

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 21 日現在

機関番号：82603
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659237
研究課題名（和文）ウエストナイルウイルス感染における脳内浸潤 T 細胞による病態形成機序
研究課題名（英文）Role of brain-infiltrating T lymphocytes in the pathogenesis of West Nile virus infection
研究代表者 倉根 一郎 (KURANE ICHIRO) 国立感染症研究所・副所長 研究者番号：90278656

研究成果の概要（和文）：

ウエストナイルウイルス感染マウスモデルを用いて、脳炎発症時の脳内における T 細胞の抗原特異性および免疫学的特徴について解明することを目的として研究を遂行した。感染マウスの脳では CD3、CD8、CD69 の発現レベルが増加した。これらの結果は脳内に活性化された CD8 T 細胞が有意に浸潤していることを示している。また、T 細胞レセプター解析により、細胞はクローナルな T 細胞であることが明らかとなった。脳内に浸潤している T 細胞は日本脳炎ウイルスには反応せず、ウエストナイルウイルス特異的であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We characterized brain-infiltrating T lymphocytes in mice infected with West Nile virus (WNV). The expression of CD3, CD8, CD69 positively correlated with viral RNA levels. The results suggest that activated Th1-like cytotoxic CD8(+) T cells are expanded in the brains in response to WNV infection. T cell receptor analysis demonstrated that WNV-specific CD3(+)CD8(+) T cells expanding in the infected brains are highly oligoclonal. Further, the infiltrating CD8(+) T cells were WNV-specific, but not cross-reactive to Japanese encephalitis virus.

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	600,000	3,500,000

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：ウイルス・感染症・微生物・脳神経・免疫学

1. 研究開始当初の背景

ウエストナイルウイルス (WNV) はフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスであり、罹患者の約 20～30% でウエストナイル熱を発症し、インフルエンザ様症状を認める。さらに感染者約 150 例に 1 例で髄膜炎および

脳炎のような重篤な神経症状を伴う。ヒトに対するワクチンや特異的治療法は存在せず世界的にもまた我が国にとっても軽視できない感染症である。WNV 感染症で一部の症例において重篤な脳炎を引き起こすメカニズムは不明である。T 細胞は感染からの回復に

重要な役割を果たす一方、この細胞性免疫が脳炎の病態形成に關与するという知見も出されている。新たな治療法開発やワクチン開発の基盤を確立するためには、WNV 感染に伴い脳へ浸潤する T 細胞の抗原特異性および免疫学的挙動について解明する必要がある。

2. 研究の目的

ウエストナイルウイルス (WNV) 感染後経時的に脳を採取し、免疫組織学的検討、リアルタイム PCR による免疫関連遺伝子の発現解析により、ウイルスの局在および浸潤細胞の免疫性状などの詳細な検討を行う。また、T 細胞受容体 (TCR) レポートリー解析により、脳内浸潤 T 細胞のクローン特異性を絞り込む。特定された T 細胞は、JEV 特異的 T 細胞と比較する。本研究により、ウエストナイル脳炎において脳内に浸潤している T 細胞の他の類似ウイルスとの交差性等、ウイルス免疫学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ウエストナイルウイルス NY99-6922 株を C3H/HeN マウス腹腔内接種した。30LD₅₀ 腹腔内接種し経時的に脳を採取した。脳は直ちに RNA 安定化試薬に浸漬して組織内 RNA を安定化させた。これをサンプルとして total RNA を抽出し、一部の脳は病理学的評価に用いウイルスの分布およびリンパ球の浸潤程度を経時的に比較解析した。

(2) 脳から抽出した total RNA をサンプルとして TCR レポートリー解析を行った。total RNA から cDNA を合成した後、adaptor を付加した。次いで消化酵素処理により adaptor 付加 cDNA を付加し、TCR 定常領域にそれぞれ相補的なプライマーセットを用いて nested PCR を行った。得られた PCR 産物を全ての TCRAV ファミリーおよび TCRBV ファミリーにそれぞれ相補的なオリゴ DNA を固層化したマイクロプレートに播種してハイブリダイズさせた後、酵素反応を用いて発色させ吸光度を測定する。得られた吸光度から、各 TCR V ファミリーの存在率を算出することにより、mRNA レベルにおける脳内浸潤 T 細胞の TCR V ファミリーの偏在性を検討した。

