, CL, Broering, TJ, Parker, JS, Arnold, MM, Nibert, ML. Reovirus sigma NS protein localizes to inclusions through an association requiring the mu NS amino terminus. J Virol 77, 4566-4576, 2003.
- 22) Broering, TJ, Kim, J, Miller, CL, Piggott, CD, Dinoso,

- JB, Nibert, ML, Parker, JS. Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *J Virol* 78, 1882-1892, 2004.
- 23) Wiener, JR, Bartlett, JA, Joklik, WK. The sequences of reovirus serotype 3 genome segments M1 and M3 encoding the minor protein mu 2 and the major non-structural protein mu NS, respectively. *Virology* 169, 293-304, 1989.
  - 24) Kobayashi, T, Chappell, JD, Danthi, P, Dermody, TS. Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference. *J Virol* 80, 9053-9063, 2006.
  - 25) Kobayashi, T, Ooms, LS, Chappell, JD, Dermody, TS. Identification of functional domains in reovirus replication proteins muNS and mu2. *J Virol* 83, 2892-2906 2009.
  - 26) Gillian, AL, Nibert, ML. Amino terminus of reovirus nonstructural protein sigma NS is important for ssRNA binding and nucleoprotein complex formation. *Virology* 240, 1-11, 1998.
  - 27) Gillian, AL, Schmechel, SC, Livny, J, Schiff, LA, Nibert, ML. Reovirus protein sigmaNS binds in multiple copies to single-stranded RNA and shares properties with single-stranded DNA binding proteins. *J Virol* 74, 5939-5948, 2000.
  - 28) Rodgers, SE, Connolly, JL, Chappell, JD, Dermody, TS. Reovirus growth in cell culture does not require the full complement of viral proteins: identification of a sigmaNS-null mutant. *J Virol* 72, 8597-8604, 1998.
  - 29) Hoyt, CC, Richardson-Burns, SM, Goody, RJ, Robinson, BA, Debiasi, RL, Tyler, KL. Nonstructural protein sigmaNS is a determinant of reovirus virulence and influences the kinetics and severity of apoptosis induction in the heart and central nervous system. *J Virol* 79, 2743-2753, 2005.
  - 30) Boehme, KW, Guglielmi, KM, Dermody, TS. Reovirus nonstructural protein sigmaNS is required for establishment of viremia and systemic dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19986-19991, 2009.
  - 31) Boehme, KW, Lai, CM, Dermody, TS. Mechanisms of reovirus bloodstream dissemination. *Adv Virus Res* 87, 1-35, 2013.
  - 32) Duncan, R, Corcoran, J, Shou, J, Stoltz, D. Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species. *Virology* 319, 131-140, 2004.
  - 33) Shmulevitz, M, Yameen, Z, Dawe, S, Shou, J, O'Hara, D, Holmes, I, Duncan, R. Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1 genome segments of avian reovirus and Nelson Bay reovirus: implications for translation initiation. *J Virol* 76, 609-618, 2002.
  - 34) Dawe, S, Duncan, R. The S4 genome segment of baboon reovirus is bicistronic and encodes a novel fusion-associated small transmembrane protein. *J Virol* 76, 2131-2140, 2002.
