

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06406

研究課題名（和文）ミクログリアの活性化に着目したフラビウイルス性脳炎の発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of flaviviral encephalitis focusing on the activation of microglia

研究代表者

小林 進太郎（Kobayashi, Shintaro）

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：00634205

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）：世界中で流行しているフラビウイルスの感染によって起こる脳炎の病態形成機構の解明のために、神経向性フラビウイルスの感染により活性化されるミクログリアのサブタイプの多様性および、病態形成に重要な役割を果たす活性ミクログリアのサブタイプについて解析した。その結果、神経向性フラビウイルスが感染したマウスの脳組織では様々なサブタイプのミクログリアの活性化が誘導されることが明らかになった。また神経変性疾患などの脳内に認められ病態形成との関連が示唆される疾患関連ミクログリアがフラビウイルス感染細胞の近傍に局在することが明らかになり、フラビウイルス性脳炎の病態形成との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経向性フラビウイルスの感染による脳炎病態形成において、単一ではなく、様々なサブタイプのミクログリアが活性化されることが明らかになった。さらに多様な活性化ミクログリアの中でウイルス感染細胞の近傍に存在する疾患関連ミクログリアが脳炎病態形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。これらの結果はフラビウイルス性脳炎の病態形成機構の解明の基礎的基盤となり、未だないフラビウイルス感染症の特異的治療法の開発につながることを期待される。またウイルス感染において様々なサブタイプのミクログリアの存在を明らかにした本研究成果はミクログリアを含む神経科学の研究のさらなる進歩につながる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathogenesis of encephalitis caused by infection with flavivirus, which is spread worldwide, we examined the diversity of microglial subtypes activated by infection with neurotropic flavivirus and the association of the activated microglia and cells infected with flavivirus in pathogenesis. Various subtypes of microglia were activated in the mouse brain infected with neurotropic flavivirus. In addition, disease-associated microglia, which are found in the brains of patients with neurodegenerative diseases, were found to localize in the vicinity of flavivirus-infected cells, suggesting that they are associated with the pathogenesis of flaviviral encephalitis.

研究分野：ウイルス学、獣医学、病理学、神経科学

キーワード：フラビウイルス 脳炎 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

世界的に流行し人獣共通感染症の原因となるフラビウイルスは脳炎など重篤な症状を引き起こすため公衆衛生上の重要な課題である。フラビウイルス性脳炎の組織中では神経細胞の変性・細胞死、グリア細胞の集簇、免疫細胞の浸潤などが認められる。これらの反応は感染防御や組織保護機能を示す一方、過剰な反応が組織障害を起こすこともあり、フラビウイルス脳炎において両側面の作用が混在することが病態形成機構の理解を困難にしている。

中枢神経において変性に陥った神経細胞の周囲に集簇したミクログリアは、変性した神経細胞に由来する分子スイッチ因子により活性化される。ミクログリアの活性化状態は、抗炎症性サイトカインや神経栄養因子を産生する神経保護型と、過剰な炎症性サイトカインや酸化ストレス因子を産生する神経傷害型の機能的に相反する2つの状態に分類され、脳内におけるこれらのバランスが神経病態形成に影響する。しかし、どの分子スイッチ因子が、どのタイプのミクログリアに活性化させるのか、についてはほとんどわかっていない。

神経向性フラビウイルスはタンパク質分解機構など細胞の恒常性維持機能に影響することで神経細胞の変性・細胞死を誘導する。ウイルスが感染した脳内には変性した神経細胞に由来する様々な分子スイッチ因子によって活性化された神経保護型と神経傷害型の両タイプのミクログリアが混在している。活性化ミクログリアのバランスと神経病態の関連から、ミクログリアの活性化機構の解明は神経病態形成機構の理解につながることで予想される。

以上の研究背景から「神経向性フラビウイルス感染により産生される分子スイッチ因子の特定は、神経病態形成機構の理解につながるのではないか？」という仮説の設定に至った。

2. 研究の目的

本研究では神経向性フラビウイルス感染による神経細胞の変性を介したミクログリアの活性化機構に着目して、神経保護または傷害型ミクログリアへの活性化を促す分子スイッチ因子の特定および、活性化ミクログリアのフラビウイルス性脳炎の病態形成における役割について解析する。以上を明らかにすることで、フラビウイルス性脳炎発症機序における活性化ミクログリアの重要性を証明する。

3. 研究の方法

【ウイルス感染マウスの脳組織の病理組織学的解析】

フラビウイルス属のウエストナイルウイルス(WNV)をマウスの脳内に接種し、神経症状を示したマウスの脳組織のパラフィン包埋切片を作製した。作製した切片は、ウイルス抗原の検出のためのエンベロープタンパク質に対する抗体、ミクログリアのサブタイプに共通して発現しており広範なミクログリアマーカーであるIba-1、P2RY12、TMEM119に対する抗体、サブタイプ特異的に発現するSIGLEC-H、ARG1、CD11cに対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を実施した。得られた結果は、ミクログリアとウイルス感染細胞の関連を明らかにするために、画像解析ソフト(Image J: <https://imagej.nih.gov/ij>)を用いて解析した。

