

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07511

研究課題名(和文)糖鎖構造に着目したタイラーウイルス受容体の探索と脱髄疾患の制御

研究課題名(英文)Exploration of Theiler virus Receptors and Regulation of Demyelinating Diseases

研究代表者

武田 和也 (TAKEDA, KAZUYA)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：40393160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス(TMEV)感染による中枢神経系の脱髄疾患(TMEV-IDD)は、ヒトの多発性硬化症(MS)モデルの一つである。TMEV感染/脱髄発症におけるシアル酸/糖鎖の役割に着目し、遺伝子、タンパク質、糖鎖の解析を通じてTMEV受容体の同定/感染機序を解明し、これらを標的とした病態制御の可能性について検証することを目的とした。TMEV結合細胞と非結合細胞を比較し、TMEV非結合細胞でガングリオシドおよびシアル酸結合N型糖鎖が少ないことを明らかにした。加えて新たなTMEV受容体の候補タンパク質と、TMEV結合にシアル酸修飾が関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TMEV感染による脱髄疾患の発症機序の解明や病態の制御は、MSの理解や治療法について新たな知見を与えるものと期待される。したがってTMEVの感染受容体の同定は重要である。近年、TMEV感染による心筋炎モデルや、てんかん発作モデルが報告されており、本研究において見出した受容体候補タンパク質のさらなる解析により、これら疾患の理解や病態制御に新たな知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：TMEV-IDD, a demyelinating disease of the central nervous system caused by Theiler murine encephalomyelitis virus, (TMEV) infection, is a model of multiple sclerosis (MS) in humans. By comparing TMEV-bound and TMEV-unbound cells, we found that ganglioside and sialic acid-bound N-glycans were less abundant in TMEV-unbound cells. In addition, we found a new candidate protein for the TMEV receptor and the involvement of sialic acid modification in TMEV binding.

研究分野：免疫学

キーワード：タイラーウイルス 脱髄疾患 多発性硬化症

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は脳や脊髄などの中枢神経系 (CNS) における自己免疫性の炎症性脱髄疾患である。神経細胞の軸索を取り巻く髄鞘が免疫細胞による攻撃を受けて脱落することにより神経機能が障害を受ける。原因は未だ不明であるが、ウイルス排除に重要な役割を果たす I 型インターフェロン (I-IFN) の投与が再発防止に奏効することなどから、ウイルス感染が危険因子の一つとして疑われている。MS の疾患動物モデルとしては、髄鞘を構成するミエリンタンパク質を接種して免疫応答を誘導する実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) と、タイラマウス脳脊髄炎ウイルス (TMEV) 感染による脱髄疾患 (TMEV-IDD) が知られている。

TMEV は引き起こす病態によって二群に分類される。一つは致死性の脳脊髄炎を引き起こす GDVII 株などの強毒型であり、もう一つは DA 株などの弱毒型である。弱毒型は SJL などの一部の感受性マウスの系統において持続感染を引き起こし、脱髄を発症させる。また両群ともに、感染に寄与する糖鎖についての知見はあるが、受容体タンパク質は未だ不明である。

他の疾患モデルと同様に、遺伝子改変マウスの利用は EAE 発症に関わる多くの分子群を明らかにしてきた。しかしながら TMEV-IDD においては、遺伝子改変マウスとして汎用される B6 系統が抵抗性であり、ウイルスが排除され持続感染には至らないことから不明な点が多く残されている。脱髄の発症には TMEV の持続感染が必須であることから、感染機序の解明は非常に重要であり、TMEV 受容体 (TMEVR) の同定は不可欠である。

