

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591216

研究課題名（和文）亜急性硬化性全脳炎由来の麻疹ウイルスが利用する  
細胞レセプターの解析研究課題名（英文）Analysis of host cellular receptors used by measles viruses  
derived from subacute sclerosing panencephalitis

研究代表者

綾田 稔（AYATA MINORU）

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90222702

研究成果の概要（和文）：亜急性硬化性全脳炎（SSPE）由来の麻疹ウイルスの変異とレセプターとの結合能、および神経病原性への関与を検討した。その結果、SSPE の神経病原性に F および H 蛋白の変異が関与すること、特に、F 蛋白のアミノ酸置換が重要であることを明らかにした。また、H 蛋白のアミノ酸置換がレセプターとの結合能に影響すること、特に、未知のレセプターとの結合に重要と思われる領域の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mutations found in measles viruses derived from subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) was evaluated for the relationship to the binding activity to receptors and to the neurovirulence. Amino acid substitutions found in the F and H proteins, especially those found in the F protein, were responsible for the neurovirulence. Amino acid substitutions in the H protein affected the binding activity to the receptor(s) and a region in the H protein responsible for the binding to the unknown receptor was defined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：麻疹ウイルス・亜急性硬化性全脳炎・レセプター・神経病原性・細胞融合

## 1. 研究開始当初の背景

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は、小児の予後不良の疾患である。通常の麻疹ウイルスとの比較研究から、SSPE の特徴が明らかになってきた。すなわち、(1) SSPE から分離された麻疹ウイルスには、共通して生物学

的・遺伝的特徴が認められる。また、(2) SSPE 由来の麻疹ウイルスをハムスターに脳内接種すると、急性脳症を引き起こして死滅する。

しかしながら、ウイルスのエンベロープ蛋白の変異と細胞指向性との関係、生体内、特に神経組織におけるレセプターの特性、神経

病原性との関係、免疫に関わる分子との相互作用については不明な点が多い。

近年の技術革新により、組換え麻疹ウイルスを作製することが可能となり、これらの問題を解決できるようになった。

## 2. 研究の目的

ウイルス遺伝子のインビトロの発現実験結果、組換え麻疹ウイルスの感染実験結果をふまえて、麻疹ウイルスの神経病原性発現のメカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、

- (1) 細胞融合の増強および神経病原性に関する F 蛋白のアミノ酸の特定、
- (2) 未同定のレセプターとの結合に関与する H 蛋白の領域の決定、
- (3) P 遺伝子産物等、その他のウイルス蛋白の神経病原性との関連、
- (4) 脳内での感染拡大に関与するレセプター候補の性状解析、を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 各種アミノ酸置換を導入した F および H 蛋白を発現するプラスミドの作製と共発現による機能解析

F および H 蛋白にアミノ酸置換を導入し、それぞれのアミノ酸置換による影響を解析するため、F 蛋白と H 蛋白を共発現させて、細胞融合能の変化を観察した。また、これらの変異をもつ組換え麻疹ウイルスを作製して、感染性、および神経病原性の変化を培養細胞やハムスターへの感染実験で検討した。

(2) SSPE 由来の各種蛋白を発現する組換え麻疹ウイルスの作製

麻疹ウイルス IC-B 株をベースとした麻疹ウイルス遺伝子の全長をコードするプラスミド p(+)<sub>MV323</sub> を基に、SSPE 由来の各種遺伝子を組換えた。次に、このプラスミドを N、P、L 蛋白を発現するプラスミドと共に細胞にトランスフェクトし、T7 ポリメラーゼを発現するワクチニアウイルスを感染させることにより遺伝子の複製を誘導して組換え麻疹ウイルスを作製した。

(3) ハムスターへの感染実験

組換え麻疹ウイルスをハムスターの脳内に接種し、神経症状の発現を観察し、発症率、死亡率を比較検討した。また、一部のハムスターを殺処分して、ウイルスの再分離を行い、回収されたウイルスの遺伝子解析、および脳の病理学的検索を行った。

