

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07799

研究課題名(和文) ヒト神経組織と喘息マウスを用いた急性弛緩性脊髄炎の病態解明と予防・治療応用

研究課題名(英文) Elucidation of the Pathophysiology of Acute Flaccid Myelitis and Applications in Prevention and Treatment Using Human Nerve Tissue and Asthma Mouse Models

研究代表者

松重 武志 (Matsushige, Takeshi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60528941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性弛緩性脊髄炎(AFM)は新興感染症であり、エンテロウイルスD68との関連が示唆されているが、ヒト神経組織での直接的な感染証明は未だない。本研究では、手術で得られた末梢神経を用い、メタゲノム次世代シーケンサー解析で網羅的なウイルス検出を行い、エンテロウイルスD68やコクサッキーウイルスの断片を確認した。乳飲みマウスに限定したAFMモデルは確立しているが、現在は喘息モデルを用いた成熟AFMモデルの作成を試みている。今後、喘息感作を取り入れた成熟マウスモデルの開発を進め、人間の病態に近い条件での治療介入の可能性を探る。この進展により、AFMの病因解明と治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性弛緩性脊髄炎は、特に子どもに発症しやすく、重度の麻痺を引き起こす可能性がある病気である。当研究では、手術で得られた神経組織を用いてウイルスの特定を行い、AFMと関連するウイルスの断片を確認した。さらに、従来の乳飲みマウスモデルを超えて、人と同じ感染経路を持つ成熟マウスモデルの開発に取り組んでいる。より成熟した免疫システムを持つマウスを使用することで、病態解明と効果的な治療法の開発につながり、子どもたちの健康維持への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Acute flaccid myelitis (AFM) is an emerging infectious disease potentially linked to Enterovirus D68, though direct infection evidence in human neural tissue has not been established. In this study, peripheral nerves obtained during surgery were used for comprehensive viral detection through metagenomic next-generation sequencing. We identified fragments of Enterovirus D68 and Coxsackievirus, supporting their potential role in AFM. Currently, we are developing traditional suckling mouse models, which have shown mild paralysis, but not complete flaccid paralysis, with a low occurrence rate. Moving forward, we aim to develop asthma-sensitized mature mouse models that more closely mimic human disease conditions. This advancement will enable exploration of therapeutic interventions in settings that approximate human pathology, thereby enhancing our understanding of AFM pathogenesis and aiding in the development of effective treatments.

研究分野：小児神経学

キーワード：急性弛緩性脊髄炎 エンテロウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2015年と2018年に日本で報告された急性弛緩性脊髄炎(AFM)は、特に小児にポリオ類似の急激な麻痺を引き起こす新興感染症である。AFMは、急速に進行する神経症状を特徴とし、多くの症例で重篤な運動障害を残し、確立された治療法はない。エンテロウイルスD68(EV-D68)が原因の候補とされているが、直接的な感染証明はなされていない。AFMは国内外で同時多発的に発生しており、米国では2014年に1,000例を超える報告があり、以降も隔年で集団発生が確認されている。これらの事例から、AFMの発生は周期的である可能性があり、再発性または定期的な流行が予測される状況である。

日本国内でのAFMの疫学的調査により、発症前に多くの患者が上気道感染の症状を示しており、特にEV-D68が関連しているとされる症例では、喘息などの呼吸器疾患を有する子どもが重症化しやすいことが指摘されている。これに関連して、喘息発作とAFMの発症との間には何らかの関連する病態メカニズムが存在する可能性が高いと考えられ、症状発現から麻痺に至る過程で特有の免疫反応やウイルスに対する脆弱性が関与している可能性がある。

このような背景のもと、本研究ではAFMの発症機序を明らかにするために、ヒト神経組織におけるウイルスの直接的な証明と病態の解明を目的としている。AFMの遠隔期治療として神経移行術があり、全国からの患者が当施設近隣の病院へ紹介され、集約して手術が行われている。手術時に得られるヒトの末梢神経組織を用いた研究により、これまでに得られなかった神経組織での病原体や病態に関係する情報が分析できる可能性がある。

また、AFMの病態理解を深めるためには、ヒトの病態を模倣した動物モデルの開発が不可欠である。従来の乳飲みマウスを使用したモデルでは、ヒトと感染経路が異なること、治療介入研究に制限があること等の課題があった。そこで、よりヒトの病態に近い気道感染による成熟マウスモデルの開発を考えた。その中でも、喘息を有する個体での病態発現の解明は、AFMに対する新たな治療法や予防策の開発につながる重要な鍵となる。当施設では従来から喘息モデルマウスを用いて新型インフルエンザA/H1N1 pdm09感染時の重症化の病態解明を手がけてきた。これらを融合し、新しいモデルマウス作成により得られた研究成果は、将来のAFMの発生を予防し、効果的な治療法を提供するための基盤となることが期待される。