強毒株とは異なり、脱髄疾患を引き越す弱毒株の TMEV は、糖鎖末端に存在するシアル酸を除去するノイラミニダーゼ処理をした細胞への結合性が消失する (Zhou L et al. J Virol. 2000, Tsunoda I et al. J Neurovirol. 2009) ことから、細胞表面のシアル酸が結合や感染に重要な役割を果たしていると考えられる。強毒株については細胞表面のヘパラン硫酸がウイルスの結合に寄与している報告がある (Reddi HV et al. J Virol. 2002)。ガングリオシドはシアル酸を含む脂質であり、その一種である GM1 ガングリオシド (GM1) は神経細胞に多く発現し、受容体タンパク質やシグナル分子が集積する脂質ラフトに局在するなど、細胞間シグナル伝達に寄与している。また脊髄損傷においてガングリオシドの投与が奏効するなど、CNS においてガングリオシドは重要な役割を担っている。TMEV-IDD においても初期に神経細胞の傷害が見られ、ガングリオシドの投与により病原性の T 細胞を介して脱髄が抑制される (Inoue A et al. J Neuroimmunol. 1996) ことが報告されているが、TMEV 感染におけるガングリオシドの寄与については不明である。一方、末梢神経系 (PNS) における脱髄疾患としてギラン・バレー症候群 (GBS) が良く知られている。GBS は食中毒を引き起こす細菌、カンピロバクターへの感染が危険因子とされ、細菌に対して作られた抗体が自己組織を攻撃することにより発症すると考えられており、患者血中にはガングリオシド抗体が良く検出される。ガングリオシドと MS との関連は不明だが、傷害を受けた神経細胞の修復にガングリオシドが寄与している可能性があり、感染が脱髄の危険因子と考えられるなど、GBS との類似性からも非常に興味深い。

筆者らは、TMEV-IDD の発症に TMEV の持続感染が必須であることから、生体内において最も多くの I-IFN を産生する形質細胞様樹状細胞 (pDC) の TMEV 感染における役割を明らかにするため、pDC に TMEV を添加し、産生される I-IFN 量を ELISA 法で検討した。その結果、従来型樹状細胞 (cDC) とは異なり、TMEV は pDC に結合 / 感染せず、I-IFN 産生も促さないことを見いだした。この結果から、未だ不明である TMEVR は pDC において発現していないと仮定し、cDC と pDC の発現遺伝子のマイクロアレイ法による比較を行って、TMEVR 候補遺伝子の探索を行ってきた。TMEV はマクロファージ様の細胞株である J774.1 細胞に結合するが、骨髄性前駆細胞株の M1 細胞には感染しないとされ、TMEV の結合は見られなかった。選別した TMEVR 候補遺伝子は J774.1 で発現しており、この細胞へ遺伝子を導入した過剰発現系の実験では、TMEV 結合量の増加が認められた。一方、M1 細胞では TMEVR 候補遺伝子の発現は認められず、この遺伝子を細胞に導入して TMEV の結合実験を行なったが、結合を確認することは出来なかった。この結果から、TMEVR は複数分子の複合体からなる可能性を考え、候補遺伝子の KO 株の作製による検証と新規候補遺伝子の探索を計画した。TMEV はノイラミニダーゼ処理を行った細胞に結合しなくなることから、結合にシアル酸の関与があることは明らかである。そこでシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質である GM1 について、そのトレーサーであるコレラトキシン B サブユニット (CTx-B) を用いて比較を試みた。その結果、TMEV が結合する cDC や J774.1 では、pDC や M1 に比べて CTx-B の結合量が多く、GM1 に富んでいることが明らかとなった。これらの結果から、GM1 などのガングリオシドが直接、あるいは間接的に TMEV との結合に寄与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究計画は、筆者が TMEVR 探索の過程で、候補遺伝子の過剰発現による TMEV 結合量の効果が細胞の種類によって異なることから、複数分子が関与する複合体として機能している可能性を考慮し、TMEV 結合細胞と非結合細胞において GM1 量が異なることを見いだしたことから、TMEV 感染 / 脱髄発症におけるシアル酸 / 糖鎖の役割に着目したものである。そこで、遺伝子、タンパク質、糖鎖の解析を通じて TMEVR の同定と感染機序を解明し、これらを標的とした病態制御の可能性について追求することを目的とした。

国内においては TMEV 感染による心筋炎モデル、海外では、てんかん発作モデルが新たに見いだされて研究が進められているが、これらはそれぞれ C3H, B6 とマウスの系統が異なっている。このマウス系統間の差異は SJL も含めて非常に興味深く重要だが、これを明らかにする上でも、感染機序の解明は重要であり、TMEVR の同定や寄与する糖鎖の解明は不可欠である。TMEV がどのように宿主細胞に感染し、どのように維持され、どのようにして自己免疫応答を誘導するのかを明らかにすることは、MS の発症機序の解明や病態制御に重要な知見を与えるだけでなく、GBS やこれら疾患モデルに対しても新たな知見を与えるものと期待される。

TMEV-IDD を、ガングリオシドなど糖鎖を含む視点で解析することで、CNS における MS のみならず、PNS における GBS と「共通する何か」が見えてくることが期待され、両疾患の発症機序解明 / 治療法開発のみならず、CNS と PNS の関係に新たな視点を獲得可能性がある。

