

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08079

研究課題名(和文) 神経変性疾患における単純ヘルペスウイルス前初期タンパク質の関与の検証

研究課題名(英文) Examination of the involvement of herpes simplex virus immediate-early proteins in neurodegenerative diseases

研究代表者

富岡 幸子 (TOMIOKA, Yukiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：50374674

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)：単純ヘルペスウイルス(Herpes simplex virus: HSV)の前初期タンパク質 ICP4タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを作出した。このマウスの表現型解析を行い、少なくとも本実験系ではICP4が直接的な神経変性を誘導しないことが確認された。一方、本マウスでは膵外分泌の傷害が認められ、ウイルス感染現象によらずICP4タンパク質が単独で哺乳類細胞に影響を及ぼすことが強く示唆された。また、一部膵内分泌系にも傷害が及んでいる可能性も示唆されたことから、本マウスはヘルペスウイルスによる劇症膵炎とこれに続発する1型糖尿病のモデルとしての利用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単純ヘルペスウイルス(Herpes simplex virus: HSV)のタンパク質 ICP4を発現する遺伝子改変マウスを作出した。このマウスの表現型解析を行い、少なくとも本実験系ではICP4が直接的な神経変性を誘導しないことが確認された。一方、本マウスでは膵臓の傷害が認められ、ウイルス感染現象によらずICP4タンパク質が単独で哺乳類細胞に影響を及ぼすことが強く示唆された。以上より、本マウスはヘルペスウイルスによる劇症膵炎とこれに続発する1型糖尿病のモデルとしての利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Transgenic mice expressing immediate early protein ICP4 of Herpes simplex virus (HSV) were generated. Phenotypic analysis of these mice was performed, and it was confirmed that ICP4 does not induce direct neurodegeneration in at least this experimental system. On the other hand, severe pancreatic exocrine injury was observed in this mouse, strongly suggesting that ICP4 protein alone affects mammalian cells regardless of viral infection. Further, it was suggested that the pancreatic endocrine system may be partially damaged, and thus it can be expected that this mouse can be used as a model for fulminant pancreatitis due to herpes virus and secondary type 1 diabetes.

研究分野：獣医学

キーワード：疾患モデルマウス トランスジェニックマウス 病態・病理 ヘルペスウイルス 前初期タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルファヘルペスウイルスの前初期タンパク質 Immediate-early protein は感染後最初に転写・翻訳され初期・後期遺伝子の転写を活性化し、自己の転写を抑制する多機能な転写調節因子で、ウイルス遺伝子発現制御の中心的な役割を担っている。さらに、前初期タンパク質はウイルス自己のみならず動物細胞や他のウイルスの DNA にも結合して、遺伝子発現に影響を及ぼすと推察されている。我々は、これまでに、アルファヘルペスウイルスのうち特に顕著な神経向性を有するブタヘルペスウイルス 1 (仮性狂犬病ウイルス Pseudorabies Virus: PRV) に着目し、その前初期タンパク質 IE180 を発現するトランスジェニック (Tg) マウスの解析から、IE180 が中枢神経系、精巣、眼球等に様々な病態をもたらすことを示唆してきた。特に、IE180 Tg マウスでは小脳低形成をはじめとする著明な神経病変が認められ、この病変の本態は前初期タンパク質 IE180 の発現による神経細胞およびグリア細胞の変性や細胞死であった。一方、PRV と同じアルファヘルペスウイルス亜科に属し、近縁なウイルスである単純ヘルペスウイルス 1 型 (Herpes simplex virus type 1 : HSV-1) は長年アルツハイマー病やパーキンソン病などのヒト神経変性疾患に関与する可能性が示唆されているが (J Alzheimers Dis. 38:741-745, 2014; J Alzheimers Dis. 47:351-364, 2015; ParkinsonismRelat Disord. 21:877-881, 2015 等)、これら神経変性疾患と HSV-1 感染との明確な因果関係は未だ示されていない。また、「病変部でウイルス抗原が検出される」「神経変性疾患患者では HSV-1 抗体価が高い」といった症例対照研究がこの仮説の主な根拠になっていることから、直接的な因果関係については否定的な見解も多い。以上のような背景とこれまでの研究成果から、本研究では PRV の前初期タンパク質 IE180 のホモログにあたる HSV-1 前初期タンパク質 ICP4 が IE180 と同様にタンパク質単独で生体の遺伝子発現を攪乱する等して病態を発現する、特に神経変性をもたらしてヒト神経変性疾患に関与する可能性があると考え、発生工学手法を用いてこの仮説を検証することとした。

