

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08801

研究課題名(和文) ハンタウイルスが誘導する免疫病原性発現機構

研究課題名(英文) Studies on immunopathogenesis of hantavirus infection

研究代表者

清水 健太 (Shimizu, Kenta)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：20466840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに研究代表者は腎症候性出血熱のマウスモデルを開発し、その病態発現にCD8陽性T細胞が関与することを明らかにした。本研究では強毒および弱毒株を用い、ウイルスの動態と宿主応答を比較解析し、病態発現メカニズムの解明を試みた。その結果、強毒株感染マウスではウイルス特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の活性化とともに、一部のCTLの機能抑制や細胞死が起こるが、新しいCTLの遊走も起こり、全体としてはCTLの活性が高い状態になっていることが示唆された。また、強毒株感染マウスではCTLの攻撃対象となるウイルス抗原の量が多く、排除も遅いためCTLによる攻撃が強く長く続き腎出血が起きていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハンタウイルス感染症は致死率の高い重要な疾患であるが、発症後の経過が急であることや、発生数が比較的少なく、診断が遅れることも多いため、患者の材料を用いて患者で起きていることを解析することが難しい。したがって、ヒトの病態を再現する動物モデルを確立することは病態発現メカニズムの解明や治療法の開発のため重要である。本研究では、近縁な病原性変異株を用いることで、病態関連因子を効率的にスクリーニングすることができた。今後さらに詳細なメカニズムを解明していくことで、治療法の開発に有用な情報を提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I have reported that CD8-positive T cells are related to the pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome by using a mouse model. In this study, I tried to elucidate the mechanism by which CD8-positive T cells cause disease by using closely related high and low pathogenic clones. The quantity of hantavirus-specific T lymphocytes (CTLs) in high pathogenic clone-infected mice was comparable to that in low-pathogenic clone-infected mice. However, high pathogenic clone-infected mice showed up-regulation of genes relating to the effector function and chemotaxis of CTLs as well as genes relating to the activation-induced cell death of T cells, suggesting higher activity of CTLs in high pathogenic clone-infected mice. Considering the efficient viral growth of high pathogenic clone in kidney, the balance between quantities of the target and effector would be also important for disease outcome.

研究分野：ウイルス学

キーワード：細胞傷害性T細胞 免疫病原性 出血熱 ハンタウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハンタウイルスは病原性の高い出血熱ウイルスのひとつで、ヒトに腎症候性出血熱およびハンタウイルス肺症候群を起こす。腎症候性出血熱はユーラシア大陸を中心に全世界に分布する旧世界ハンタウイルスの感染によって起こり、腎機能障害および出血傾向を特徴とする。ハンタウイルス肺症候群は南北アメリカに分布する新世界ハンタウイルスによって起こり、急性の呼吸不全を特徴とする。両疾患で症状や標的となる臓器は異なっているものの、どちらも宿主の免疫応答が病態に関与すると考えられている。しかし、そのメカニズムは解明されておらず、特異的な治療法も開発されていない。

研究代表者はこれまでに、腎症候性出血熱患者の血液から分離されたウイルスのクローン(以下、強毒株)を成熟 BALB/c マウスに静脈内接種することにより、腎症候性出血熱に特徴的な腎臓の出血性病変を発現させることに初めて成功した(図 1)。また、同じ分離ウイルスの中から、出血性病変を起こさないクローン(以下、弱毒株)を発見し、それらが持つウイルスタンパク質には1つのアミノ酸の違いしか存在しないことを明らかにした。さらに、抗体投与により CD8 陽性 T 細胞を減少させると出血性病変が起こらなくなることを明らかにした。しかし、CD8 陽性 T 細胞がどのようにして病態発現に関わるのか、明らかにはなっていない。



図 1. 腎症候性出血熱患者および疾患モデルにおける腎臓髄質の出血性病変

2. 研究の目的

強毒株と弱毒株の間の病原性の違いは、ウイルス糖タンパク質の1つのアミノ酸の違いで生じている。したがって、この2つの株を用いて比較解析すれば、病態発現に関連する現象を効率的にスクリーニングできると考えられる。そこで、本研究では、病原性の異なる強毒および弱毒株を用いて、ウイルスの増殖動態と宿主の免疫応答を比較解析し、CD8 陽性 T 細胞がどのようにして病気を起こすのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ウイルスの増殖動態の解析