3. 研究の方法

TMEVR について、これまでの解析で着目した候補タンパク質を含めて遺伝子とタンパク質の両面から探索 / 検証を進めるとともに、シアル酸やガングリオシドが TMEV の結合 / 感染に果たす役割に着目してその本体を明らかにする。またこれら糖鎖が TMEV 感染と脱髄発症にどのような役割を果たすのか、その合成酵素阻害剤や遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いて糖鎖を介して病態を制御出来るかどうか明らかにする。以上の目的を果たすため、以下 3 つの実験を計画した。

(1) TMEV-IDD へのシアル酸 / ガングリオシドの寄与の解明

TMEV 結合、非結合細胞間での構成糖鎖、糖脂質の比較解析を行ない、TMEV 結合細胞に特有の糖鎖構造があるか、シアル酸の役割などについて明らかにする。

(2) TMEV 結合タンパク質の免疫沈降-質量分析法による TMEVR の探索

TMEV のカプシドタンパク質 VP1 に対する抗体を用いて、TMEV と共に免疫沈降してくるタンパク質を、質量分析計を用いて TMEV 結合細胞と非結合細胞との比較により解析する。

(3) 遺伝子編集 / 導入による TMEVR の探索 / 検証

TMEVR は複数の因子からなると仮定し、新規の候補タンパク質の探索を行う。TMEV 結合細胞にランダムな遺伝子欠失、あるいは遺伝子導入を行い、TMEV 結合量が変化した細胞をセルソーター等により単離し、欠失あるいは導入遺伝子を解析する。また TMEV 結合細胞の TMEVR 候補遺伝子 KO 株を作製し、TMEV 結合実験、ウイルス力価測定を行い、TMEV 感染においてこの遺伝子が果たす役割を検証する。

4. 研究成果

(1) TMEV 結合 / 感染細胞は GM1 などのガングリオシドを多く含むが、直接的な TMEV 結合への寄与は少ない

TMEV 結合細胞に GM1 のトレーサーである CTx-B が良く結合することを見出したことから、マウスの脾臓細胞、腹腔抽出細胞、骨髄細胞から誘導したマクロファージ、樹状細胞ならびに株化培養細胞を用いて、TMEV 結合量と CTx-B 結合量の相関についてフローサイトメトリー (FCM) を用いて解析した。その結果、TMEV が良く結合する細胞は CTx-B 結合量も多かった。さらに薄層クロマトグラフィー (TLC) 法により、各細胞のガングリオシドなどの糖脂質を解析した。その結果、TMEV 結合細胞において GM1 も含めて他のガングリオシドの含有量も多いことが明らかとなった。そこで糖脂質合成に関与する酵素群の遺伝子発現量を定量 PCR (qPCR) により解析した結果、cDC ではシアル酸転移酵素である ST3GAL5 の発現量が高く、このことによりガングリオシドが多く存在するものと考えられた。一方、pDC においてはシアル酸を付加しない B4GALNT1 の発現量が高かった (図 1)。

次に、TMEV が直接、GM1 などのガングリオシドに結合するかどうか明らかにするため、マウス骨髄細胞から誘導した cDC に対して GM1 など数種類のガングリオシドを細胞に添加し、TMEV 結合量が増加するかどうかを FCM により解析したが、TMEV との直接結合を示唆するガングリオシドは得られなかった。さらに、細胞の GM1 量を著しく低下させる、ST3GAL5

欠損マウス由来細胞において TMEV 結合量を解析したが、野生型との変化は認められず、TMEV が直接 GM1 と結合する可能性は低いと考えられた。

過去の報告では TMEV-IDD へのガングリオシド投与による抑制効果が報告されている (Inoue A et al. J Neuroimmunol. 1996) が、本研究では TMEV が直接、GM1 等に結合している結果は得られず、cDC やマクロファージへの TMEV 感染には影響していないことが示唆された。しかし GM1 等の添加による細胞膜への介入が TMEV 刺激に対するサイトカイン産生などに影響を与えていた可能性はある。

