

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591589

研究課題名(和文) 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)多段階変異発症モデルの構築

研究課題名(英文) Molecular model of accumulation of multiple mutations on the way of transition of a measles virus to a subacute sclerosing panencephalitis virus

研究代表者

伊藤 正恵 (ITO, Masae)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10201328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルスから亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis: SSPE)ウイルスへの変異過程の分析を基に発症機構を解明する目的で、SSPE発症6週間後の5歳患児から分離したSSPEウイルスKobe-1株について解析した。神経病原性の発現にはウイルスの細胞融合能の亢進が深く関わり、そのためFおよびM蛋白質の変異が必須であった。またH蛋白質の変異はこれを促進した。FおよびH蛋白質上には、逆にウイルスの細胞融合能を抑制して増殖を制限する変異が見出され、これらの変異は麻疹ウイルスが神経病原性を獲得するまで患者体内で潜伏感染することに関連すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the accumulated multiple mutations was performed on the genome of a subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus Kobe-1 strain isolated from a 5-year-old patient 6 weeks after the disease onset with the aim to elucidate the molecular mechanism underlying SSPE development. Virus cell-cell fusion ability was closely related with its neuropathogenicity, for which mutations not only on the F protein but also on the M protein were indispensable. Mutations on the H protein enhanced the pathogenicity. On the other hand we successfully identified some mutations on the F and H proteins that suppress virus cell-cell fusion and as a result restrict virus replication. These suppressive mutations were considered to be involved in the considerably long-time persistent infection of a measles virus in the brain of the patient before the measles virus acquires neuropathogenicity and becomes SSPE virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス SSPEウイルス 神経病原性 細胞融合

1. 研究開始当初の背景

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis, SSPE) は、通常の麻疹を経験した小児の約 10 万人に 1 人が発症する重篤な致死性ウイルス疾患である。麻疹完治後 5~10 年の長い潜伏期間を経て発症し、歩行異常や知能の低下、性格の変化などで気付かれることが多いが、Stage 1 から 4 へと大脳機能が進行性に冒されるという悲劇的な経過をたどる。脳脊髄液中に高力価の抗麻疹ウイルス抗体が認められると同時に、脳内病巣からは変異麻疹ウイルス (SSPE ウイルス) が分離されており、麻疹ウイルスの脳内感染が原因であることが証明されている。しかしながら SSPE という疾患の性格上、病因ウイルスを大脳組織から分離できる機会は限られており、発症機序のウイルス学的解析は進んでいない。

2. 研究の目的

これまでに分離された SSPE ウイルスには、長期にわたる潜伏感染の間に全ての遺伝子に多くの変異の蓄積が認められる。本研究では、これらの変異を、増殖の極めて抑制された持続感染段階を経て、ウイルスが再活性化され神経病原性を獲得する多段階変異の軌跡と捉え、SSPE ウイルスに共通する特徴である感染性ウイルス粒子形成能の欠失、膜融合能の亢進、神経病原性の獲得、などに対応させることにより、麻疹ウイルス感染から SSPE 発症へと至る分子機構を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

本研究では、可能な限り変異の少ない SSPE ウイルスを解析することが SSPE 発症機構の解明につながる、との考えから、SSPE 発症 6 週間後の 5 歳患児から分離され、SSPE ウイルスの中でも変異の極めて少ない Kobe-1 株を用いた。各変異がウイルス性状に及ぼす影響について、リバーシジェネティクス法により組換えウイルスを作製して検討す

るとともに、変異ウイルス蛋白質の機能変化を調べ、神経病原性への関わりについて解析した。図 1 に示すように、組換えウイルスには、感染が容易に観察できるよう、オワンクラゲ由来の蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein: EGFP) を挿入している。