培養細胞におけるウイルス増殖動態の解析

強毒および弱毒株をアフリカミドリザルの腎臓由来の Vero E6 細胞に接種し、4、6 および 8 日後に培養液を回収した。ウイルス力価 (focus-forming unit: FFU) を Vero E6 細胞を用いて測定した。

マウスにおけるウイルス増殖動態の解析

強毒および弱毒株 (10^5 FFU) を BALB/c マウス (6 週齢、メス) に静脈内接種した後、経時的に諸臓器を採取し、RNA 抽出、逆転写反応およびリアルタイム PCR によりウイルス RNA 量を測定した。

(2) T 細胞応答の解析

強毒および弱毒株を BALB/c マウスに静脈内接種した後、脾臓および腎臓を採取した。CD4、CD8、PD-1、CTLA-4 などのタンパク質の発現状態をフローサイトメーターを用いて解析した。ハンタウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の検出には、ウイルス糖タンパク質内の主要な CTL エピトープ (特異的な CTL によって認識される短いアミノ酸配列) を用いて合成した MHC テトラマー (標識物質をつけた CTL エピトープと MHC の複合体) を用いた。

(3) 腎臓における宿主の遺伝子発現応答の解析

強毒株、弱毒株およびウイルス希釈液を BALB/c マウスに静脈内接種し、6 日後に腎臓を採取し、RNA を抽出し、マイクロアレイにより宿主の各種遺伝子の発現量を比較解析した。

(4) 免疫抑制剤の治療効果の検討

シクロスポリン A は T 細胞の機能を抑制する薬剤で、CD8 陽性 T 細胞の反応が問題となる臓器移植後の拒絶反応や自己免疫性疾患の治療に使用されている。そこで、強毒株を BALB/c マウスに静脈内接種後、シクロスポリン A (15 および 7.5mg/kg/day) を腹腔内投与し、臨床症状の観察と腎出血の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) ウイルスの増殖動態の解析

強毒および弱毒株の Vero E6 細胞での増殖性を比較した結果、強毒株では徐々にウイルス力価が増加していき、8 日後に最も高くなった (5×10^5 FFU/ml) のに対し、弱毒株は 4 日後が最も高く (1×10^5 FFU/ml)、その後徐々に低下した。一方、マウス体内の腎臓における増殖性を比較した結果、3、6、9 および 12 日後のいずれの時点でも強毒株の方がウイルス RNA 量が多いことが明らかとなった (図2)。接種3日後が最も高く、その後減少していく傾向は同じであるが、減少していくスピードは強毒株の方が遅かった。この傾向は他の臓器でも認められた。