## 4. 研究成果

(1) SSPE 大阪 2 株の F 蛋白のアミノ酸置換と細胞融合能との関連

大阪 2 株の F 蛋白に生じたどのアミノ酸変異が Vero 細胞における細胞融合能に重要なのかを検討した。その結果、大阪 2 株の F 蛋白の細胞外ドメインに生じた 4 か所のアミノ酸置換の中で、461 番目のアミノ酸置換 (T461I) が最も重要であり、この変異のみをもつ F 蛋白と野生株の H 蛋白とを Vero 細胞で発現させると、1 日後には明瞭なシンシチウムを形成した (図 1)。また、Y442D の変異によってもトランスフェクション 2 日後にはシンシチウムが形成された。これに対して、L197I、E478G のアミノ酸置換は細胞融合能に影響を与えなかった。

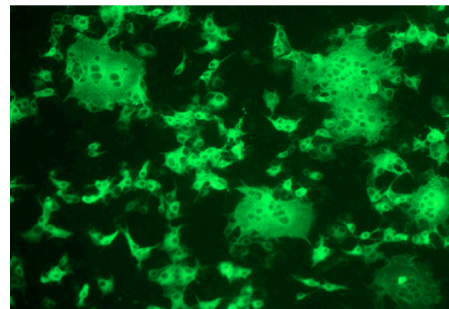
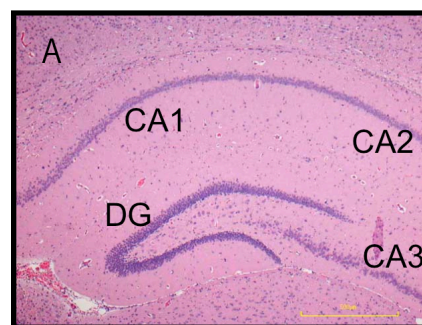


図 1. T461I 置換をもつ F 蛋白によるシンシチウム形成

(2) SSPE 大阪 2 株の F 蛋白のアミノ酸置換と神経病原性との関連

次いで、これらのアミノ酸置換をもつ組換え麻疹ウイルスを作製して検討した。大阪 2 株の F 蛋白の細胞外ドメインをもつウイルスはハムスターに対して強い神経病原性を示した。すなわち、脳内接種数日後には神経症状を呈して発症し、死滅した。さらに、F 蛋白に T461I 変異のみをもつ組換え麻疹ウイルスを接種したハムスターも短時日の後に発症し、6 匹中 5 匹が死滅した。また、Y442D 変異のみをもつ組換え麻疹ウイルスを接種したハムスターも同様に発症 (6 匹中 5 匹) したが、死亡率は低く (発症 5 匹中 1 匹)、多くは回復した。

これらのハムスターについて病理学的検索を行ったところ、発症したハムスターの海馬の CA1 から CA3 領域にかけて、神経細胞の広範な壊死が認められた (図 2)。



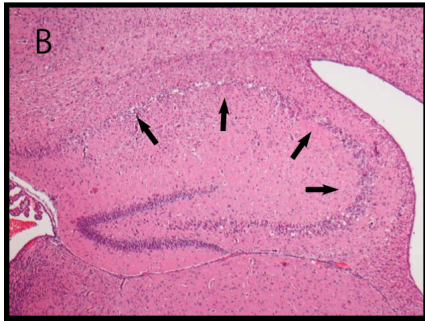


図2. ウイルス接種ハムスターの脳病変  
A, 野生型 IC323 ウイルス接種ハムスター  
B, F 蛋白に T461I 置換をもつ変異ウイルス

以上の(1)と(2)の結果から、F 蛋白のわずかなアミノ酸の置換でハムスターにおける神経病原性が生じること、この神経病原性の程度と Vero 細胞における細胞融合能とが関連していることが明らかになった。

