

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21249032

研究課題名（和文） 動物モデルを用いた麻疹の病態の解明

研究課題名（英文） Measles pathogenesis as studied using animal models

研究代表者

柳 雄介 (YANAGI YUSUKE)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：40182365

研究成果の概要(和文):受容体 SLAM 発現マウスはヒトの麻疹の病態を比較的よく再現したが、麻疹ウイルスはマウスの I 型インターフェロンに十分対抗できないために、I 型インターフェロン受容体を欠損させないと増殖できなかった。そこで、麻疹ウイルス感染細胞でインターフェロンが抑制される系を確立し、それに基づいたトランスジェニックマウスを樹立した。さらに、生後 10 日の哺乳ハムスターを用いて麻疹ウイルスの神経細胞感染機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文): SLAM knockin mice well reproduced immunological abnormalities observed in human measles. However, measles virus only grew in type I interferon receptor knockout mice, since it could not effectively counteract type I interferons in mouse cells. To overcome this problem, transgenic mice were established in which type I interferons are suppressed in measles virus-infected cells. Furthermore, it was demonstrated using 10-day-old suckling hamsters that enhanced fusion activity of the measles virus fusion protein plays an important role in measles virus spread in neuronal cells that lack efficient receptors.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2011年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2012年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
年度			
総計	35,600,000	10,680,000	46,280,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス、動物モデル、受容体、インターフェロン、膜融合

## 1. 研究開始当初の背景

麻疹は、有効な生ワクチンの存在にもかかわらず、世界中で毎年約 3000 万人の患者と数十万人の死者を出している重要なヒトウイルス感染症である。麻疹ウイルスは空気感染で伝播し、全身の主に免疫系組織と上皮組

織で増殖する。宿主の体内では、特定のウイルスに感受性および非感受性の様々な細胞が解剖学的に複雑な構造を形成して存在する。また、感染後の時間経過とともに自然免疫および獲得免疫の宿主応答が起こり、ウイルスの増殖およびそれに伴う宿主の病態は

大きく影響を受ける。したがって、生体内でのウイルス感染を正しく理解するためには、培養細胞を用いたウイルス増殖の解析だけでは不十分であり、適当な動物モデルを用いて研究することが不可欠である。

麻疹ウイルスは、実験的にサルに感染することが知られ、麻疹の病態をかなりよく再現できる。しかし、サルのような大型動物は飼育や実験が容易ではなく費用もかかるので、それに代わる動物モデルとしてマウスなどの小型動物が望まれている。われわれは、麻疹ウイルスの受容体である signaling lymphocyte activation molecule (SLAM, CD150 とも呼ばれる)を発現するマウスを麻疹の動物モデルとして開発することに成功している。

## 2. 研究の目的

本研究では、動物モデルを使って、麻疹ウイルスのトロピズム、免疫抑制、宿主の免疫応答など感染に伴う病態を動物個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

ウイルスは、麻疹ウイルス野生株の他、enhanced green fluorescent protein (EGFP)発現組換え麻疹ウイルス、Cre 発現組換え麻疹ウイルス、EGFP および Cre 発現組換え麻疹ウイルス、EGFP および膜融合能が亢進したF蛋白質発現組換え麻疹ウイルスを用いた。感染実験に用いる動物として、SLAM ノックインマウスとI型インターフェロン受容体欠損マウスを交配したマウス、生後10日のハムスターを使用した。さらに、センダイウイルスC蛋白質をコードする遺伝子の近位にloxP配列を有するコンストラクトを導入した培養細胞およびトランスジェニックマウスを複製し、実験に用いた。

