

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 24 日現在

機関番号：72801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659235

研究課題名（和文）神経性ウイルス粒子の脳移行における分子機構の解析

研究課題名（英文）Studies on molecular mechanisms for BBB permeation of neurotropic virus

研究代表者

二瓶 浩一（NIHEI COH-ICHI）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40373344

研究成果の概要（和文）：マウス血管内皮細胞、およびマウス in vitro BBB モデルを使用し、ポリオウイルス（PV）の体内動態を解析した。主な研究項目は、PV の血液脳関門透過機構の解明とその応用である。応用研究とは、物質の脳関門透過性を高める研究を推進することである。本研究により、PV が BBB を透過する際には、宿主のトランスフェリン受容体分子を利用している可能性を確認し、さらに他の分子も利用している可能性を示した。また、トランスフェリン上の PV 結合サイトを同定し、PV のキャプシド蛋白質 VP1 がその結合に重要に関与していることを示す事が出来た。

研究成果の概要（英文）：Poliovirus dissemination routes were investigated by using mouse capillary endothelial cells and mouse in vitro BBB model. Main interests were i) PV permeation mechanism through blood brain barrier (BBB), and ii) development of drug delivery system through BBB. Our data confirm that PV utilizes transferrin receptor to invade the central nervous system, and suggest that other host molecule might be involved in the BBB permeation. Moreover, our data indicates peptide regions on transferrin receptor and PV involved in the binding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ポリオウイルス、血液脳関門、神経性ウイルス、トランスサイトosis、ペプチド、トランスフェリン受容体、血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの PV 受容体 (hPVR) を持つトランスジェニック (Tg) マウスが開発され、サルに替わる感染実験モデルとして使用出来るようになっていた。この Tg マウスおよびノーマルマウスを使用した実験から、PV の血中から中枢神経系への移行 (BBB 透過) には、ヒト PVR 受容体は関与せず、マウスの分子のみで BBB 透過が起こる事が証明されていた。したがって、PV と相互作用するマウス分子が探索され、そのような分子の一つとして、トランスフェリン受容体が可能性ある分

子として挙げられていた。

## 2. 研究の目的

PV の BBB 透過機構を明らかにするため、トランスフェリン受容体と PV との間に相互作用があることを明らかにし、更にその結合に関与するペプチド部位を解明し、ペプチド部位のみで、BBB 透過を引き起こす事が出来るかを明らかにすることである。また、出来れば PV を取り込む際のエンドサイトosis のメカニズムを明らかにすることも目的としたと考えた。

### 3. 研究の方法

PV をマウス血管内皮細胞 MBEC4 または TM-BBB2 と一定時間、12°Cで触れさせ、その後、細胞を破砕し、PV 抗体（ハイパーイムン血清または protein G を使用して精製したもの）を使い免疫沈降を行い、沈降物の中に、トランスフェリン受容体およびその他の受容体が存在するかを質量分析法で調べた。

次に、同様の免疫沈降実験を PV 量を変化させ行い、免疫沈降される細胞側蛋白質の量の変化を観察した。

精製した PV および精製したトランスフェリン受容体または他の受容体を使用して *in vitro* 実験も行い、*in vivo* の結果を確認した。

PV 粒子とトランスフェリン受容体または同定された他の受容体との結合に関与しているペプチドを同定するために、トランスフェリン受容体または他の受容体の各部分に GST を融合させた蛋白質を合成し、PV 粒子との結合実験を行った。次に同定したトランスフェリン受容体上のペプチドと結合する PV 粒子上のペプチドを同様の結合実験を行い、同定した。

同定した PV 粒子ペプチドについてマウス血管内皮細胞 MBEC4 を使用して *in vivo* イメージング解析を行った。コントロールとしては、トランスフェリン受容体に対するモノクローナル抗体 OX-26 を使用した。

トランスフェリン受容体が PV の BBB 透過の際に働く受容体であることを確かめるため、MBEC4 細胞を使用した、*in vitro* BBB model を作製し、PV の BBB 透過を抗トランスフェリン受容体抗体が阻害するかを観察した。

マウス脳血管細胞におけるトランスサイトシス経路の可視化システムの構築のため、マウス脳血管内皮細胞 (MBEC4, TM-BBB2) を使用しての観察に適した培養条件を確立することをを行う。