### 2. 研究の目的

この研究の主な目的は、AFMの原因となるウイルスを特定し、その伝播メカニズムと神経組織への影響を明らかにすることである。また、病原体と宿主の免疫系との相互作用を解析し、AFMの病態形成メカニズムを深く理解することを目指す。これに基づき、新たな予防策や治療戦略を開発するための基礎データを提供することが期待される。特に、喘息を基礎疾患とする患者群もしくはモデル動物でのウイルスの影響を特に注視し、これまでの理解を超えた新しい治療法の提案も目指している。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト神経組織を用いた解析

山口大学人医学系研究等倫理審査委員会の承認を得て研究を行った(H30-161)。

#### 標本の収集と保存:

神経移行術において、効果的に接合するために得られる末梢神経(患側および健側)の断端を、速やかに-80℃で凍結保存し、ドライアイスを用いて無菌的に移送した。キアゾール処理後にRNAを抽出した。病理検体として別に中性緩衝ホルマリンで固定した。

#### 神経検体の免疫染色:

ホルマリン検体は固定後、パラフィン包埋し、切片を作成した。脱パラフィン、ブロッキング後、一次抗体(抗EV-D68 VP1抗体)と蛍光標識された二次抗体を加え、蛍光顕微鏡(共焦点パスカル)で観察した。

#### RNA抽出とシーケンスの準備:

凍結検体から十分な量のtotal RNAを確保後、rRNAを除去してRNAの断片化を行い、ライブラリを構築した。この段階で断片化されたRNAからランダムプライマーを用いて逆転写反応を施し、高品質なcDNAを作成。さらにPCRによるcDNAの増幅とバーコード配列の付加を実施した。

#### 次世代シーケンス解析:

Illumina NovaSeq 6000 Reagent Kitを用いた次世代シーケンシング技術により、高スループットでのRNAシーケンスを実行した。得られたリードは品質管理を経てトリミングを行い、リファレンス配列(Homo sapiens GRCh37 (hg19) release-75)を基にゲノムアノテーションとデータマッピングを実施した。

## ウイルス遺伝子検出とメタゲノム解析:

rRNA を除いた全 RNA サンプルを対象に、メタゲノム解析を実施した。De novo 解析で個々の読み取りを組み合わせ、臨床的に重要なエンテロウイルス属 (EV A71, D68, Coxsackievirus A4, A16) を含め、2578 種の RNA-dependent RNA polymerase の配列とのマッチングを行った。また、病原性のあるものに限定して検出する解析キット (QIAseq × HYB Viral and Bacterial Panels) を用いて、89 種の病原体 (Coxsackievirus A 5 種、B 6 種、EV A71、D68、C 4 種を含む) を検出した。

## (2) モデルマウス作成と解析

Balb/c マウスを用い、出生 2-10 日の乳飲みマウスに対して、感染処置を行った。EV-D68 clade B3 を RD 細胞で増殖させ、ウイルス液を調整した。投与経路として、腹腔内投与もしくは筋注で、個体あたり 20  $\mu$ L を接種した。ウイルス力価は個体あたり  $1 \times 10^3$  もしくは  $1 \times 10^4$  CCID<sub>50</sub> とした。接種後のマウスの運動評価として、Hixon らの運動障害スコア (Hixon AM, et al. J Infect Dis 2017) を用いた。

0 No impairment

1 Mild impairment, ataxia or decreased movement present, toe/knuckle walking

2 Moderate impairment, profound ataxia, limited movement of limb

3 Severe impairment, no movement of limb, limb is non-weight bearing

経時的に体重を測定し、最大 10 日後までの麻痺を確認し、脊髄を採取、ホルマリン固定し、病理学的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト神経組織からのウイルスの検出

11 例 18 神経検体、および 1 例の急性期咽頭検体について解析を行った (表 1)。また、このうち一部は病理検体も得られ、代表 2 例の免疫染色結果を示す (図 1)。