(3) T 細胞 clonality および CDR3 シークエ

ンス解析：NV 感染マウスの脳内における TCR レポートリーに偏りが見られた場合には CDR3 size spectratyping によりフラグメント解析を行い、T 細胞の clonality を確認する。さらに各 TCR 遺伝子を TA-cloning 法によりプラスミドにクローニングし、塩基配列を解析することにより CDR3 シークエンスレベルの発現頻度を解析した。

(4) 脳内におけるリンホカイン産生はリアルタイム PCR 解析で行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および国立病院機構相模原病院 臨床研究センターにおける実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

4. 研究成果

(1) ウエストナイルウイルス感染後の脳内における細胞マーカー、サイトカイン産生：ウエストナイルウイルス感染マウスの脳では CD3、CD8、CD25、CD69、Perforin、Granzyme A、Granzyme B の発現レベルが増加した。サイトカイン産生においては IFN γ 、TNF α 、IL2 の増加が認められた (図 1)。これらの結果は脳内に CD8 T 細胞が有意に侵入していることを示している。

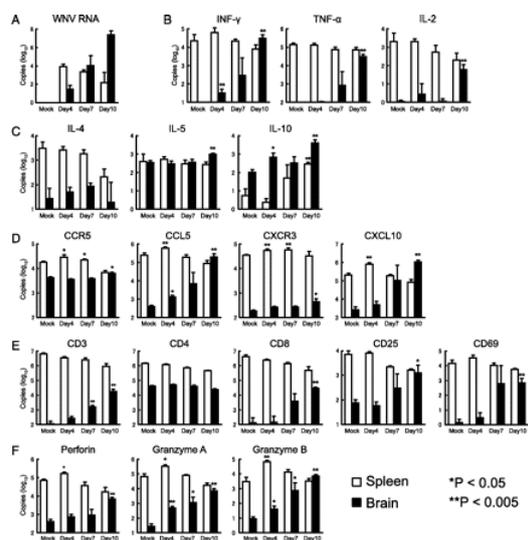


図 1：ウエストナイルウイルス感染後の脳内における細胞マーカー、サイトカイン産生パターン

(2) T細胞レセプター解析：脳内においては VA1-1、VA2-1、VB5-2、VB8-2 を発現する T細胞が増加していることが示された (図2)。これらの T細胞レセプターは CDR3 size spectratyping によりシングルピークを示し、さらに CDR3 部位のアミノ酸解析からも、高い clonality を示すことが明らかとなった (表1)。

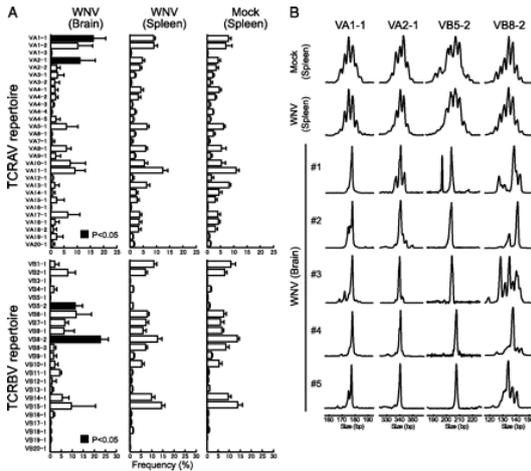


図 2：ウエストナイルウイルス感染マウスにおける脳内浸潤 T細胞の T細胞レセプターパターン

Clone frequency	V	N	J	J gene					
					Brain	Class			
#1	24/51	CAVS	TE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	21/51	CAVS	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	2/51	CA	ASGL	SKNYVRF	AJ24	1	1	1	1
	2/51	CA	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	1/51	CA	FL	NTLQVTE	AJ59	1	1	1	1
#2	33/52	CAVS	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	8/52	CAVS	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	6/52	CAVS	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	3/52	CAVS	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	1/52	CA	ADNE	QWVYF	AJ40	1	1	1	1
	1/52	CA	ASD	TSNMLQL	AJ27	1	1	1	1
#3	13/50	CAVS	PG	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	9/50	CA	AK	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	8/50	CA	ADN	TSNMLQL	AJ27	1	1	1	1
	4/50	C	QWVQ	SKNYVRF	AJ24	1	1	1	1
	4/50	CAVS	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	3/50	CA	ASD	TSNMLQL	AJ27	1	1	1	1
	3/50	CAVS	FA	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	2/50	CAV	NTLQVTE	AJ59	1	1	1	1	1
	1/50	C	QWVQ	SKNYVRF	AJ24	1	1	1	1
	1/50	CA	ASD	TSNMLQL	AJ27	1	1	1	1
#4	28/52	CAV	ASD	TSNMLQL	AJ27	1	1	1	1
	16/52	CAVS	TE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	6/52	CAVS	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	3/52	CAVS	P	SDSNNAL	AJ42	1	1	1	1
	2/52	CA	ASD	TSNMLQL	AJ27	1	1	1	1
#5	18/51	CAVS	RE	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	12/51	CAVS	E	TSNMLQL	AJ27	1	1	1	1
	9/51	CAVS	R	TSNMLQL	AJ27	1	1	1	1
	7/51	CAVS	PG	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	4/51	CA	AK	NSITYPFE	AJ13	1	1	1	1
	1/51	CAV	LV	QADKTE	AJ25	1	1	1	1