## 4. 研究成果

(1) 受容体 SLAM 発現マウスを用いた麻疹病態の解析：

麻疹ウイルスは強い免疫抑制を起こすことが知られているが、その詳しいメカニズムは分かっていない。麻疹ウイルスの受容体であるSLAMを発現するSLAM ノックインマウスとI型インターフェロン受容体欠損マウスを交配させた遺伝子改変マウスに麻疹ウイルスを感染させ、ウイルス感染が免疫系の機能に与える影響を観察した。その結果、ヒト麻疹患者で見られるようなTリンパ球数の減少、Tリンパ球増殖反応の抑制、抗体産生の低下、Th2タイプサイトカインinterleukin (IL-4) および抑制性サイトカインIL-10の増加、接触皮膚炎の抑制が本マウスで再現できた。マウス体内リンパ組織におけるリンパ球の大きな再分布や調節性T細胞の増加は明らかで

はなかったため、これらが免疫抑制の原因であるとは考えられなかった。一方、リンパ節ではアポトーシスが亢進していたにも拘わらず、リンパ球数に減少は見られなかった。このことは、アポトーシスによるリンパ球数の減少を補充するために、末梢血からリンパ節にリンパ球が移動することにより末梢血リンパ球減少が起こっている可能性を示唆した。抗IL-10受容体抗体によりマウスを処理しておくことで、麻疹ウイルス感染による接触皮膚炎の抑制は起こらなくなったが、それ以外の免疫抑制には影響はなかった。以上の結果から、本遺伝子改変マウスは麻疹ウイルスによる免疫抑制の優れた動物モデルになることが明らかになった。

免疫抑制が起こる詳細なメカニズムを調べるために、卵白アルブミンを認識するT細胞受容体を発現するトランスジェニックマウス(OT-IIマウス)をSLAMノックイン・I型インターフェロン受容体ノックアウトマウスと交配し、感染マウスにおけるCD4+ヘルパーT細胞、樹状細胞の機能を解析した。その結果、CD4+ヘルパーT細胞、樹状細胞両方の機能に抑制が見られ、それらが抗体産生低下の原因となっていると考えられた。ウイルス感染後に抗原(卵白アルブミン)で免疫する一次応答とは異なり、卵白アルブミンに対して既に免疫があるマウスに麻疹ウイルスを接種しても二次抗体産生には影響がなかった。細胞種特異的モノクローナル抗体を用いて、マウスからCD4+T細胞、CD8+T細胞、B細胞を除去した後に麻疹ウイルスを感染させると、CD8+T細胞を除いた時のみ体内のウイルス量が増加した。したがって、CD8+T細胞がウイルス排除に最も重要な役割を果たしていると考えられた。これらのマウスモデルでは、ウイルス感染や免疫抑制が起こるにもかかわらず、マウスは何らかの症状を示すことはなく、感染後10日目にはウイルスは排除された。

(2) 麻疹ウイルス感染細胞でのみインターフェロン系が抑えられる動物モデル：

麻疹ウイルスがマウスで効率良く増殖するには、受容体を発現させるだけでは不十分であり、さらにマウスのインターフェロン応答を抑える必要がある。麻疹ウイルスのように、ヒトを自然宿主とするウイルスは、ヒトの免疫応答には対抗できるが、本来の宿主でない動物の免疫応答には必ずしも対抗できず、これがマウスを使った動物実験を進める上での障害になっている可能性がある。センダイウイルス(SeV)はマウスで効率よく増殖し、マウスに致死的な肺炎を引き起こす。SeVがコードするC蛋白質(SeV-C)はマウスのインターフェロン応答を抑制することが知られている。受容体SLAMを発現するマウス細胞にSeV-Cを導入すると麻疹ウイルスの増