  - 35) Munemitsu, SM, Atwater, JA, Samuel, CE. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. Molecular cDNA cloning and nucleotide sequence of the reovirus serotype 1 Lang strain bicistronic s1 mRNA which encodes the minor capsid polypeptide sigma 1a and the nonstructural polypeptide sigma 1bNS. *Biochem Biophys Res Commun* 140, 508-514, 1986.
  - 36) Shmulevitz, M, Duncan, R. A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *Embo J* 19, 902-912, 2000.
  - 37) Costas, C, Martinez-Costas, J, Bodelon, G, Benavente, J. The second open reading frame of the avian reovirus S1 gene encodes a transcription-dependent and CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling protein. *J Virol* 79, 2141-2150, 2005.
  - 38) Martinez-Costas, J, Grande, A, Varela, R, Garcia-Martinez, C, Benavente, J. Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J Virol* 71, 59-64, 1997.
  - 39) Barton, ES, Forrest, JC, Connolly, JL, Chappell, JD, Liu, Y, Schnell, FJ, Nusrat, A, Parkos, CA, Dermody, TS. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104, 441-451, 2001.
  - 40) Kirchner, E, Guglielmi, KM, Strauss, HM, Dermody, TS, Stehle, T. Structure of reovirus sigma1 in complex with its receptor junctional adhesion molecule-A. *PLoS Pathog* 4, e1000235, 2008.
  - 41) Antar, AA, Konopka, JL, Campbell, JA, Henry, RA, Perdigoto, AL, Carter, BD, Pozzi, A, Abel, TW, Dermody, TS. Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell Host Microbe* 5, 59-71, 2009.
  - 42) Barton, ES, Connolly, JL, Forrest, JC, Chappell, JD, Dermody, TS. Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening. *J Biol Chem* 276, 2200-2211, 2001.
  - 43) Konopka-Anstadt, JL, Mainou, BA, Sutherland, DM, Sekine, Y, Strittmatter, SM, Dermody, TS. The Nogo receptor NgR1 mediates infection by mammalian reovirus. *Cell Host Microbe* 15, 681-691, 2014.
  - 44) Yan, X, Parent, KN, Goodman, RP, Tang, J, Shou, J, Nibert, ML, Duncan, R, Baker, TS. Virion structure of baboon reovirus, a fusogenic orthoreovirus that lacks an adhesion fiber. *J Virol* 85, 7483-7495, 2011.
  - 45) Maginnis, MS, Mainou, BA, Derdowski, A, Johnson, EM, Zent, R, Dermody, TS. NPXY motifs in the beta1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus entry. *J Virol* 82, 3181-3191, 2008.
  - 46) Maginnis, MS, Forrest, JC, Kopecky-Bromberg, SA, Dickeson, SK, Santoro, SA, Zutter, MM, Nemerow, GR, Bergelson, JM, Dermody, TS. Beta1 integrin mediates internalization of mammalian reovirus. *J Virol* 80, 2760-2770, 2006.
  - 47) Antczak, JB, Chmelo, R, Pickup, DJ, Joklik, WK. Sequence at both termini of the 10 genes of reovirus serotype 3 (strain Dearing). *Virology* 121, 307-319, 1982.
  - 48) Poncet, D, Aponte, C, Cohen, J. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* 67, 3159-3165 1993.
  - 49) Poncet, D, Laurent, S, Cohen, J. Four nucleotides are