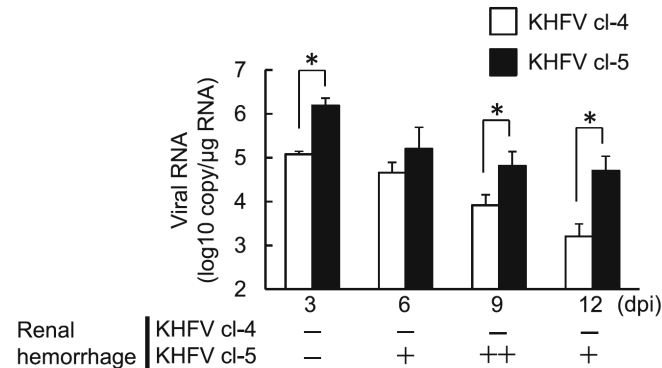


図2. 腎臓中のウイルス RNA 量および出血性病変の推移

(2) T 細胞応答の解析

まず、マウスの脾臓および腎臓中の CD8 陽性 T 細胞の数を強毒および弱毒株間で比較した。その結果、どちらのマウスにおいても CD8 陽性 T 細胞数は正常よりも著しく増加していたが、大きな差は認められなかった。CD8 陽性 T 細胞は抗原特異性を持った CTL となって抗原陽性細胞を攻撃する。そこで、次に、ハンタウイルス抗原特異的 CTL を MHC テトラマーを用いて検出し比較した。その結果、CTL の数にも株間で違いは認められなかった。ただ、腎臓中の CTL の割合は脾臓よりも著しく高く、CTL が腎臓に集中していることが明らかとなった (図3)。今回の方法では、MHC テトラマー上の CTL エピトープと MHC との複合体を認識して結合する細胞を検出することができるが、その細胞が攻撃する活性をどの程度持っているかはわからない。そこで、CTL の機能性を評価するため、CTL の機能抑制に関わる細胞表面分子の発現状態を解析した。その結果、予想に反し、PD-1 という抑制性分子を持つ CTL の数が弱毒株よりも強毒株の方が多いことが明らかとなった。他の抑制性分子である CTLA-4 を持つ CTL や免疫抑制に重要な制御性 T 細胞の数には違いが認められなかった。

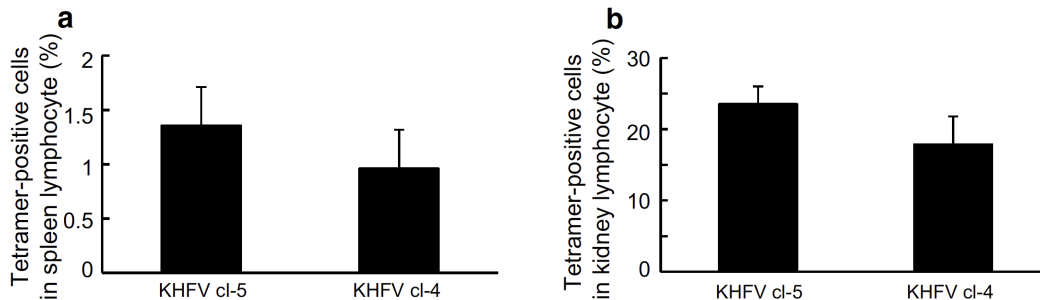


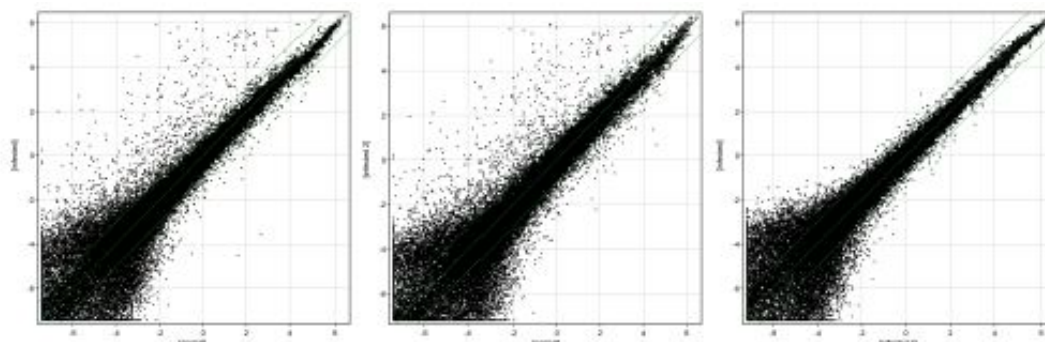
図3. 脾臓 (a) および腎臓 (b) のリンパ球中の MHC テトラマー陽性細胞の割合