殖は5~20倍良くなったが、SLAM発現ヒト細胞にSeV-Cを導入しても、増殖にほとんど変化は認められなかった。この結果は、上記の予想通り、麻疹ウイルスはヒト細胞ではインターフェロン系を抑制できるので外から抗インターフェロン活性を持つSeV-Cを加えても効果はないが、インターフェロンを十分抑えることができないマウス細胞ではSeV-Cによってインターフェロンが抑制されることにより麻疹ウイルスが効率よく増殖できたと解釈できる。実際に、インターフェロンに対するシグナル伝達に対する作用を比較すると、SeV-Cはヒト細胞でもマウス細胞でもシグナルを抑制することができたが、麻疹ウイルスのV蛋白質（インターフェロンのシグナル伝達抑制作用を持つ）はヒト細胞でのみ抑制できた。SeV-C遺伝子を組み込んだ麻疹ウイルスを作製することも可能だが、そのようなウイルスは野生株よりも強い病原性を持つ危険性がある。そこでわれわれは、麻疹ウイルスが感染したマウスの細胞でのみ、SeV-Cが発現する実験系を確立した。これはCreと呼ばれる酵素がloxPという特異的なDNA配列を認識してDNAを組換える性質を利用したものであり、①Creを発現する麻疹ウイルスと、②SeV-Cをコードする遺伝子の上流にloxP配列を有するマウス培養細胞を遺伝子改変技術で作製することで実現した。これにより、麻疹ウイルス感染細胞特異的にウイルス抵抗性を抑制することが可能になる。感染実験では、SeV-Cが発現することで麻疹ウイルスの増殖が約100倍上昇した。一方、麻疹ウイルスに感染していないマウス細胞はSeV-Cを発現しないため、正常なインターフェロン応答を示した。また、Creを発現しない麻疹ウイルスは、loxP-SeV-Cを持つマウス細胞でも持たない細胞でも増殖に違いはなかった。麻疹の動物モデルとして、このシステムに基づいた遺伝子改変マウス(SeV-CをCre発現麻疹ウイルス感染により発現するトランスジェニックマウス)を作製した。このマウスを用いることにより、受容体発現マウスをI型インターフェロン受容体ノックアウトマウスと交配する必要がなくなった。

### (3) 動物を用いた麻疹ウイルスの中枢神経系伝播の解析：

麻疹ウイルスは、SLAM、nectin 4を細胞受容体としてそれぞれ免疫細胞、上皮細胞に感染する。しかし、まれにSLAMやnectin 4を発現していない神経細胞に持続感染して亜急性硬化性全脳炎(SSPE)を起こすことが知られている。しかし、ヒトの神経細胞にはSLAMやnectin 4は発現しておらず、どのようにして麻疹ウイルスが神経細胞に感染するか明らかではない。

麻疹ウイルスは、自身のエンベロープと細

胞膜を融合させることで、ウイルスゲノムを標的細胞に送り込む。受容体結合蛋白質(H蛋白質)にtag配列を付加した組換え麻疹ウイルスは、元々ウイルスに感受性がある細胞を融合できなくなった。しかし、しばらく培養を続けていると融合を起こすことができる変異ウイルスが得られた。また、受容体を持たない細胞に野生型麻疹ウイルスを感染させると、細胞融合は認められなかったが、良く観察すると非常に小さい合胞体が存在したので、そこからウイルスを回収した。これらのウイルスの遺伝子を解析するとH蛋白質には変異はなかったが、fusion(F)蛋白質の細胞外領域にウイルス株ごとに異なる変異が存在していた。これらのF蛋白質は野生型のH蛋白質と共発現させると、野生型F蛋白質よりも強い膜融合能を示した。

F蛋白質は非常に保存性が高い蛋白質で、野生型麻疹ウイルス株の間ではほとんど配列の違いは存在しないが、SSPE患者由来のウイルス株では多くの変異が認められる。複数のSSPEウイルス株で認められる変異を野生型F蛋白質に導入すると、やはり強い膜融合能を示すようになった。さらに興味深いことに、これらの細胞外領域の変異によって強い膜融合能を示すようになったF蛋白質は、SLAM、nectin 4を発現していない細胞を融合させることができた。このようなF蛋白質をコードする組換え麻疹ウイルスを作製すると、確かにこれらのウイルスは受容体を発現していないヒトの神経細胞株に感染して融合を起こすことができた。