表 1：脳内浸潤 T細胞の T細胞レセプターの CDR3 領域のアミノ酸解析

(3) 脳内浸潤 T細胞のウイルス特異性：脳内に浸潤している T細胞はウエストナイルウイルスに高い反応性を示した。これらの T細胞が他のフラビウイルスである日本脳炎ウイルス (JEV) に対する交叉反応性を調べると、JEV には反応せず、WNV 特異的であることが示された。

(4) 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳内浸潤 T細胞の解析：

上記ウエストナイルウイルス感染モデルにおいて明らかになった現象が、ウエストナイル脳炎に特徴的であるか、あるいは類似ウイルスにおいても同様に認められる現象であるかを解析した。

日本脳炎ウイルス感染マウスの脳では、ウエストナイル感染マウスと同様に、CD3、CD8、CD25、CD69、Perforin、Granzyme A、Granzyme B の発現レベルが増加した。また脳内サイトカインバランスを測定した結果、脳内サイトカインバランスも同様に Th1 側に偏ってい

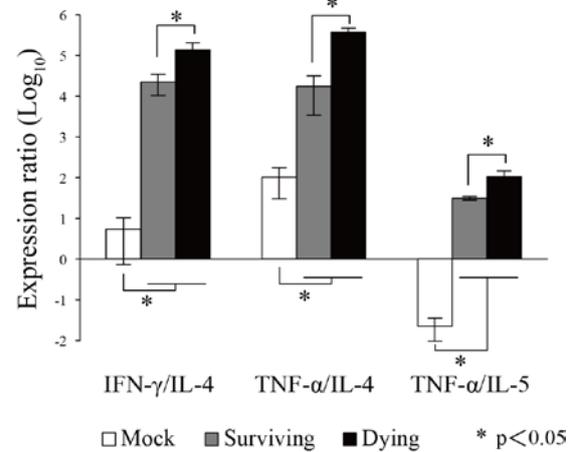


図 3：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳内サイトカイン産生パターン。

TCR レパトア解析で、JEV 感染マウスの脳では、TCRAV8-1、10-1、BV2-1 が有意に増加していたが、これらの T細胞レセプター発現細胞も Clonal な細胞であった (図4)。

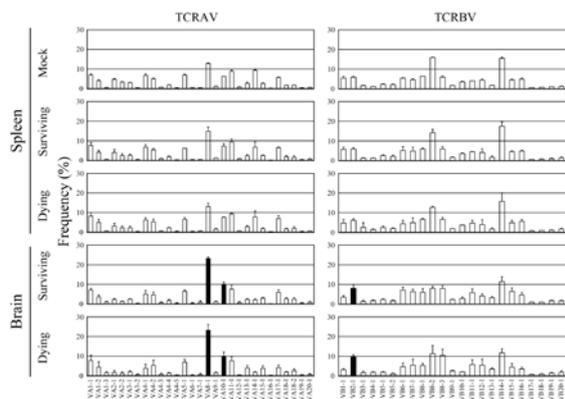


図 4：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳浸潤T細胞のT細胞レセプターパターン

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)

Kitaura, K., Fujii, Y., Hayasaka, D., Matsutani, T., Shirai, K., Nagata, N., Lim, C.K., Suzuki, S., Takasak, T., Suzuki, R. and Kurane, I.: High clonality of virus-specific T lymphocytes defined by TCR usage in the brains of mice infected with West Nile virus. *Journal of Immunology*. 187(8):3919-3930, 2011.

DOI: 10.4049/jimmunol.1100442

[学会発表] (計2件)

白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症にかかわる脳内浸潤T細胞の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月13-15日

早坂大輔、青木康太郎、北浦一孝、白井顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松由基、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月13-15日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉根 一郎 (KURANE ICHIRO)

国立感染症研究所・副所長

研究者番号：90278656

(2) 研究分担者

鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI)

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床

研究センター・室長

研究者番号：70373470