(2) cDC に比べ pDC では N-アセチルノイラミン酸結合 N 型糖鎖の含有量は少ない

シアル酸は、ガングリオシドなどの糖脂質以外に、タンパク質のアスパラギン側鎖の窒素原子に糖鎖が結合する N-結合型糖鎖や、セリンあるいはスレオニン側鎖の酸素原子に結合する O-結合型糖鎖の末端に存在する。過去の報告で TMEV と N-結合型糖鎖との結合が指摘されている (Shah AH et al. Virology. 2002) ことから、pDC と cDC の N-結合型糖鎖について MALDI-TOF-MS による質量分析計を用いて解析した。その結果、pDC では cDC に比べてシアル酸の主要な成分である N-アセチルノイラミン酸結合型糖鎖の含有量が少ないことが明らかとなった。また qPCR により、シアル酸を除去する酵素、ノイラミニダーゼの遺伝子発現量が pDC において高いことが明らかとなった (図 2)。以上のことから、pDC においてはガングリオシドばかりではなく、シアル酸結合 N 型糖鎖量も少ないことが明らかになり、それにより TMEV が結合しないことが示唆された。

しかし依然として TMEV 結合に関わるシアル酸結合 N 型糖鎖を持つタンパク質が何であるかは不明である。以前に筆者らがマイクロアレイ解析から見出した TMEVR 候補遺伝子を TMEV 結合細胞で過剰発現させた場合に TMEV 結合量の増加を観察したが、TMEV 非結合細胞への遺伝子導入で TMEV 結合を観察できなかったのは、発現した TMEVR 候補タンパク質の糖鎖修飾が異なっていたためである可能性が考えられる。これを明らかにするためには、TMEV 結合細胞での TMEVR 候補遺伝子あるいはシアル酸転移酵素遺伝子のノックアウト/ノックダウンの効果を調べる必要があると考えられる。

(3) TMEV はシアル酸修飾を受けた細胞接着タンパク質に結合している可能性がある

一方、我々は脾臓細胞中の TMEV 結合細胞を FCM で解析した際に、TMEV 添加により染色性が低下する抗体があることを見出した。この結果は、この抗体が認識する抗原部位と TMEV とが直接結合していることを示唆することから、この抗原タンパク質と TMEV との結合についてさらなる解析を開始した。同実験系において、細胞に TMEV を添加するよりも前に、この抗体による染色を行うと染色性が回復する結果が得られたことから、両者が抗原への結合において競合していると考えられ、この分子は TMEVR の一つである可能性がある。

この抗原は、TMEV 非結合細胞においてもその発現が確認されているが、この細胞では TMEV 添加による抗体染色性の低下は観察されなかった。この結果は、抗原への TMEV の結合が、抗体の結合を阻害していることを支持する。また同時に、TMEV 結合細胞と非結合細胞において抗原構造に違いがあることを示しており、これが糖鎖修飾の違いである可能性がある。

この抗原タンパク質は細胞接着分子であるインテグリンであり、様々な分子種が多く細胞に発現している。TMEV の立体構造を解析した過去の論文 (Luo M et al. Virology. 1996) では受容体との結合予測部位が示されており、その部位にはインテグリンとの結合に良く利用される RGD 様のモチーフ配列が存在する。インテグリンは Mg^{2+} などの二価イオンの結合により、活性化構造に変化することが知られていることから、TMEV 結合実験において Mg^{2+} あるいはキレート剤である EDTA 存在下で TMEV 結合量に変化があるかどうか検討した。その結果、 Mg^{2+} 存在下では cDC の TMEV 結合量が増加し、EDTA 存在下では逆に低下した。一方、インテグリン抗体の結合量は Mg^{2+} 添加で減少し、EDTA 添加で増加した。以上の結果から、TMEV 結合量が Mg^{2+} に影響を受けることが明らかとなり、TMEV がインテグリンに結合していることが示唆された。そこでリコンビナントのインテグリンとの結合をドットプロット法にて検討した。インテグリンを固定した PVDF 膜を TMEV 浮遊液中でインキュベートし、洗浄後に TMEV を検出したところ、固定したインテグリン上に残存した TMEV が観察された。さらに、ノイラミニダーゼ処理をしたインテグリンを用いた場合には残存 TMEV 量は低下した。以上の結果は、この分子が TMEVR である可能性を示しており、現在、細胞膜上における局在や TMEV の細胞内侵入への寄与などについて解析を続けている。

今後、この分子のさらなる解析と、研究開始時に見出していた TMEVR 候補遺伝子の解析と合わせ、TMEVR の同定、細胞への侵入/感染機序とその制御因子を明らかにすることで、TMEV-IDD に加えて MS、GBS の理解における新たな視点が得られることを期待したい。