#### (3) SSPE 大阪 1 株の F 蛋白のアミノ酸置換と細胞融合能との関連

F 蛋白のアミノ酸置換部位は SSPE 株によって異なることから、大阪 2 株と同じ方法を用いて、大阪 1 株について検討した。

各種 F 蛋白と野生株の H 蛋白とのトランスフェクションの実験を行った結果、大阪 2 株についても F 蛋白の細胞外ドメインが Vero 細胞における細胞融合能に重要であり、さらに F<sub>2</sub> 領域のみでも Vero 細胞でシンシチウムが形成されることが明らかになった。この領域には 3 か所のアミノ酸置換 (I62T、T82I、M94V) が生じているが、中でも M94V の置換が最も重要で、I62T もしくは T82I の置換が加わると細胞融合能はさらに増強した (図 3)。一方、F<sub>1</sub> 細胞外領域には 3 か所のアミノ酸置換 (A167T、N191S、H419Q) が生じているが、F<sub>2</sub> 領域よりも弱い細胞融合増強が認められた。単独のアミノ酸置換ではほとんど細胞融合の増強は認められなかったが、A167T のアミノ酸置換と F<sub>2</sub> 領域の M94V との二重置換で効率よく細胞融合を誘導することが明らかになった。

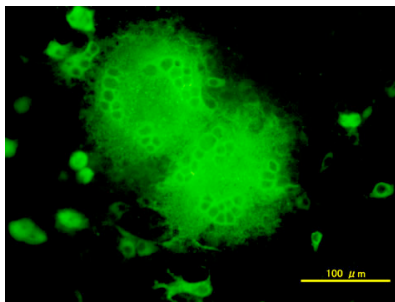


図3. M94V と T82I の置換を持つ F 蛋白によるシンシチウム形成

#### (4) SSPE 大阪 1 株の F 蛋白のアミノ酸置換と神経病原性との関連

SSPE 大阪 1 株の F 蛋白のアミノ酸置換をもつ組換え麻疹ウイルスを作製して検討した。大阪 1 株の F 蛋白の細胞外ドメインをもつウイルスはハムスターに対して強い神経病原性を示した。すなわち、脳内接種 3 日後には神経症状を呈して発症し、その 2、3 日後には 5 匹全て死滅した。さらに、F 蛋白の F<sub>2</sub> 領域のみを置き換えた組換え麻疹ウイルスを作製してハムスターに脳内接種したところ、接種 4 日後には神経症状を呈して発症し、その 2 日後には 5 匹全て死滅した。

以上の(3)と(4)の結果から、F 蛋白のわずかなアミノ酸置換でハムスターにおける神経病原性が生じること、この神経病原性の程度と Vero 細胞における細胞融合能とが関連していることが大阪 1 株においても明らかになった。大阪 1 株の F 蛋白のどのアミノ酸が神経病原性にとって最も重要かについては、現在検討中である。

#### (5) SSPE 株の H 蛋白のアミノ酸置換と神経病原性との関連

SSPE の H 蛋白のアミノ酸置換の神経病原性への関与を調べるために、組換え麻疹ウイルスを作製してハムスターに脳内接種して検討した。大阪 2 株の H 遺伝子をもつ組換え麻疹ウイルス (2,900PFU) を脳内接種すると、4 匹中 2 匹が接種 7 および 11 日後に発症し、3 ないし 4 日後に瀕死の状態になった。病理組織学的検索の結果、海馬の CA1 領域に神経細胞の壊死が認められた (図 4)。

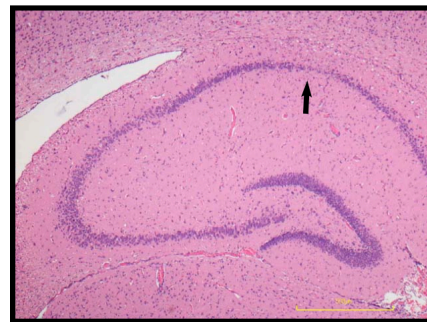


図4. 大阪 2 株の H 遺伝子組換え麻疹ウイルスを接種したハムスターの脳病変

F 遺伝子組換え麻疹ウイルスの場合よりも発症率、死亡率共に低かったが、明らかに神経病原性に関与していることが示された。大阪 1 株の H 遺伝子をもつ組換え麻疹ウイルス (5,000PFU) を脳内接種すると、6 匹全てが接種 6 から 10 日後に発症したが、そのうちの 5 匹は回復して長期生存した。したがって、大阪 1 株についても H 蛋白のハムスターにお