4. 研究成果

(1) 神経病原性発現に関わる遺伝子

SSPE ウイルス Kobe-1 株は、患児が麻疹を罹患した時期の流行株で、その親株に近いと考えられる遺伝子型 D3 の麻疹ウイルス Ich-B 株と比較して、N 蛋白質に 3 カ所、P 蛋白質に 7 カ所、C 蛋白質に 1 カ所、V 蛋白質に 4 カ所、M 蛋白質に 3 カ所、F 蛋白質に 9 カ所、H 蛋白質に 8 カ所、L 蛋白質に 14 カ所の計 49 カ所のアミノ酸置換と、F 蛋白質に 1 カ所のフレームシフト、H 蛋白質にストップコドンの変異による C 末端への 4 アミノ酸の付加がある。Ich-B 株を乳飲みマウスの脳内に接種しても何ら症状を示さないが、Kobe-1 株は、神経病原性を示してマウスを高率で死亡させる。Kobe-1 株において、マウス神経病原性を誘導するウイルス蛋白質を同定する目的で、Kobe-1 株と Ich-B 株の間で、リバーシジェネティクス法により M、F および H 蛋白質の遺伝子を組換え、一連のキメラウイルスを作製した (図 1)。これらの組換えウイルスを乳飲みマウスに脳内接種したところ、Kobe-1 株の M、F あるいは H 遺伝子は、単独ではマウスを死亡させなかったが、M および F 遺伝子を同時に Ich-B 株に導入すると Kobe-1 株と同程度以上の病原性を示した。さらに、M、F に加えて Kobe-1 株の H 遺伝子を持つと、わずかに病原性が上昇した。

以上より、SSPE ウイルス Kobe-1 株では、M 蛋白質と F 蛋白質が協働で神経病原性を発揮していることが明らかとなった。

(2) Kobe-1 株の M、F および H 蛋白質を持つウイルスの性状

SSPE ウイルスの神経病原性は、ウイルスの細胞融合能に深く関係しているとの報告がある。F 蛋白質は膜融合活性を担い、M 蛋

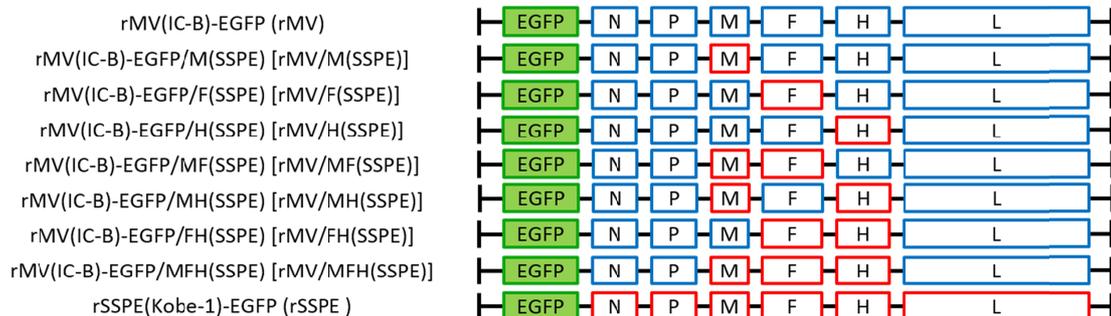


図 1. 作製した組換えウイルス
青: Ich-B株由来の遺伝子 赤: Kobe-1株由来の遺伝子

白質は F 蛋白質と相互作用して融合活性に影響を与える可能性がある。また H 蛋白質は、F 蛋白質の融合活性を起動させる働きがあり、必須である。そこで、作製した組換えウイルスの細胞融合能を調べた。Vero/SLAM 細胞における細胞融合能は、Kobe-1 株の M、F あるいは H 蛋白質を単独で持つウイルスでは、Ich-B 株と変わらなかったが、M 蛋白質と F 蛋白質を同時に持つと顕著に亢進した。H 蛋白質が加わると、さらに上昇した (図 2)。

次に、これらの組換えウイルスを神経細胞に感染させ、その増殖を観察した。SH-SY5Y 細胞 (神経芽細胞腫由来) において、M 遺伝子と F 遺伝子を同時に組換えした場合に、大きく感染が拡大した。F 遺伝子と H 遺伝子を組換えした場合でも、神経細胞に接種後数日間、ある程度の感染が観察されたが、それ以上の拡大は起こらなかった。

以上より、マウス神経病原性の発現ならびに神経細胞での感染拡大と細胞融合能の亢進は深く関連しており、そのために Kobe-1 株では、F 蛋白質の変異のみでは不十分で、M 蛋白質の変異が必要であり、H 蛋白質は更にこれを促進する、と結論できる。