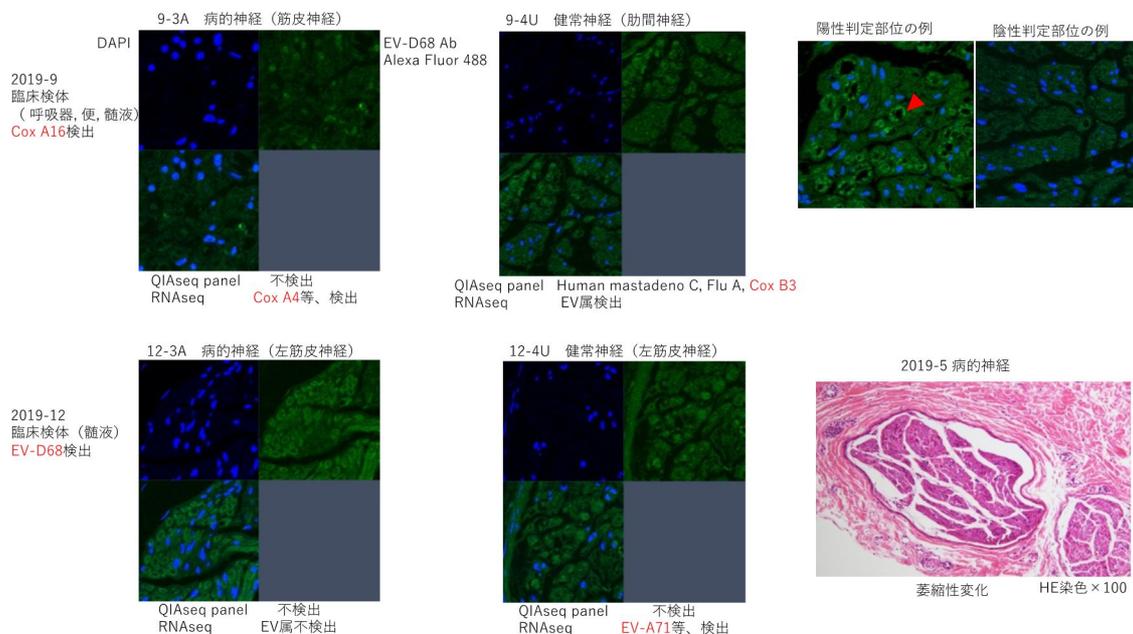
RNA シーケンスでは、多数のウイルスに合致する断片が検出された。これにはヒトへの病原性が認められていないウイルスが大半含まれたが、2 例で EV-D68 が検出され、5 例でエンテロウイルス属 (EV-D68, A71, Coxsackievirus A4, B1) が検出された。環境中ウイルスのコンタミが否定できなかったため、QIAseq Panel で追加解析を行ったところ、2 例でエンテロウイルス属が検出されたが、EV-D68 は検出されず、両解析法は合致しなかった。また、QIAseq Panel では Influenza virus などの無関係と思われる病原性ウイルスも検出された。

病理学的には、病的神経は萎縮性変化を示し、一部の神経で EV-D68 が染色された。染色陽性は病変側の神経だけでなく、移行する健側の神経にも見られた。しかし、これらの結果は、急性期の臨床的に検出されたウイルス、RNA シーケンスや QIAseq Panel で検出されたウイルスと合致しなかった。1 例は、急性期に髄液で EV-D68 が検出され、免疫染色で病変側および健側で淡く EV-D68 が染色されたが、健側の RNA シーケンスで EV-A71 が検出されたのみで、病変側からは関連すると思われるウイルスは検出されなかった。より正確なウイルス特定を目指して、解析は進行中である。

表 1 検体とウイルス検出状況のまとめ

Case No	Sample No	急性期検出ウイルス	QIAseq Panel結果	RNAseq結果
2019-8	8-2A (患側) 8-4U (健側)	EV-D68 (呼吸器)	Influenza A virus Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	EV-D68等、多数
2019-9	9-3A (患側) 9-4U (健側)	CA16 (呼吸器、便、髄液)	Not detected Human mastadenovirus C, Influenza A virus, Coxsackievirus B3	Coxsackievirus A4等、多数
2019-12	12-3A (患側) 12-4U (健側)	EV-D68 (髄液)	Not detected Not detected	EV-A71等、多数
2019-13	13-4A (患側) 13-6U (健側)	検査情報なし	Human endogenous retrovirus K113 Influenza B virus	EV-D68、EV-A71等、多数
2019-15	15-1U (健側)	検査なし	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	追加解析中
2019-16	16-1U (健側)	不検出	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus, Human mastadenovirus C, Middle East respiratory syndrome-related coronavirus, Influenza A virus, Human coronavirus NL63	追加解析中
2023-2	2023-2-3A (患側) 2023-2-1U (健側)	EV-D68 (咽頭)	Human parvovirus B19, Primate erythroparvovirus 1, Coxsackievirus A12 Human parvovirus B19	追加解析中
2023-3	2023-3-1A (患側)	EV-D68 (血液、髄液、便)、鼻陰性	Not detected	追加解析中
2023-4	2023-4-1A (患側)	検査情報なし	Influenza A virus, Human mastadenovirus C	追加解析中
2023-5	2023-5-4A (患側) 2023-5-5U (健側)	EV/Rhino (FilmArray 呼吸器パネル)	Not detected Human mastadenovirus C	追加解析中
	2022AFM急性期咽頭	不明	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	Coxsackievirus A4, B1, EV-A71等、多数
2024-1	2024-1-1U (健側) 2024-1-2A (患側)	EV-D68 (部位不明)	解析予定	解析中