【疾患関連ミクログリアの解析】

ウイルスを接種したマウスから回収した脳組織からミクログリアを分離し、TMEM119およびCD11cに対する抗体を用いて染色後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメーターを用いて解析した。

4. 研究成果

WNVを接種したマウスは脳炎病態が形成され、脳内にウイルス抗原陽性細胞が検出された。ウイルス抗原陽性の脳組織では、コントロールと比較して縮小化した突起および肥大化した細胞体を有するIba-1、TMEM119またはP2RY12陽性のミクログリアが多数検出された(図1)。活性化されたミクログリアは突起の縮小化および細胞体の肥大化が認められることより、以上の結果はWNVの感染はミクログリアの活性化を誘導することが示唆された。

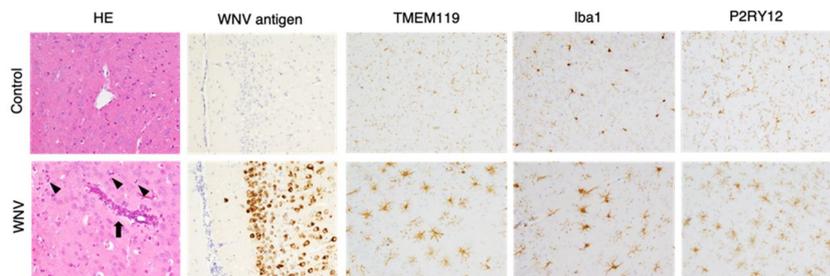


図1. WNV感染によるミクログリアへの影響の解析

次に WNV の感染によって活性化されるミクログリアのサブタイプについて、サブタイプ特異的な抗体を用いて解析した。中枢神経に局在するマクローファージとは異なりミクログリアだけに発現が確認されている SIGLEC-H や、神経保護型ミクログリアが発現する ARG1 陽性細胞がコントロールおよびウイルス感染マウスの脳で検出され、樹状細胞や活性化ミクログリアが発現する CD11c 陽性細胞はウイルス感染マウスでのみ検出された（図 2）。ウイルス感染マウスの脳組織において、ARG1 陽性細胞は TMEM119 陽性細胞と同様に縮小化した突起および肥大化した細胞質を有していた。また SIGLEC-H 陽性細胞はロッド状の形態を示し、CD11c 陽性細胞は突起を有する小さな細胞として検出された。これらの結果から、WNV の感染は様々なサブタイプのミクログリアの活性化を誘導する可能性が示唆された。

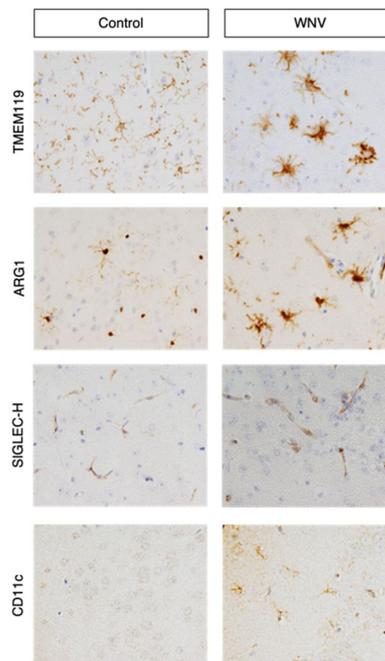


図2. WNV感染による様々なサブタイプのミクログリアの活性化

活性化ミクログリアの脳炎病態形成における機能を明らかにするために、ミクログリアとウイルス感染細胞の関係性について解析を実施した。ウイルス抗原陽性細胞の近傍に局在する

TMEM119、Iba1 または P2RY12 陽性のミクログリアには蛍光シグナルが強い細胞と弱い細胞が混在しており、蛍光シグナルが弱い細胞は強い細胞に比較してウイルス抗原陽性細胞との距離が短いことが明らかになった（図 3）。これらから広範なミクログリアマーカー弱陽性のミクログリアとウイルス感染細胞との関連が示唆された。