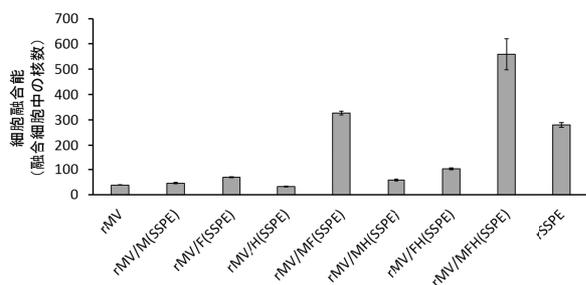
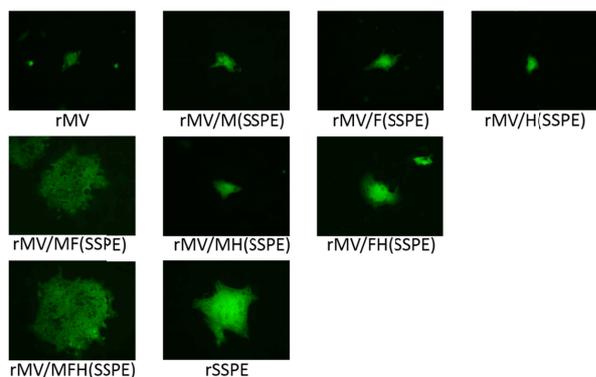


図 2. 組換えウイルスの細胞融合能
細胞: Vero/SLAM

(3) Kobe-1 株 F 蛋白質の変異解析

蛋白質発現プラスミドを用いて F 蛋白質と H 蛋白質を共発現させ、F 蛋白質の細胞融合活性を Kobe-1 株と Ich-B 株と比較した。

Kobe-1 株 F 蛋白質は細胞融合活性が大きく上昇しており、温度依存的検討から、蛋白質分子が不安定化しているためと考えられた。Kobe-1 株 F 蛋白質の 10 カ所の変異について細胞融合活性におよぼす影響を調べたところ、G301W および Y398H 変異が細胞融合活性の上昇に寄与していた。一方、G401E は、逆に融合活性を抑制する変異であった。

Ich-B 株の F 蛋白質に G401E の点変異を導入した組換えウイルスは、増殖が強く制限された。

(4) M 蛋白質が細胞融合に及ぼす効果

蛋白質発現系により、F 蛋白質と H 蛋白質を共発現させて誘導した細胞融合に対する M 蛋白質の影響を調べた。Ich-B 株、Kobe-1 株、いずれの F 蛋白質と H 蛋白質を組み合わせても、Ich-B 株の M 蛋白質が細胞融合を 60% 程度阻止したのに対し、Kobe-1 株の M 蛋白質は、細胞融合抑制能をほぼ完全に欠失していた。Kobe-1 株の M 蛋白質の 3 カ所の変異、L165P、L250P、Y282H のうち、この現象にどの変異が重要か、今後明らかにしていく。

(5) Kobe-1 株 H 蛋白質の変異解析

Kobe-1 株 H 蛋白質が細胞融合活性におよぼす影響を検討した。

Kobe-1 株 H 蛋白質は、Ich-B 株の F 蛋白質の融合活性を起動させる能力が Ich-B 株の H 蛋白質よりも低く、細胞融合を抑制した。一方、Kobe-1 株の F 蛋白質に対しては、非常に高い起動能力を示し、細胞融合を増強した。

(6) 麻疹ウイルスから SSPE ウイルスへの変異過程についての考察

以上の結果から、Kobe-1 株の神経病原性の発現には、ウイルスの細胞融合能の亢進が関わっており、そのため、F 蛋白質と M 蛋白質が必須であること、さらに H 蛋白質がそれを促進することが明らかになった。F 蛋白質上の変異では、G301W および Y398H 変異が重要であることが示唆された。

一方、F 蛋白質には、細胞融合活性を抑制し、ウイルス増殖を制限する変異も見つかった。また、Kobe-1 株の H 蛋白質は、F 蛋白質が Kobe-1 株に変異すると初めて効率良くその融合活性を起動させ得るが、Ich-B 株のままでは逆にその効率が低いことが示された。これらの結果は、麻疹ウイルスが麻疹治療後の患者体内で、神経病原性を獲得して SSPE を発症するまでに、長期にわたり潜伏感染していることに関与している可能性があり、今後解明すべき課題である。

<引用文献>

Minoru Ayata, Kaoru Takeuchi, Makoto Takeda, Shinji Ohgimoto, Seiichi Kato, Luna Bhatta Sharma, Miyuu Tanaka, Mitsuru Kuwamura, Hiroshi Ishida, Hisashi Ogura. The F gene of the Osaka-2 strain of measles virus derived from a case of subacute sclerosing panencephalitis is a major determinant of neurovirulence. *Journal of Virology*, 84(21): 11189-11199, 2010

doi: 10.1128/JVI.01075-10

Shumpei Watanabe, Yuta Shirogane, Satoshi O. Suzuki, Satoshi Ikegane, Ritsuko Koga, Yusuke Yanagi. 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