(3) 腎臓における宿主の遺伝子発現応答の解析

強毒株感染マウス、弱毒株感染マウスおよび非感染マウスにおける宿主側の応答にどのような違いが認められるのか明らかにするため、発症する時期にあたるウイルス接種6日後の腎臓を材料として、宿主の各遺伝子の発現レベルを比較解析した。強毒株感染マウス、弱毒株感染マウスおよび非感染マウスの間の各組合せでの遺伝子発現の変動をプロットした散布図を図4に示した。非感染マウスと強毒株感染マウスの組合せと、非感染マウスと弱毒株感染マウスの組合せでは大きく発現変動する遺伝子が多数見つかり、特定の遺伝子を病態関連因子の候補とするのが困難であった。しかし、強毒株感染マウスと弱毒株感染マウスの組合せでは、発現変動する遺伝子が大きく減少した。このことは、この強毒株と弱毒株の組合せが病態関連因子を同定するための有用なツールになることを示している。強毒感染マウスでは、弱毒株感染マウスと比較して、発現レベルが2倍以上高い遺伝子が302、半分以下のものが154見つかった。各遺伝子の遺伝子機能を基に、発現上昇・発現低下遺伝子群のそれぞれで集積の認められる遺伝子機能カテゴリを検出する、Gene Ontology 解析を行った結果、発現上昇遺伝子群で「activation-induced cell death of T cells」という遺伝子機能カテゴリが検出された。個別の遺伝子の発現を調べると、活性化した T 細胞の細胞死に関わる遺伝子である siva1 および rps6 の発現量が強毒株感染マウスの方が高いことが明らかとなった。一方で、CTL による攻撃

に重要な遺伝子 (IFN- γ 、perforin および granzyme)、CTL を引きつけるケモカイン (CXCL9 および CXCL11) の発現量が強毒株感染マウスの方が高いことが明らかとなった (図 5)。

以上のことから、強毒株感染マウスでは、CTL の活性化とともに、一部の CTL の機能抑制や細胞死が起こるが、新しい CTL が補充され、全体としては CTL の活性が高い状態になっていると考えられる。そして、強毒株感染マウスでは CTL の攻撃対象となるウイルス抗原の量が多く、また排除がなかなか進まないために CTL による攻撃が長く続き、組織が傷害され腎出血が起きていると推測される。



a. 強毒株感染 vs 非感染 b. 弱毒株感染 vs 非感染 c. 強毒株感染 vs 弱毒株感染
 図 4. 全遺伝子発現変動の散布図

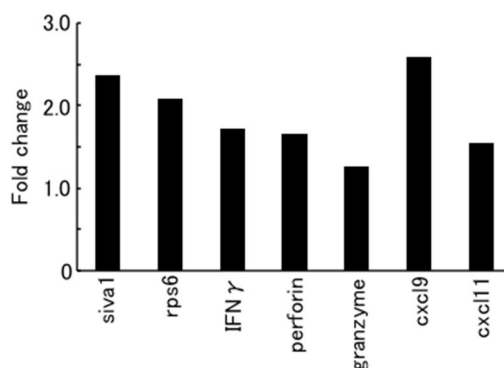


図 5. T 細胞の機能に関する遺伝子発現の変化

(4) 免疫抑制剤の治療効果の検討

T 細胞の機能を抑制する作用があり、移植後の拒絶反応の抑制や自己免疫性疾患の治療などに使用されている Cyclosporin A の治療効果の有無を調べた。しかし、薬剤投与群も溶媒投与群と同様に一過性の体重減少や被毛粗剛、腎臓の出血性病変が認められ、治療効果は認められなかった。T 細胞の機能の抑制により、腎臓中のウイルス量が増加することが確認されている。今後、ウイルス増殖を抑制する薬剤を併用するなどして、T 細胞の機能とウイルス量のバランスを考慮して検討する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimizu Kenta, Yoshimatsu Kumiko, Taruishi Midori, Tsuda Yoshimi, Arikawa Jiro	4. 巻 163
2. 論文標題 Involvement of CD8+ T cells in the development of renal hemorrhage in a mouse model of hemorrhagic fever with renal syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 1577-1584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-018-3786-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kenta Shimizu, Takaaki Koma, Kumiko Yoshimatsu, Yoshimi Tsuda, Yuji Isegawa, Jiro Arikawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Appearance of renal hemorrhage in adult mice after inoculation of patient-derived hantavirus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 Article No. 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-017-0686-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水健太、吉松組子、津田祥美、有川二郎
2. 発表標題 腎症候性出血熱のマウスモデルにおける病態発現にCD8陽性T細胞が関与する
3. 学会等名 第15回北海道実験動物研究会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----