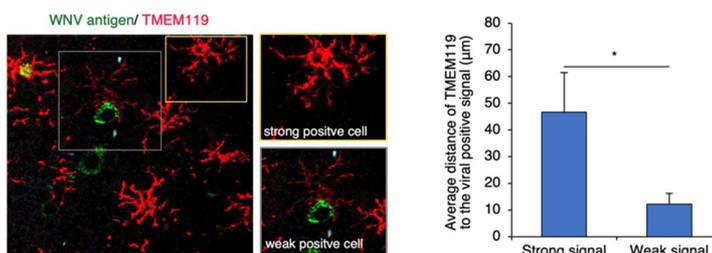


図3. ミクログリアとウイルス感染細胞の関連の解析

TMEM119 弱陽性のミクログリアはアルツハイマー病の脳内で検出され、その中で CD11c を発現するミクログリアは疾患関連ミクログリアと呼ばれ、病態形成に関わることが報告されている。そこで WNV 感染マウスの脳内で観察された TMEM119 弱陽性のミクログリアについて CD11c の発現を解析した。マウスの脳組織切片をウイルス抗原と TMEM119、CD11c に対する抗体を用いて三重染色を実施した結果、ウイルス抗原陽性細胞の近傍に局在する TMEM119 弱陽性の細胞の一部で CD11c の陽性像が認められた（図 4A）。また WNV を接種したマウスの脳組織からミクログリアを分離し、フローサイトメーターにより TMEM119 と CD11c の発現を解析した結果、ウイルス感染マウスではコントロールと比較して TMEM119 弱陽性、CD11c 陽性の細胞数が有意に増加した（図 4B）。以上の結果から、WNV 感染による脳炎病態形成への疾患関連ミクログリアの関与が示唆された。

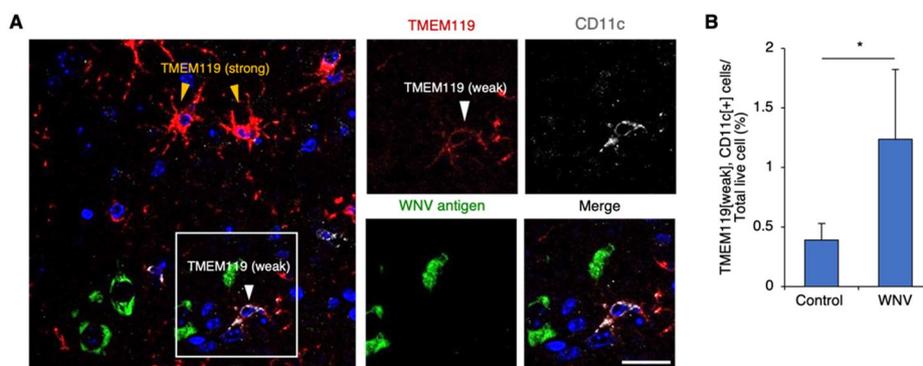


図4. WNV感染マウス脳組織における疾患関連ミクログリアの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsujino Dai, Yoshii Kentaro, Kajiyama Misa, Takahashi Yuji, Maekawa Naoya, Kariwa Hiroaki, Kobayashi Shintaro	4. 巻 321
2. 論文標題 Necroptosis of neuronal cells is related to the neuropathology of tick-borne encephalitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198914 ~ 198914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2022.198914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Berankova Zuzana, Kopecky Jan, Kobayashi Shintaro, Lieskovska Jaroslava	4. 巻 315
2. 論文標題 Dual control of tick-borne encephalitis virus replication by autophagy in mouse macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198778 ~ 198778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2022.198778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishiyama Shoko, Hirano Minato, Muto Memi, Kambara Mao, Ito Naoto, Kobayashi Shintaro, Kariwa Hiroaki, Yoshii Kentaro	4. 巻 66
2. 論文標題 Y shaped RNA Secondary Structure of a Noncoding Region in the Genomic RNA of Tick Borne Encephalitis Virus Affects Pathogenicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 234 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Yuji, Kobayashi Shintaro, Nakao Ryo, Kariwa Hiroaki, Yoshii Kentaro	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from tick infesting dog in central Hokkaido in 2018	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ticks and Tick-borne Diseases	6. 最初と最後の頁 101900 ~ 101900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ttbdis.2022.101900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Reteng Patrick, Nguyen Thuy Linh, Tran Thi Minh Tam, Mares-Guia Maria Ang?lica Monteiro de Mello, Torres Maria Celeste, de Filippis Ana Maria Bispo, Orba Yasuko, Kobayashi Shintaro, Hayashida Kyoko, Sawa Hirofumi, Hall William W., Nguyen Thi Lan Anh, Yamagishi Junya	4. 巻 11
2. 論文標題 A targeted approach with nanopore sequencing for the universal detection and identification of flaviviruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19031 ~ 19031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98013-9	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 該当する