Shumpei Watanabe, Shinji Ohno, Yuta Shirogane, Satoshi O. Suzuki, Ritsuko Koga, Yusuke Yanagi. Measles virus mutants possessing the fusion protein with enhanced fusion activity spread effectively in neuronal cells, but not in other cells, without causing strong cytopathology. *Journal of Virology*, 89(5): 2710-2717, 2015

doi: 10.1128/JVI.03346-14

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Kiyoshi Tachiki, Mika Kuramoto, Misuzu Kaneko, Mayuko Nawa, Yusuke Niwa, Masae Itoh. Capture of influenza viruses and prevention of their infection by coral mineral powder (sango powder). *Biocontrol Science*, 17(1): 17-25, 2012 査読有

Min Zhou, Yoshinori Kitagawa, Mayu Yamaguchi, Chika Uchiyama, Masae Itoh, Bin Gotoh. Expedient neutralization assay for human metapneumovirus based on a recombinant virus expressing Renilla luciferase. *Journal of Clinical Virology*, 56(1): 31-36, 2013 査読有

10.1016/j.jcv.2012.09.014

Hiroshi Wakimoto, Masakatsu Shimodo, Yuto Satoh, Yoshinori Kitagawa, Kaoru

Takeuchi, Bin Gotoh, Masae Itoh. F-Actin Modulates Measles Virus Cell-cell Fusion and Assembly by Altering the Interaction between the Matrix Protein and the Cytoplasmic Tail of Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 87(4): 1974-1984, 2013 査読有

10.1128/JVI.02371-12

Yoshinori Kitagawa, Mayu Yamaguchi, Min Zhou, Machiko Nishio, Masae Itoh, Bin Gotoh. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits TRAF6-mediated ubiquitination of IRF7 to prevent TLR7- and TLR9-dependent interferon induction. *Journal of Virology*, 87(14): 7966-7976, 2013 査読有

doi: 10.1128/JVI.03525-12.

Kayo Sugimoto, Hotta Hak (14th/total 16) *et al.* Factors of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy and mechanism of viral clearance. *Digestive Diseases*, 31(5-6): 421-425, 2013 査読有

doi: 10.1159/000355239

Mayu Yamaguchi, Yoshinori Kitagawa, Min Zhou, Masae Itoh, Bin Gotoh. An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: Inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction. *FEBS Letters*, 588(1): 28-34, 2014 査読有

doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.015

Yuto Satoh, Mitsuhiro Hirose, Hiroko Shogaki, Hiroshi Wakimoto, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh, Ken-ichi Takahashi, Masae Itoh. Intramolecular complementation of measles virus fusion protein stability confers cell-cell fusion activity at 37 °C. *FEBS Letters*, 589(1): 152-158, 2015 査読有

doi: 10.1016/j.febslet.2014.11.040

Yohei Watanabe, Hotta Hak (22nd/total 27) *et al.* A novel immunochromatographic system for easy-to-use detection of group 1 avian influenza viruses with acquired human-type receptor binding specificity. *Biosensors and Bioelectronics*, 65: 211-219, 2015 査読有

doi:10.1016/j.bios.2014.10.036

[学会発表](計17件)

岩崎裕貴、秋葉太貴、小倉歩、阿部貴志、和田健之介、伊藤正恵、池村淑道. 人獣共通感染ウイルスゲノム配列の宿主依存性に関わる特徴抽出法の開発とそれを用いたウイルスゲノム配列の変化方向予測. 第1回人獣共通感染症研究拠点シンポジウム、北海道大学獣医学部講堂(札幌) 2012年6月14日

岩崎裕貴、秋葉太貴、小倉歩、阿部貴志、和田健之介、伊藤正恵、池村淑道. RNAウイルスの宿主依存機構を知るための宿主RNAとの類似領域の検出. 第14回日本RNA学会年会、東北大学百周年記念会館 川内萩ホール(仙台) 2012年7月18日~20日

岩崎裕貴、和田健之介、阿部貴志、伊藤正恵、池村淑道. インフルエンザウイルスゲノムに存在する宿主適応に関係した連続塩基の解析. 第60回日本ウイルス学会、大阪国際会議場(大阪) 2012年11月13日~15日

周敏、北川善紀、内山知佳、山口まゆ、伊藤正恵、後藤敏. ヒトメタニューモウイルス中和抗体価迅速測定法の開発. 第60回日本ウイルス学会、大阪国際会議場(大阪) 2012年11月13日~15日