2. 研究の目的

本研究では、HSV-1 の前初期タンパク質 ICP4 がタンパク質単独で宿主の遺伝子発現を攪乱する等して病態を誘発し、特にヒト神経変性疾患に関与するという仮説を検証することを目的とした。具体的には、Cre-loxP システムを用いて、時期特異的に任意で ICP4 の発現を誘導できるトランスジェニックマウスを作出し、若齢期、成熟期あるいは胎生期に ICP4 の発現を誘導し、ICP4 により神経系を始めとする種々の組織に病変が誘導されるかを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) loxP-ICP4 Tg マウス系統の作出

Cre リコンビナーゼ存在下で ICP4 を発現する loxP-ICP4 Tg マウスをマイクロインジェクション法により作製し、導入遺伝子陽性のファウンダーマウス 4 匹を得て、4 系統を確立・維持した。

(2) Tg マウスにおけるタモキシフェン投与による時期特異的な ICP4 発現誘導

タモキシフェン投与によって全身で DNA 組換え酵素 Cre リコンビナーゼを発現するマウス (CAG CreER Tg マウス) と loxP-ICP4 Tg マウスとを交配したダブル Tg マウス (CAG CreER_loxP-ICP4 Tg マウス) を作出した。このダブル Tg マウスに 0.05% タモキシフェン添加粉末飼料を 14 日間給餌し、給餌による経口投与開始から 40 日間経過観察後に解剖・採材を行った。また、このダブル Tg マウスに 1 匹あたりタモキシフェン 3 mg を 5 日間腹腔内投与し、投与終了から 7 日または 21 日経過観察した後に解剖・採材を行った。脳を含む諸臓器および血清を病理組織学的、免疫組織化学的解析、遺伝子発現解析、血液生化学的解析に供した。

(3) Tg マウスにおける胎生期からの持続的な ICP4 発現誘導

全身で DNA 組換え酵素 Cre リコンビナーゼを発現するマウス (CAG Cre Tg マウス) と loxP-ICP4 Tg マウスとを交配したダブル Tg マウス (CAG Cre_loxP-ICP4 Tg マウス) を作出した。なお、本ダブル Tg マウスは胎生期より Cre リコンビナーゼならびに ICP4 を全身で発現することが予想される。8~12 週齢で解剖・採材を行い、脳を含む諸臓器および血清を病理組織学的、免疫組織化学的解析、遺伝子発現解析、血液生化学的解析に供した。

4. 研究成果

(1) CAG CreER_loxP-ICP4 Tg マウスにおける ICP4 発現誘導と病理発生

タモキシフェンの経口投与 (自由給餌投与) および腹腔内投与いずれにおいてもダブル Tg マウスで、膵臓組織の著しい萎縮・縮小と腹腔内脂肪組織の壊死が肉眼所見として認められた (図 1)。また、ダブル Tg マウスでは、ICP4

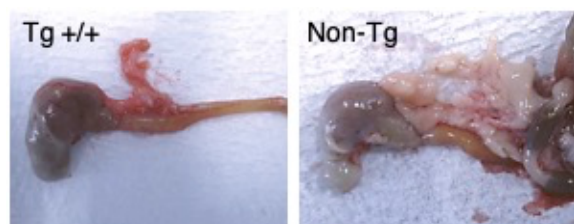


図 1 膵臓の肉眼所見

発現誘導後に体重が減少し、剖検時採取血清のリパーゼおよびアミラーゼは減少していた。病理組織学的には、膵臓では外分泌系組織（腺房細胞、導管細胞）の広範囲、重度な脱落が認められ、外分泌系組織の大半は脂肪組織に置換していた（図2）。膵島は脂肪組織中に残存して散在していた。肝臓では、微小な壊死巣が少数確認された。また、唾液腺では下顎腺の腺房細胞の脱落、舌下腺におけるリンパ球の集簇が確認された（図3）。抗 HSV-1 ICP4 抗体による免疫染色では、残存する膵島内に陽性の細胞がみられ、脱落部には陽性のマクロファージ様細胞が少数確認できた（図4）。肝臓では少数の肝細胞が弱陽性を示した。下顎腺では脱落部位に浸潤したマクロファージや一部の導管細胞が陽性を示した。病変部およびその近傍において少数の ICP4 陽性細胞が確認された（図4）。一方、IE180 Tg マウスで見られたような中枢神経系、眼、精巣の発生異常やこれら臓器構成細胞における変性・壊死等は認められず、行動異常や運動機能失調も観察されなかった。以上より、ICP4 は成熟マウスにおいて膵臓や唾液腺といった消化器系外分泌組織を傷害し、消化酵素の異常や体重減少をもたらすことが示唆された。

