

平成22年6月15日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19790349  
 研究課題名（和文） ウイルス侵襲が脳内グリア細胞のケモカイン産生を誘導する分子機序の解明  
 研究課題名（英文） Molecular analysis of virus-induced chemokine production in brain glial cells.  
 研究代表者 中道 一生（NAKAMICHI KAZUO）  
 国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官  
 研究者番号： 50348190

研究成果の概要（和文）： ウイルス侵襲を受けた脳において産生されるケモカインは感染局所への白血球の動員を促進し、病原体の排除に働くことが知られている。本研究は、ウイルス侵襲に対するグリア細胞のケモカイン応答を生体レベルで明らかにすることを目的とする。RNAウイルスもしくはDNAウイルスを接種したマウスの脳におけるケモカインの遺伝子発現様式を解析し、特定のケモカインの発現が増加することを示した。また、脳組織におけるケモカインの発現誘導を蛋白質レベルで明らかにした。

研究成果の概要（英文）： During virus infection, brain glial cells act as a source of chemokines, which facilitate the recruitment peripheral leukocytes into the central nervous system and orchestrate immune response against the infectious agent. In this study, spatial and temporal patterns of chemokine production were examined in the brains of virus-infected mouse. The results indicate that virus infection induces the expression of specific chemokines in the mouse brain.

## 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	0	1,200,000
2008年度	1,000,000	0	1,000,000
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,200,000		3,200,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、脳、神経、脳神経疾患、免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

多様な病原体によって侵襲を受ける末梢組織とは対照的に、脳組織では血液脳関門が防御柵として機能するため、その大部分が侵

入を阻止される。しかしながら、中枢神経系を標的とするウイルスは神経細胞間を伝播することで、もしくは末梢白血球の脳内移行や血管内皮細胞への感染を介することで防

壁を突破し、脳実質内に侵入する。

ケモカインは白血球の走化性を支配する低分子のサイトカインであり、システインモチーフによって4種類(CおよびCC、CXC、CX3C)のサブファミリーに分類される。傷害や侵襲を受けた脳の局所では、主としてミクログリアやアストロサイト等のグリア細胞がケモカインを分泌し、常在型免疫細胞としても機能するミクログリアの集積、ならびに末梢からの白血球の浸潤を促す。動員された免疫細胞は多彩なエフェクター機能を発揮し感染細胞や病原体の排除に働く。したがって、グリア細胞によるケモカイン応答は脳の防御システムの最前線において中心的な役割を担う。

## 2. 研究の目的

本研究は、脳へのウイルス侵襲に対してグリア細胞がケモカインを産生するメカニズムを生体レベルで明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

本研究では、実験動物としてマウスを用いた。各実験は国立感染症研究所動物実験委員会において倫理面での審査を受け、承認を得た上で実施した。また、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守し、①飼育環境の維持、ならびに②適切な麻酔処置、③速やかな安楽殺、等の動物愛護を最大限配慮した上で研究を実施した。C57BL/6J系統ならびにBALB/c系統のSPFマウス(雌)は日本SLCより購入し実験に用いた。

### (2) ウイルス

RNAウイルスとしてchallenge virus standard-11 (CVS-11)株の狂犬病ウイルス(RABV)を用いた。マウス神経芽種由来細胞(NA細胞)にRABVを接種した後、接種72時間以降に細胞培養上清を回収し、ウイルスストックを調製した。また、DNAウイルスとしてA2株のマウスポリオマウイルス(MPyV)を用いた。MPyVゲノムをマウス線維芽細胞に導入した後、培養上清からウイルスストックを調製した。

### (3) マウスへのウイルスの接種

RABVに対して感受性を有するC57BL/6J系統マウスの大腿部にRABVを接種し、症状ならびに体重をモニターした。ウイルス接種群において四肢の麻痺が生じるまでの段階で対照群およびウイルス接種群を下記の実験に用いた。MPyVをマウスに接種する際には、脳移行性の低さを考慮してウイルスを脳内に接種した。MPyVに対して感受性を有する