1. 著者名 Kulprasertsri Sittinee, Kobayashi Shintaro, Aoshima Keisuke, Kobayashi Atsushi, Kimura Takashi	4. 巻 65
2. 論文標題 Duck Tembusu virus induces stronger cellular responses than Japanese encephalitis virus in primary duck neurons and fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 481 ~ 491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Maezono, Shintaro Kobayashi, Koshiro Tabata, Kentaro Yoshii, Hiroaki Kariwa	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a highly specific serodiagnostic ELISA for West Nile virus infection using subviral particles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88777-5	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26件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 辻野代、好井健太郎、梶山実紗、高橋有嗣、苅和宏明、小林進太郎
2. 発表標題 ダニ媒介性脳炎ウイルス感染によるネクロトーシスと脳炎病態形成との関連
3. 学会等名 第56回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前園佳祐、好井健太郎、田畑耕史郎、苅和宏明、小林進太郎
2. 発表標題 ウイルス様粒子を用いた特異性の高いウエストナイルウイルス感染の血清診断系の開発
3. 学会等名 第56回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋優奈、神谷亘、好井健太郎、前園佳祐、苅和宏明、小林進太郎
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスのカプシドタンパク質と相互作用する宿主因子の脳炎病態形成における機能の解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋侑嗣、小林進太郎、中尾亮、苅和宏明、好井健太郎
2. 発表標題 2018年に北海道道央地域で犬に付着していた吸血マダニから分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスの性状解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林進太郎、前園佳祐、タマハキンパサワット、好井健太郎、苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスの感染で認められるTDP-43の細胞質内蓄積による脳炎病態形成への影響の解析
3. 学会等名 第28回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前園佳祐、タマハキンバサワット、好井健太郎、苅和宏明、小林進太郎、
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染による宿主タンパク質の核内輸送阻害機構の解析
3. 学会等名 第28回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスの感染で認められるTDP-43の細胞質内凝集機構および脳炎病態形成への影響の解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前園佳祐、好井健太郎、田畑耕史郎、苅和宏明、小林進太郎
2. 発表標題 ウイルス様粒子を用いた特異性の高いウエストナイルウイルス感染の新規血清診断系の開発
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 PASSAWAT THAMMAHAKIN, Hiroaki Kariwa, Shintaro Kobayashi
2. 発表標題 Histopathological analysis of microglia in West Nile virus infected mouse
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋優奈、神谷亘、好井健太郎、前園佳祐、苺和宏明、小林進太郎
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスのカプシドタンパク質と相互作用する宿主因子の脳炎病態形成における機能解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田幸音、高橋侑嗣、佐々木道仁、長谷部理絵、村上正晃、苺和宏明、小林進太郎
2. 発表標題 透明化した脳組織を用いたウエストナイルウイルスの中枢神経組織侵入機構の解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林進太郎、前園佳祐、高橋侑嗣、THAMMAHAKIN Passawat、好井健太郎、苺和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスの感染で認められるTDP-43の細胞質内蓄積による脳炎病態形成への影響の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前園佳祐、好井健太郎、高橋侑嗣、Thammahakin Passawat、苺和宏明、小林進太郎
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染による宿主タンパク質の核内輸送阻害機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Passawat Thammahakin, Yuji Takahashi, Keisuke Maezono, Hiroaki Kariwa, Shintaro Kobayashi
2. 発表標題 Analysis of microglia heterogeneity and its association with virus-infected neurons in West Nile virus infected mouse
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、澤洋文、苺和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染によるタンパク質の核内輸送の阻害機構の解析
3. 学会等名 日本ウイルス学会北海道支部第54回夏季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、澤洋文、苺和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスによるタンパク質の核内輸送の阻害機構の解析
3. 学会等名 第55回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、澤洋文、苺和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染によるタンパク質の核内輸送への影響
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、澤洋文、苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染によるタンパク質の核内輸送の阻害と細胞死の関連の解析
3. 学会等名 第7回北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、澤洋文、苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染によるタンパク質の核内輸送の阻害機構の解明
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shintaro Kobayashi
2. 発表標題 Elucidation of neuropathogenesis of West Nile Encephalitis
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林進太郎
2. 発表標題 フラビウイルス感染による病態形成機構の解明および診断法の開発
3. 学会等名 第20回日本農学進歩賞受賞式・講演講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、松野啓太、澤洋文、苺和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスが感染した神経細胞で認められるTDP-43の蓄積機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林進太郎
2. 発表標題 ウイルス性脳炎における神経細胞の傷害メカニズム
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深野沙代、小林進太郎、苺和宏明、好井健太郎
2. 発表標題 siRNAによるダニ媒介性フラビウイルスの増殖抑制の検討
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林進太郎、川上怜子、好井健太郎、苺和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染で認められるユビキチンの蓄積に関わるウイルス因子の特定
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前園佳祐、小林進太郎、好井健太郎、苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染の特異性の高い新規血清診断系の開発
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
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			
	機関名	機関番号	研究内容	実施状況
チェコ	CAS	Veterinary Research Institute	University of South Bohemia	
フランス	IRD			