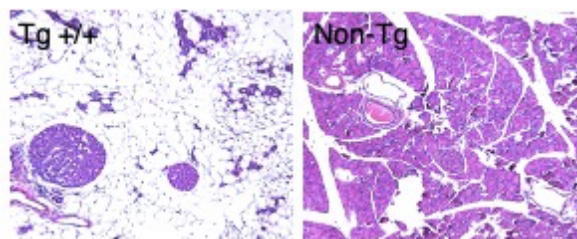


図2 膵臓の組織学的所見

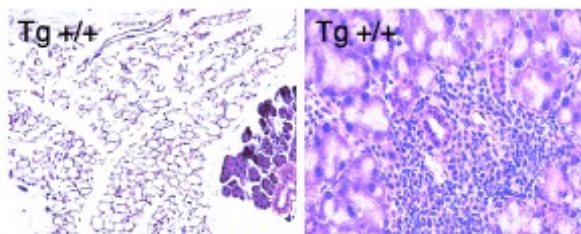


図3 唾液腺の組織学的所見

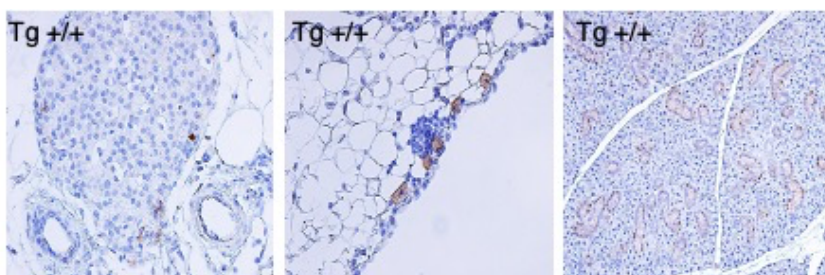


図4 免疫組織化学：抗 ICP4 抗体による免疫染色像、左から膵臓（膵島）、膵臓（外分泌）、下顎腺

(2) 胎生期からの ICP4 を発現する CAG Cre_loxP-ICP4 Tg マウスの病理発生

ダブル Tg マウスでは、CAG CreER_loxP-ICP4 Tg マウスにタモキシフェンを投与し ICP4 発現を誘導した際と同様に、肉眼で膵臓組織の著しい萎縮・縮小が認められた。また、眼球水晶体の白濁が観察された（図5）。病理組織学的にも、膵外分泌系組織の広範囲、重度な脱落と脂肪化が認められた。膵島は脂肪組織中に少数残存して散在していた。タモキシフェン投与により成熟個体で ICP4 発現を誘導した CAG CreER_loxP-ICP4 Tg マウスと同様に、IE180 Tg マウスで見られたような中枢神経系や精巣の異常や行動異常・運動機能失調は観察されなかった。以上より、胎生期から ICP4 を発現したマウスにおいても、ICP4 の発現により膵臓や唾液腺といった消化器系外分泌組織が傷害されることが示唆された。



図5 眼球の肉眼所見

(3) 得られた成果の意義と今後の展望

任意の時期あるいは胎生期から ICP4 を発現させたマウスにおいて共通して膵外分泌細胞の変性・壊死・細胞の脱落が認められ、ウイルス感染現象によらず ICP4 タンパク質が単独で哺乳類細胞に影響を及ぼすことが強く示唆された。また、胎生期から ICP4 を発現させた場合、その影響は膵内分泌系にも及び、糖尿病性白内障を引き起こす可能性が推察された。今後、Tg マウスにおける膵内分泌系に関連する病態についても精査を進めることで、ヘルペスウイルスによる劇症膵炎ならびにこれに続発する1型糖尿病のモデルとしての確立が強く期待できる。

一方、本研究期間内では IE180 Tg マウスで認められたような中枢神経系の異常は認められず、ICP4 は中枢神経系の組織発生や細胞機能には影響を及ぼさないことが推察された。しかしなが

ら、消化器系外分泌組織における想定外の病態による系統維持の困難や動物施設改修工事による実験の制限等の理由より、本研究期間内では中枢神経系に関する精査が不足したことは否めない。したがって、今後は中枢神経系に特異的に ICP4 を高発現させる、神経変性のトリガーを付与するなど研究を展開させ、ヒト神経変性疾患における ICP4 の関与についても引き続き検証を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	小野 悦郎 (ONO Etsuro) (00160903)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	