PV が感染し、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、ゴルジ体（トランスゴルジネットワーク）およびリソソームを明確に判別することが証明されている COS-1 細胞を用いて蛍光標識ポリオウイルスのエンドサイトシス観測系の構築を行い、次にマウス脳血管内皮細胞観測系に導入する。観測は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行う。

PV の蛍光標識には、粒子表面を AlexaFluor-488 (-555) でラベル化する。

### 4. 研究成果

まず、PV とトランスフェリン受容体の関係を確認するために、MBEC4 細胞に PV を加え、12°Cで4時間培養し、細胞を破壊した後、PV のウサギハイパーイムン血清を加えて免疫沈降を行った。沈降物をゲル電気泳動法で分

離した後、トランスフェリン受容体に対する抗体を使用し、ウエスタンブロット法を行ったところ、トランスフェリン受容体が検出され、PV とトランスフェリン受容体との結合が確認された。また、最初に加える PV の量を多くすると、沈降してくるトランスフェリン受容体量もそれに伴って増えることから、PV の BBB 透過には、トランスフェリン受容体が重要な関与をしていると思われた。

以上は、PV のウサギハイパーイムン血清を用いた実験であった。その後、この血清をプロテイン G を使用して精製し、精製抗体を使用したところ、上記実験で、トランスフェリン受容体をウエスタンブロットで検出出来なくなった。このことは、これまでの *in vitro* の研究成果も否定することになるので、大変深刻に受け止め、この現象を解析した。最初の細胞と PV の培養時間や温度の条件に始まり、多くの実験が繰り返された。その結果、*in vitro* 実験の結果は揺るぐことが無かったため、MBEC4 細胞にトランスフェリン受容体を過剰発現させた細胞を作製し、精製抗体を使用して同様の実験を行った。その結果、トランスフェリン受容体がウエスタンブロットで検出できた。

以上の結果は、PV とトランスフェリン受容体の結合力が、思っていたように強いものではないことを示しているのかも知れなし、トランスフェリン受容体以外の分子が本当の PV の BBB 透過に必要な分子なのかもしれない。現在、PV 結合分子の質量分析により、新たな分子も視野に入れて実験が繰り返されている。また最初に加える PV は、現在未精製 PV を使用しているが、精製 PV を使う必要があるかも知れない。多くの事を思案しながら、データを固めているところである。

*In vitro* における、PV とトランスフェリン受容体の結合性を確認するため、PV とタグを付加したトランスフェリン受容体を混合し、タグの抗体を使用して免疫沈降法による解析を行ったところ、PV とトランスフェリン受容体は結合することが証明された。その結合力はかなり強いものと推定された。

タグには、MBP（マルトース結合蛋白質）または、GST を使用した。次にトランスフェリン受容体の各部分をタグ付きで発現させ、PV との結合実験を行った。その結果、トランスフェリン受容体の AD (apical domain) に結合することが判明した。

次に、トランスフェリン受容体の AD が PV の粒子表面のどのペプチドと結合するかを調べた。まず、PV のキャプシド蛋白質である VP1 から VP3 を調べると、VP1 が効率良く結合した。さらに、VP1 の各ペプチド部位を調べた。その結果、以前同定した VP1 の GH ループは、今回候補のペプチドとはならなかった。何故、前回と今回のデータが合わないか

は、現在実験を繰り返しながら検証している。更に、VP1 の各ペプチドを使用して、GFP との融合蛋白質を作製し、マウス血管内皮細胞 MBEC4 と培養した。その結果、これらのペプチドは、細胞内へ GFP を運ぶことが明らかとなった。今後は、実際にマウスを使用して血管から BBB を越えて中枢神経系に侵入する様子を観察したい。

エンドソームに PV が取り込まれるメカニズム、および脳血管上皮細胞内での移行メカニズム、さらに細胞の逆側からの PV の放出メカニズムに関しては、今後の研究成果に寄ることになってしまったが、今年度は、PV とマウス血管内皮細胞との結合が、思っていた程、強くは無く、PV の精製抗体を使用すると免疫沈降するトランスフェリン受容体の量が、非常に少なくなることが明らかになった。