ける神経病原性への関与が示された。H 蛋白のアミノ酸置換の中でどの領域のどのアミノ酸が重要かについては今後の課題である。

#### (6) SSPE 株の H 蛋白が認識するレセプターの解析

SSPE 株の H 蛋白は SLAM を認識することはできるが CD46 を認識する変異は生じていないことが明らかになっている。また、CD46 は発現しているが、SLAM の発現の無い Vero 細胞に感染できることから、SLAM および CD46 以外のレセプターを利用できることが示唆される。SSPE 株の F 蛋白との共発現実験から、神経系の細胞、すなわちヒト神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞や SK-N-SH 細胞、ヒト希突起細胞腫由来の A172 細胞に存在する未知のレセプターにも結合できることが示された。また、ハムスターやマウスの脳で感染し発症することから、ヒト以外の神経系細胞のレセプターにも結合できることが推定される。そこで、これまで明らかにされたレセプターとの結合を無効にするアミノ酸置換を各種ウイルス株の H 蛋白に導入して、既知および未知のレセプターとの結合能について、培養細胞を用いた共発現実験で検討した。

まず、SLAM との結合を不能にすることが報告されているアミノ酸置換を各種ウイルスの H 蛋白に導入したところ、予想されたように SLAM との結合能が消失したが、Vero 細胞への結合は一部の株を除いて消失しなかった。したがって、SLAM との結合に重要なアミノ酸 529 番目 (Y529A) および 533 番目 (R533A) のアミノ酸置換は Vero 細胞上の未知のレセプターとの結合部位とは異なることが明らかになった。次に、これまで解析されていない H 蛋白の第 6 ベータプロペラ構造内のアミノ酸について検討した。H 蛋白のこの領域内の 1 か所のアミノ酸をアラニンに置換すると、調べた麻疹ウイルスのうち、2 つの株由来の H 蛋白で Vero 細胞におけるシンシチウム形成、すなわち未知のレセプターとの結合能が消失した。今後、このアミノ酸の置換およびその周辺領域についてさらに詳細な検討が必要である。また、現在、上皮系の細胞に存在すると報告されている未知のレセプター EpR との関連について検討するため、EpR との結合を無効にする P497S および Y543A のアミノ酸置換を導入した H 蛋白についても検討し、それぞれのレセプターの異同について明らかにする必要がある。

#### (7) GFP 発現組換え麻疹ウイルスの作製とハムスターにおける神経病原性

感染細胞におけるウイルスの感染拡大を追跡するための手段として、緑色蛍光蛋白 (GFP) を挿入することは有効である。大阪 2 株の F および H 遺伝子を組換え、かつ、N 遺

伝子の上流に GFP の遺伝子を挿入した組換え麻疹ウイルスを作製し、ハムスターに脳内接種したところ、GFP を持たないウイルスと同様に強い神経病原性を有していることが確認された。この手法を用いて、より詳細にウイルスの挙動を追跡することが可能になると予想される。

尚、当初予定していた P 遺伝子等の組換え麻疹ウイルスの実験については、未実施である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 綾田 稔 (代表)、竹内 薫、竹田 誠、扇本 真治、Luna Bhatta Sharma、石田 博、田中 美有、桑村 充、小倉 壽、SSPE 大阪 2 株の M、F、H 遺伝子をもつ麻疹ウイルスの作製とその性状、第 62 回日本細菌学会関西支部総会、2009 年 11 月 14 日、大阪府立大学りんくうキャンパス多目的ホール (大阪)

② 綾田 稔 (代表)、加藤誠一、Luna Bhatta Sharma、扇本 真治、小倉 壽、Vero 細胞における細胞融合に関与する麻疹ウイルス F 蛋白のアミノ酸置換、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山コンベンションセンター (岡山)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

綾田 稔 (AYATA MINORU)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90222702

##### (2) 研究分担者

石田 博 (ISHIDA HIROSHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医  
研究者番号：50382081  
(H20 年度および H21 年度は連携研究者)  
扇本 真治 (OHGIMOTO SHINJI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80292853  
小倉 壽 (OGURA HISASHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10115222

##### (3) 連携研究者

石田 博 (ISHIDA HIROSHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医  
研究者番号：50382081  
(H19 年度は研究分担者)