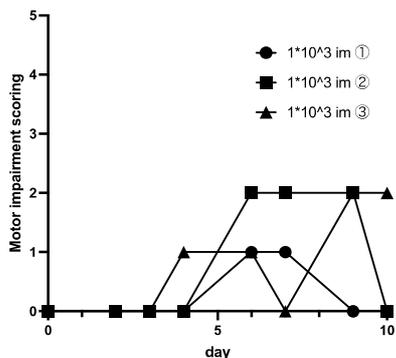
図1 ウイルス免疫染色を含む病理学的所見



(2) 新規マウスモデルの試み

新たなモデルマウスとして喘息感作 AFM 成熟マウスを作成するため、まずは当施設保有の EV-D68 clade B3 株で乳飲みマウスに対する感染、AFM 発症について条件を変えながら検証した。出生9日目マウスに対し、筋注もしくは腹腔内投与で 20 μL (個体当たり 1 × 10<sup>3</sup>, 1 × 10<sup>4</sup> CCID<sub>50</sub>) を接種したところ、1匹のみ接種側の下肢の動きが day 5 からやや不良となったが、他は明らかでなかった。出生3日目の乳飲みマウスに 1 × 10<sup>3</sup> CCID<sub>50</sub> 筋注を行ったところ、3匹中2匹で day4 から day9 にかけて軽度の麻痺を観察した(図2)。すべての個体で体重増加が経時的に見られた。その後、出生5日目マウスに対し、1 × 10<sup>4</sup> CCID<sub>50</sub> で筋注を行ったが、明らかな麻痺は見られなかった。すべての実験において、脊髄を採取し、病理標本を作成した。炎症細胞浸潤は明らかでなく、今後 EV-D68 免疫染色で脊髄へのウイルス直接浸潤を確認する予定である。

図2 モデルマウスの運動障害スコアの経時的変化



ウイルスの検出において、急性期の検出ウイルスから予想されたウイルスが検出されない場合があった。元々、EV-D68 は上気道でよく検出されるが、脳脊髄液から検出されることがごく稀にあることが知られている。今回得られた神経検体は感染した脊髄そのものではなく脊髄感染領域の末梢神経であること、感染から半年以上経過している遠隔期であること、保存条件等により RNA が断片化している可能性があること、環境からのコンタミネーションなどの要因が考えられる。一方、健側神経からもウイルスが検出されることは、臨床的に麻痺分布より広い範囲で脊髄の MRI 異常が見られることから、起こり得る結果と考えられる。これにより手術成績に影響が出るのかどうかは今後の検討課題である。今後は、より良い保存条件や解析条件でウイルスの正確な同定を行っていくこと、類似したウイルスの検出された断片が EV-D68 と共通した配列かどうか等を検討していく。また、ウイルス感染後の局所的な免疫応答や細胞応答の理解と神経回復の促進につなげるため、トランスクリプトーム解析、パスウェイ解析も検討していく。

喘息感作を施した AFM 成熟マウスモデルの開発において、乳飲みマウスでの実験結果が予想よりも麻痺の発症が少なく、その程度も軽かった。これは、使用した EVD-68 株 (clade B3) の病原性が低い可能性、使用したマウスの特性によるもの、感染経路やウイルス力価の問題など複数の要因が考えられる。過去のモデルマウスでは、遺伝子改変マウスやウイルス馴化株を使用して

いる報告もある。今後は、喘息感作による経気道的感染モデル作成に取り組んでいくが、喘息感作に日数を要する分、乳飲みマウスから成熟マウスとなることで通常は麻痺が発症しにくい条件となる。まずはウイルス株等の条件を最適化、実験系を安定化させていくなど新規マウスモデルの改良を進め、より人間の病態に近いモデルを開発し、最終的に基礎病態として喘息がある患者での AFM 発症や重症化のメカニズム解明、急性期治療や予防法の確立につなげていく。

コロナ禍により、一時ウイルス感染がほとんど見られなかった時期から、急激に多数の感染症が同時に、またこれまでと異なった季節に流行するような現象が各地で観察されている。今後も EV-D68 をはじめとした神経親和性の高いウイルス感染症が世界中で定期的に流行することが想定され、AFM の病態解明と効果的な予防法および治療法の開発は国際的にも重要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------