以下に、トランスフェリン受容体が PV の第二の受容体である可能性について、議論したい。

トランスフェリンは鉄と結合し、トランスフェリン受容体によってリサイクリングエンドソームに取り込まれ、細胞内に運ばれる。全ての細胞は、鉄を必要とするから、トランスフェリン受容体はどの細胞にも存在するはずである。またトランスフェリンは、血中に大量に存在する。

これまでに、本研究グループは、PV とトランスフェリンは、マウス血管内皮細胞への取り込み過程で競合するとの実験結果を得ており、PV のトランスフェリン受容体への結合力を示している。また、PV の *in vitro* BBB 透過をトランスフェリン受容体の PV 結合サイトのペプチドが阻害的に働くことも示している。

トランスフェリンの受容体結合サイトは PV の結合サイトとは異なるが、両者が競合するという事は、どちらかが結合すると、受容体は構造変化を起こすのであろうと考えられた。

トランスフェリン受容体がどの細胞にも存在するという事は、「トランスフェリン受容体が PV の BBB 透過に特異的に働く」という考えに反する。しかしながら、PV の第一の受容体（感染するために必要）も全身で発現しているが、感染する組織・細胞は決まっていることを考えると、何かのメカニズムが働いて、特異的であると感ぜさせているのかもしれない。実際に、I 型インターフェロン受容体 KO マウスでは、PV が全身の組織に感染することが分かっている。したがって、特異的組織だけで PV は感染し、増殖すると見えるのは、インターフェロン応答が決めていたことが明らかになった。トランスフェリン受容体も脳血管内皮細胞では、Apical に発現しており、その他の組織では Basolateral に発現しているとの報告があり、そのために PV

は、脳血管内皮細胞によってのみ、トランスフェリン受容体が起こるのであろうか？

最後に、PV とトランスフェリン受容体との共沈殿に使用した、PV 抗体について述べたい。この抗体は、ウサギハイパーイムン血清とそれをプロテイン G で精製したものである。

両者とも、PV に対する反応は問題なく、PV とトランスフェリン受容体との複合体に対するアフィニティが異なる。

精製中に落としてしまった物質の中にこの複合体に対しアフィニティ高く反応する PV 抗体があったのかもしれない。精製抗体は、IgG が主である。その他の Ig サブタイプが重要であるとすれば、新たな発見である。

未精製 PV 抗体について考えると、ウサギの体内に入った PV は感染する細胞もないまま、ウサギ体内で種々の蛋白やその他の物質と結合しているであろう。その PV 複合体に対する抗体が作られることは、想像が付き、PV 複合体の中には PV とウサギトランスフェリン受容体との複合体も含まれるはずである。このような複合体に対する抗体には IgG が少ないとすれば、本研究で観察された現象は簡単に説明が付き。

しかしながら、本当に PV とトランスフェリン受容体のアフィニティが弱く、本当の BBB 透過用の受容体が他に存在する可能性がある。現在の時点の状況が、本研究の正念場であると認識し、あらゆる実験を繰り返しながら、人類初となる、神経性ウイルスの BBB 透過メカニズムの解析を進めたい。

## 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 1 件)

(1) Seii Ohka, Coh-ichi Nihei, Manabu Yamasaki, Akio Nomoto. Poliovirus trafficking toward central nervous system via human poliovirus receptor-dependent and-independent pathway. *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 3:1-5, 2012  
DOI:10.3389/fmicb.2012.00147

[学会発表] (計 2 件)

(1) 水谷壮利, 二瓶浩一, 山崎学, 石坂彩, 野本明男, ポリオウイルスの血液脳関門透過機構の解析, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 14 日, グランキューブ大阪 (大阪)

(2) Coh-ichi Nihei, Manabu Yamasaki, Akio Nomoto. Characterization of a receptor for poliovirus BBB-permeation. *International Union of Microbiological Societies 2011*

Congress, 2011年9月13日, 札幌コンベンションセンター (北海道)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 血液脳関門を透過する薬物輸送体、ペプチド及びその用途

発明者: 野本明男、二瓶浩一

権利者: 公益財団法人微生物化学研究会

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/052225

出願年月日: 2012年2月1日

国内外の別: 外国

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二瓶 浩一 (NIHEI COH-ICHI)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号: 40373344