- the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J* 13, 4165-4173, 1994.
- 50) Vende, P, Piron, M, Castagne, N, Poncet, D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74, 7064-7071, 2000.
- 51) Groft, CM, Burley, SK. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* 9, 1273-1283, 2002.
- 52) Mochow-Grundy, M, Dermody, TS. The reovirus S4 gene 3' nontranslated region contains a translational operator sequence. *J Virol* 75, 6517-6526, 2001.
- 53) Parker, JS, Broering, TJ, Kim, J, Higgins, DE, Nibert, ML. Reovirus core protein mu2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *J Virol* 76, 4483-4496, 2002.
- 54) Desmet, EA, Anguish, LJ, Parker, JS. Virus-mediated compartmentalization of the host translational machinery. *MBio* 5, e01463-01414, 2014.
- 55) Roner, MR, Bassett, K, Roehr, J. Identification of the 5' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virology* 329, 348-360 2004.
- 56) Roner, MR, Roehr, J. The 3' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virol J* 3, 1, 2006.
- 57) Roner, MR, Steele, BG. Localizing the reovirus packaging signals using an engineered m1 and s2 ssRNA. *Virology* 358, 89-97, 2007.
- 58) Roner, MR, Steele, BG. Features of the mammalian orthoreovirus 3 Dearing 11 single-stranded RNA that direct packaging and serotype restriction. *J Gen Virol* 88, 3401-3412, 2007.
- 59) Komoto, S, Sasaki, J, Taniguchi, K. Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4646-4651, 2006.
- 60) Boyce, M, Celma, CC, Roy, P. Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol* 82, 8339-8348, 2008.
- 61) Trask, SD, Taraporewala, ZF, Boehme, KW, Dermody, TS, Patton, JT. Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18652-18657, 2010.
- 62) Kaname, Y, Celma, CC, Kanai, Y, Roy, P. Recovery of African horse sickness virus from synthetic RNA. *J Gen Virol* 94, 2259-2265, 2013.
- 63) Trask, SD, Boehme, KW, Dermody, TS, Patton, JT. Comparative analysis of Reoviridae reverse genetics methods. *Methods* 59, 199-206, 2013.
- 64) Kobayashi, T, Antar, AA, Boehme, KW, Danthi, P, Eby, EA, Guglielmi, KM, Holm, GH, Johnson, EM, Maginnis, MS, Naik, S, Skelton, WB, Wetzel, JD, Wilson, GJ, Chappell, JD, Dermody, TS. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1, 147-157, 2007.
- 65) Roner, MR, Joklik, WK. Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8036-8041, 2001.
- 66) Roner, MR, Sutphin, LA, Joklik, WK. Reovirus RNA is infectious. *Virology* 179, 845-852, 1990.
- 67) Ishii, K, Ueda, Y, Matsuo, K, Matsuura, Y, Kitamura, T, Kato, K, Izumi, Y, Someya, K, Ohsu, T, Honda, M, Miyamura, T. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 302, 433-444, 2002.
- 68) Kobayashi, T, Ooms, LS, Ikizler, M, Chappell, JD, Dermody, TS. An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology* 398, 194-200, 2010.
- 69) Nibert, ML, Margraf, RL, Coombs, KM. Nonrandom segregation of parental alleles in reovirus reassortants. *J Virol* 70, 7295-7300, 1996.
- 70) Komoto, S, Kawagishi, T, Kobayashi, T, Ikizler, M, Iskarpatyoti, J, Dermody, TS, Taniguchi, K. A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase. *J Virol Methods* 196, 36-39, 2014.
- 71) Coffey, MC, Strong, JE, Forsyth, PA, Lee, PW. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282, 1332-1334, 1998.
- 72) Alloussi, SH, Alkassar, M, Urbschat, S, Graf, N, Gartner, B. All reovirus subtypes show oncolytic potential in primary cells of human high-grade glioma. *Oncol Rep* 26, 645-649, 2011.
- 73) Hirasawa, K, Nishikawa, SG, Norman, KL, Alain, T, Kossakowska, A, Lee, PW. Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. *Cancer Res* 62, 1696-1701, 2002.
- 74) Norman, KL, Coffey, MC, Hirasawa, K, Demetrick, DJ, Nishikawa, SG, DiFrancesco, LM, Strong, JE, Lee, PW. Reovirus oncolysis of human breast cancer. *Hum Gene Ther* 13, 641-652, 2002.
- 75) Etoh, T, Himeno, Y, Matsumoto, T, Aramaki, M, Kawano, K, Nishizono, A, Kitano, S. Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus. *Clin Cancer Res* 9, 1218-1223, 2003.
- 76) Thirukkumaran, CM, Nodwell, MJ, Hirasawa, K, Shi, ZQ, Diaz, R, Luiders, J, Johnston, RN, Forsyth, PA, Magliocco, AM, Lee, P, Nishikawa, S, Donnelly, B, Coffey, M, Trpkov, K, Fonseca, K, Spurrell, J, Morris, DG. Oncolytic viral therapy for prostate cancer: efficacy of reovirus as a biological therapeutic. *Cancer Res* 70, 2435-2444, 2010.
- 77) Kyula, JN, Roulstone, V, Karapanagiotou, EM, Melcher, AA, Harrington, KJ. Oncolytic reovirus type 3 (Dearing) as a novel therapy in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* 12, 1669-1678, 2012.
- 78) Cattaneo, R, Miest, T, Shashkova, EV, Barry, MA. Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nat Rev Microbiol* 6, 529-540, 2008.
- 79) Russell, SJ, Peng, KW, Bell, JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30, 658-670, 2012.