培養細胞におけるこれらの知見の動物体内での意義を明らかにするために、膜融合能が亢進したF蛋白質をコードする組換え麻疹ウイルスを生後10日のハムスターに脳内接種した。野生株ウイルスを接種してもハムスターには変化は認められなかったが、融合能が亢進したウイルスを接種されたハムスターは接種後7日位で死亡した。致死率は、培養細胞レベルでの融合能の強さとほぼ一致した。さらに組換えウイルスにレポーターとして組み込まれているEGFPで観察すると、致死率が高いウイルスは、中枢神経系全体に広汎に感染を広げていることが明らかとなった。末梢からウイルスを接種しても、脳内接種で見られるようなウイルス伝播は観察されなかった。

以上のことから、麻疹ウイルスによる神経細胞感染には、F蛋白質変異によるウイルスの膜融合能亢進が重要な役割をしていると考えられる。

### 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)

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in human neuronal cells and brains of suckling hamsters. **Journal of Virology** 87(5): 2648-2659, 2013  
doi: 10.1128/JVI.02632-12
2. Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. **Nature Communications**. 3:1235, 2012  
doi: 10.1038/ncomms2252
3. Iwasaki M, Yanagi Y. Expression of the Sendai (murine parainfluenza) virus C protein alleviates restriction of measles virus growth in mouse cells. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA** 108(37):15384-15389, 2011  
doi: 10.1073/pnas.1107382108
4. Koga R, Ohno S, Ikegame S, Yanagi Y. Measles Virus-Induced Immunosuppression in SLAM Knock-In Mice. **Journal of Virology** 84(10): 5360-5367, 2010  
doi: 10.1128/JVI.02525-09

〔学会発表〕 (計 12 件)

1. Yanagi Y, Measles virus entry and fusion. The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study “RNA Biofunctions and Viruses” 2013 年 1 月 10 日、福岡
2. Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Enhanced fusion activity is critical for measles virus spread in the central nervous system. The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study “RNA Biofunctions and Viruses” 2013 年 1 月 10 日、福岡
3. 渡辺俊平、白銀勇太、鈴木諭、池亀聡、古賀律子、柳雄介、麻疹ウイルスの神経病原性はウイルスの膜融合能によって規定される、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 15 日、大阪
4. Yanagi Y, Paramyxovirus entry and fusion, The 34th Naito Conference on “Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine” 2012 年 10 月 17 日、札幌
5. Iwasaki M, Yanagi Y, The Sendai virus C protein supports efficient growth of measles virus in mouse cell lines, 15th

International Congress of Virology, 2011 年 9 月 13 日、札幌

6. Watanabe S, Shirogane Y, Ikegame S, Koga R, Nakashima M, Yanagi Y, Novel mutations in the measles virus fusion protein that enhance its fusion activity. 15th International Congress of Virology, 2011 年 9 月 13 日、札幌
7. 渡辺俊平、白銀勇太、池亀聡、古賀律子、柳雄介、細胞融合能を促進させる、麻疹ウイルス F 蛋白質の新規アミノ酸変異の同定、第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会、2011 年 8 月 27 日、北九州
8. 柳雄介、麻疹ウイルス—膜融合機構と新しい動物モデルの開発—、京都大学ウイルス研究所学術講演会、2011 年 7 月 5 日、京都
9. 古賀律子、池亀聡、大野真治、渡辺俊平、柳雄介、マウス神経細胞の麻疹ウイルス感染、第 58 回 日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島
10. 岩崎正治、池亀聡、白銀勇太、柳雄介、センダイウイルス C タンパク質は麻疹ウイルスのマウス培養細胞での増殖を促進する、第 58 回 日本ウイルス学会、2010 年 11 月 8 日、徳島
11. 古賀律子、大野真治、柳雄介、麻疹ウイルスによる免疫抑制機構の検討、第 57 回 日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京
12. Yanagi Y, Measles virus tropism and pathogenesis, The 4th Nagasaki Symposium on tropical and emerging infectious diseases, 2009 年 9 月 26 日、長崎

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/virus/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳雄介 (YANAGI YUSUKE)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：40182365

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：