以上、当初計画では「TMEV 結合タンパク質の免疫沈降-質量分析法による TMEVR の探索」を計画していたが、予期せず、抗体との結合の競合という、異なる方法で本研究課題の目標である TMEVR の同定について、その候補分子を新たに見出すことが出来た。今後さらに詳細な解析を行っていく。また本研究計画の 3 つのうちの残り一つである「遺伝子編集/導入による TMEVR の探索/検証」については、この TMEVR 候補分子と TMEV との結合の解析結果を見ながら、変異導入などによる TMEV 結合能、機能の検証を行う計画である。以上の実験を

通じて、TMEVR の同定と感染に寄与するタンパク質 / 糖鎖構造を解明し、TMEV-IDD におけるそれぞれの役割の解明と、これらを標的とした病態制御の可能性について追求したい。

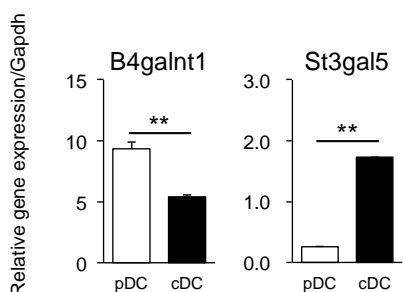


図1：pDC では cDC に比べてガングリオシド合成に寄与する酵素、St3gal5 の発現が低い

* $p < 0.05$
** $p < 0.01$

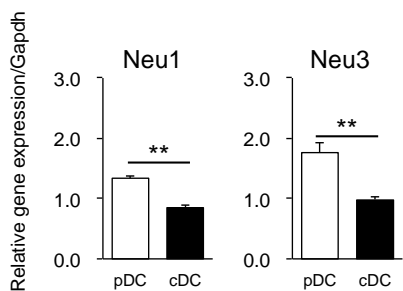


図2：pDC ではシアル酸を除去するノイラミニダーゼの発現量が高い

* $p < 0.05$
** $p < 0.01$

参考文献

- Inoue A, Koh CS, Yanagisawa N, Taketomi T, Ishihara Y.
Suppression of Theiler's murine encephalomyelitis virus induced demyelinating disease by administration of gangliosides.
J Neuroimmunol. 1996 Jan;64(1):45-53.
- Luo M, Toth KS, Zhou L, Pritchard A, Lipton HL.
The structure of a highly virulent Theiler's murine encephalomyelitis virus (GDVII) and implications for determinants of viral persistence.
Virology. 1996 Jun 1;220(1):246-50.
- Reddi HV, Lipton HL.
Heparan sulfate mediates infection of high-neurovirulence Theiler's viruses.
J Virol. 2002 Aug;76(16):8400-7.
- Shah AH, Lipton HL.
Low-neurovirulence Theiler's viruses use sialic acid moieties on N-linked oligosaccharide structures for attachment.
Virology. 2002 Dec 20;304(2):443-50.
- Tsunoda I, Libbey JE, Fujinami RS.
Theiler's murine encephalomyelitis virus attachment to the gastrointestinal tract is associated with sialic acid binding.
J Neurovirol. 2009 Jan;15(1):81-9.
- Zhou L, Luo Y, Wu Y, Tsao J, Luo M.
Sialylation of the host receptor may modulate entry of demyelinating persistent Theiler's virus.
J Virol. 2000 Feb;74(3):1477-85.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田和也、姫田敏樹、海部知則、大原義朗、中村晃
2. 発表標題 タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス受容体に関する糖脂質の解析
3. 学会等名 第67回 日本ウイルス学会学術集会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Takeda, Tomonori Kaifu, Akira Nakamura
2. 発表標題 Comparison of glycolipid compositions between Theiler's murine encephalomyelitis virus binding and non-binding cells
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会（浜松）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田和也、海部知則、中村晃
2. 発表標題 タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス受容体機能に関する糖脂質の解析
3. 学会等名 第33回 日本神経免疫学会学術集会（福岡（Web開催））
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田和也、姫田敏樹、海部知則、大原義朗、中村晃
2. 発表標題 タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス受容体に関する糖脂質・糖タンパク質の解析
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会（神戸（ハイブリッド開催））
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuya Takeda, Tomonori Kaifu, Akira Nakamura
2. 発表標題 Analysis of sialylated glycolipids and N-glycans between Theiler's murine encephalomyelitis virus binding and non-binding cells.
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会（奈良（ハイブリッド開催））
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------