山口まゆ、北川善紀、周敏、小松孝行、竹内健司、伊藤正恵、後藤敏. パラミクソウイルスC蛋白質とIRF7依存性インターフェロン産生シグナル. 第60回日本ウイルス学会、大阪国際会議場(大阪) 2012年11月13日~15日

北川善紀、山口まゆ、小松孝行、周敏、竹内健司、西尾真智子、伊藤正恵、後藤敏. TLR7/9依存性インターフェロン産生抑制におけるV蛋白質とTRAF6の相互作用の重要性. 第60回日本ウイルス学会、大阪国際会議場(大阪) 2012年11月13日~15日

佐藤友人、廣瀬充宏、脇本浩史、高橋健一、北川善紀、後藤敏、伊藤正恵. 麻疹ウイルスF蛋白質のプロテアーゼ感受性決定領域. 第60回日本ウイルス学会、大阪国際会議場(大阪) 2012年11月13日~15日

脇本浩史、閻東怡、佐藤友人、竹内薫、北川善紀、後藤敏、伊藤正恵. 麻疹ウイルス感染様式の温度依存性. 第60回日本ウイルス学会、大阪国際会議場(大阪) 2012年11月13日~15日

白井伸明、岡田俊樹、武居修、和田昭裕、野坂江美、井上有香、清水華子、三輪正直、伊藤正恵、長谷川慎. 検疫用迅速高感度なインフルエンザウイルス検査技術の開発.

第85回日本生化学会大会、福岡国際会議場(福岡) 2012年12月14日~16日

小川敏雄、宇仁茂彦、伊藤正恵. 光触媒酸化チタン合成砂の寄生虫卵、細菌およびウイルス不活化効果. 第40回日本防菌防黴学会年次大会、千里ライフサイエンスセンター(大阪) 2013年9月10日~11日

周敏、北川善紀、山口まゆ、伊藤正恵、後藤敏. ヒトメタニューモウイルスのpH依存性細胞融合とウイルス侵入様式. 第61回日本ウイルス学会、神戸、2013年11月

北川善紀、山口まゆ、周敏、伊藤正恵、後藤敏. 形質細胞様樹状細胞のIFN- γ 産生とヒトメタニューモウイルス. 第61回日本ウイルス学会、神戸国際会議場(神戸) 2013年11月10日~12日

樋口遥、姜大鵬、脇本浩史、佐藤友人、堀田博、伊藤正恵. SSPEウイルスKobe-1株F蛋白質の細胞融合に関わる変異の解析. 第61回日本ウイルス学会、神戸国際会議場(神戸) 2013年11月10日~12日

佐藤友人、正垣博子、廣瀬充宏、脇本浩史、高橋健一、北川善紀、竹内薫、後藤敏、伊藤正恵. 麻疹ウイルスF蛋白質のプロテアーゼ感受性決定要因. 第61回日本ウイルス学会、神戸国際会議場(神戸) 2013年11月10日~12日

北川善紀、山口まゆ、渡邊摩耶、伊藤正恵、後藤敏. センダイウイルスCタンパク質によるJAK-STAT経路阻害機構の再考. 第62回日本ウイルス学会、パシフィコ横浜 会議センター(横浜) 2014年11月10日~12日

佐藤友人、樋口遥、姜大鵬、西川大智、正垣博子、脇本浩史、北川善紀、後藤敏、堀田博、伊藤正恵. SSPEウイルスKobe-1株F蛋白質の細胞融合に関わる変異の解析. 第62回日本ウイルス学会、パシフィコ横浜 会議センター(横浜) 2014年11月10日~12日

脇本浩史、鈴木翔大、森田健介、佐藤友人、正垣博子、北川善紀、後藤敏、伊藤正恵. Nedd4の麻疹ウイルス粒子形成促進作用とそのメカニズム. 第62回日本ウイルス学会、パシフィコ横浜 会議センター(横浜) 2014年11月10日~12日

[産業財産権]

取得状況(計1件)

名称: 蛍光一粒子検出方法および検出システム

発明者: 武居修、山本栄二、茂木一、長谷川慎、伊藤正恵、三輪正直、白井伸明、岡

田俊樹

権利者：株式会社ライフテック、学校法人
関西文理総合学園、滋賀県

種類：特許

番号：特許第 5737704 号

出願年月日：平成 22 年 9 月 27 日

取得年月日：平成 27 年 5 月 1 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 正恵 (ITOH, Masae)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10201328

(2)研究分担者

堀田 博 (HOTTA, Hak)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40116249