BALB/c系統マウスに深麻酔処置を施し、脳定位固定装置に固定した。外科的処置によって線条体に微小カテーテルを挿入した後、マイクロインジェクターを用いて約1 $\mu$ Lのウイルス液を接種した。接種直後(0日)および2日、4日、6日、8日、10日、12日、14日、30日後において対照群およびウイルス接種群を下記の解析に用いた。

### (4) 採材

対照群およびウイルス接種群のマウスに深麻酔処置を施した後、胸部を切開し、シリコンチューブを接続した注射針を左心室に留置した。右心耳を切開した後、ペリスタポンプを用いてシリコンチューブ内にPBSを送液し、血管内灌流による脱血処置を施した。全脳を摘出した後、拡大スコープを用いて大脳(嗅球、終脳)および間脳、脳幹(中脳、橋、延髄)、小脳を分離し、RNA抽出に供した。もしくはブレインスライサーを用いて2 mm厚の連続的な脳スライスを作製し、各脳スライスから核酸を抽出した。

### (5) リアルタイムPCRを用いた定量解析

上記の脳組織からDNAもしくは全RNAを抽出し、ウイルスゲノム量および宿主遺伝子の発現量を測定した。RABVのマイナス鎖ゲノムRNAに特異的なDNAプライマーを用いた逆転写反応を行い、cDNAを合成した。逆転写産物に含まれるウイルスcDNA断片をヌクレオプロテイン(N)遺伝子領域に対するプライマーを用いたリアルタイムPCRによって増幅した。また、全RNAからcDNAを合成し、ケモカイン(CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2, CXCL10)ならびにケモカイン誘導因子(IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ )の発現量を同様の手法により測定した。内部標準としてハウスキーピング遺伝子(GAPDH)のcDNA量を測定した後、各サンプルのRNA回収率およびcDNA合成効率を補正し、ウイルス接種による遺伝子発現量の変動を比較対照群と比較した。また、DNAサンプルに含まれるMPyVのゲノムDNA量を、特異的プライマーと蛍光プローブを用いたリアルタイムPCRにより測定した。

### (6) 免疫組織化学

マウスに深麻酔処置した後、組織固定液の血管内灌流によって固定処置を施した。マウス個体から脳を採取した後、凍結切片作成用コンパウンドに包埋した。凍結ミクロトームを用いて脳組織の凍結切片を作製した。得られた組織切片をスライドグラスに貼付した後、透過処理を施し、ケモカインもしくはウイルス蛋白質に対する特異的抗体と反応させた。その後、蛍光標識二次抗体を用いて目的の蛋白質を染色した。

#### 4. 研究成果

##### (1) RNAウイルスに対する脳のケモカイン応答様式

RNAウイルスに感染したマウスの脳におけるケモカインおよびケモカイン誘導因子の時間的・空間的な発現様式を解析した。典型的な向神経性ウイルスであるRABVをC57BL/6J系統マウスの大腿部筋肉内に接種した。接種当日ならびに1日、3日、5日、7日後において脳を採取した。この際、脳血管内に存在する血球系細胞における遺伝子発現量を除外するため、各個体に灌流による脱血処置を施した。大脳および間脳、小脳、脳幹におけるケモカインおよびケモカイン誘導因子の発現量の変動を調べた。ウイルス接種マウスの脳では、数種類のケモカイン(CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL5)の発現量が増大することが分かった。また、体重減少が生じる感染初期(5日後)においては、CXCL10が大脳以外の領域において、CCL2とCCL3、CCL5が脳幹と小脳において、CXCL2が小脳において応答することが分かった。加えて、四肢の麻痺が生じる接種7日付近では、ケモカインCXCL10およびCCL5の遺伝子発現が脳の各領域において顕著に誘導されることが分かった。さらに、ケモカインの発現を間接的に誘導する因子を調べるため、同様の手法によってサイトカインの発現パターンを解析した。感染初期では、インターフェロン(IFN- $\beta$ )が脳幹において、また、炎症性サイトカイン(IL1- $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ )が脳幹と小脳において顕著に発現誘導されることを示した。以上の結果から、①RABVの感染初期では脳の各領域においてケモカインの応答性に相違があること、②感染後期では特定のケモカイン(CXCL10, CCL5)の発現が脳全体において顕著に誘導されること、③脳におけるケモカインの発現誘導には炎症性サイトカインが関与すること、が示唆された。