- 80) Miest, TS, Cattaneo, R. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat Rev Microbiol* 12, 23-34, 2014.
- 81) Kaufman, HL, Bines, SD. OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol* 6, 941-949, 2010.
- 82) Shmulevitz, M, Gujar, SA, Ahn, DG, Mohamed, A, Lee, PW. Reovirus variants with mutations in genome segments S1 and L2 exhibit enhanced virion infectivity and superior oncolysis. *J Virol* 86, 7403-7413, 2012.
- 83) Van Den Wollenberg, DJ, Van Den Hengel, SK, Dautzenberg, IJ, Kranenburg, O, Hoeben, RC. Modification of mammalian reoviruses for use as oncolytic agents. *Expert Opin Biol Ther* 9, 1509-1520, 2009.
- 84) Brochu-Lafontaine, V, Lemay, G. Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics. *J Virol Methods* 179, 342-350, 2012.
- 85) Demidenko, AA, Blattman, JN, Blattman, NN, Greenberg, PD, Nibert, ML. Engineering recombinant reoviruses with tandem repeats and a tetravirus 2A-like element for exogenous polypeptide expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1867-1876, 2013.
- 86) London, SD, Rubin, DH, Cebra, JJ. Gut mucosal immunization with reovirus serotype 1/L stimulates virus-specific cytotoxic T cell precursors as well as IgA memory cells in Peyer's patches. *J Exp Med* 165, 830-847, 1987.
- 87) London, SD, Cebra, JJ, Rubin, DH. Intraepithelial lymphocytes contain virus-specific, MHC-restricted cytotoxic cell precursors after gut mucosal immunization with reovirus serotype 1/Lang. *Reg Immunol* 2, 98-102, 1989.
- 88) Chen, D, Rubin, DH. Mucosal T cell response to reovirus. *Immunol Res* 23, 229-234, 2001.
- 89) Calisher, CH, Childs, JE, Field, HE, Holmes, KV, Schountz, T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 19, 531-545, 2006.
- 90) Pritchard, LI, Chua, KB, Cummins, D, Hyatt, A, Crameri, G, Eaton, BT, Wang, LF. Pulau virus; a new member of the Nelson Bay orthoreovirus species isolated from fruit bats in Malaysia. *Arch Virol* 151, 229-239, 2006.
- 91) Gard, G, Compans, RW. Structure and cytopathic effects of Nelson Bay virus. *J Virol* 6, 100-106 1970.
- 92) Voon, K, Chua, KB, Yu, M, Crameri, G, Barr, JA, Malik, Y, Wang, LF. Evolutionary relationship of the L- and M-class genome segments of bat-borne fusogenic orthoreoviruses in Malaysia and Australia. *J Gen Virol* 92, 2930-2936, 2011.
- 93) Mizutani, T, Endoh, D, Okamoto, M, Shirato, K, Shimizu, H, Arita, M, Fukushi, S, Saijo, M, Sakai, K, Lim, CK, Ito, M, Nerome, R, Takasaki, T, Ishii, K, Suzuki, T, Kurane, I, Morikawa, S, Nishimura, H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 13, 322-324, 2007.

# Orthoreoviruses

**Takeshi KOBAYASHI**

International Research Center for Infectious Diseases, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University  
3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan  
E-mail: tkobayashi@biken.osaka-u.ac.jp

Members of the genus *Orthoreovirus* in the family *Reoviridae* are nonenveloped, icosahedral viruses. Their genomes contain 10 segments of double-stranded RNA (dsRNA). The orthoreoviruses are divided into two subgroups, the fusogenic and nonfusogenic reoviruses, based on the ability of the virus to induce cell-to-cell fusion. The fusogenic subgroup consists of the avian reovirus, baboon reovirus, pteropine reovirus, and reptilian reovirus, whereas the nonfusogenic subgroup consists of the prototypical mammalian reovirus (MRV) species. MRVs are highly tractable experimental models for studies of segmented dsRNA virus replication and pathogenesis. Moreover, MRVs can selectively kill tumor cells and have been evaluated as oncolytic agents in clinical trials. This review provides a brief overview of current knowledge on the virological features of MRVs.