##### (1) DNAウイルスに対する脳のケモカイン応答様式

RNAウイルスの感染時に観察された脳のケモカイン応答が、DNAウイルスを接種した場合においても生じるかどうかを調べた。DNAウイルスであるMPyVをマウスに接種し、脳におけるケモカイン応答様式を解析した。RABVと比較した場合、MPyVの脳指向性は低いため、ウイルス液を脳の特定部位に直接接種した。深麻酔処置したマウスを脳定位固定装置に固定し、脳内カニューレおよびマイクロインジェクターを用いて線条体にウイルスを接種した。接種直後から30日後までの段階にお

いて、マウスに灌流処置を施した後、脳から組織スライスを作製し、ウイルスゲノム量およびケモカイン/サイトカイン遺伝子の発現量をリアルタイムPCRによって測定した。MPyVを接種したマウスの脳では、ウイルスゲノムの増加に伴ってケモカインCCL5の発現量が増加することを示した。また、他のケモカインおよびサイトカインの発現量には変動が見られなかった。この結果から、MPyVは感染細胞においてCCL5の発現を直接的に誘導することが推察された。加えて、神経細胞間を伝播するRABVと比較して、感染細胞の核において蓄積するMPyVの脳内伝播は限定的であり、接種局所においてケモカイン応答が誘導されることが分かった。以上より、脳におけるCCL5の発現は、ウイルスゲノムの種類ならびに組織内の伝播様式に関わらず誘導されることを示した。

##### (3) ウイルス感染に対する脳のケモカイン応答の蛋白質レベルでの解析

上記の解析の結果、RNAウイルス(RABV)およびDNAウイルス(MPyV)に感染した脳では、特定のケモカイン(CXCL10, CCL5)の遺伝子発現が誘導されることが分かった。これらのケモカイン発現の誘導が蛋白質レベルで生じているかを調べた。RABVをC57BL/6マウスの大腿部筋肉内に接種した後、四肢の麻痺を呈した時点で血管内灌流による組織の固定処置を施した。マウス個体から脳を採取した後、脳組織の凍結切片を作製し、CXCL10もしくは狂犬病ウイルスに対する特異抗体と反応させた後、特異抗体に対する蛍光標識二次抗体を用いて目的の蛋白質を染色した。ウイルスを接種していないマウスの脳組織では、CXCL10の蛍光シグナルは認められなかった。これに対して、RABVを接種したマウスの脳組織においては、CXCL10陽性細胞がみられた。以上の結果から、ウイルス感染脳におけるケモカインCXCL10の発現誘導を蛋白質レベルで明らかにした。

##### (4) 成果の位置づけと今後の展望

近年、国内外の研究グループによって、ウイルス感染マウスの脳内における遺伝子発現プロファイルが報告されている。これらの研究では主としてマウス脳全体を対象とした遺伝子発現量の解析が行われており、またウイルス感染の進行に伴う時間的な変動については詳細が明らかでない場合が多い。本研究では、ウイルス感染脳におけるケモカインの時間的および空間的な発現誘導様式を明らかにした点において独創性を有すると考える。加えて、脳へのウイルス感染においてCXCL10およびCCL5といった特定のケモカインの発現が誘導されることを示し、CXCL10については脳組織における蛋白質レベルの発

現誘導を明らかにした。上記の結果から、脳内の抗ウイルス応答において、これらのケモカインが重要な役割を担っていることが示唆された。今後は脳組織におけるCCL5の発現誘導を蛋白質レベルで確認する必要がある。また、ウイルスを接種したマウスの脳組織における細胞内シグナル蛋白質の活性化を解析し、CXCL10およびCCL5の発現誘導に関与するシグナル経路を調べる必要がある。

#### 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1件)

① 中道一生、伊藤睦代、奴久妻聡一、森本金次郎、倉根一郎、西條政幸、定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析、第57回 日本ウイルス学会学術集会、2009年10月27日、都市センターホテル(東京都)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中道 一生 (KAZUO NAKAMICHI)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任  
研究官

研究者番号：50348190

##### (2) 研究分担者

無 ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

無 ( )

研究者番号：