

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790433

研究課題名(和文)動物モデルを用いたハンタウイルス感染症の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis of hantavirus infection by using an animal model

## 研究代表者

清水 健太 (SHIMIZU, Kenta)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20466840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ハンタウイルスはヒトに腎症候性出血熱を起こす。患者と類似の腎出血を発現するマウスモデルを開発し、ウイルス側・宿主側双方の病態関連因子の同定を試みた。その結果、ハンタウイルスの外殻を構成する糖蛋白質Gnの417番目のアミノ酸と、宿主の免疫に関わるT細胞が病態発現に関与することが明らかとなった。また、細胞傷害性T細胞などを引きつける複数のケモカインが発症時に顕著に増加することも明らかとなり、これらケモカインによって誘導される過剰な細胞性免疫が病態発現機序の一端を担っている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Hantaviruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. In this study, we tried to identify viral and host factors involved in pathogenesis by using a mouse model showing renal hemorrhage as in the case of patients. As a result, we found that amino acid at position 417 in viral glycoprotein Gn and host T cells are involved in the pathogenesis. In addition, we found that chemokines attracting cytotoxic T cells were significantly elevated at onset of disease, suggesting that excessive cell-mediated immunity induced by the chemokines have a role in the pathogenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ハンタウイルス 出血熱 病態 動物モデル 糖蛋白質 T細胞 ケモカイン 細胞性免疫

## 1. 研究開始当初の背景

病原微生物のなかで、出血熱を起こすウイルスは病原性が高く、流行時やバイオテロに使用された際には、ヒトに対して甚大な被害を及ぼす可能性がある。その病態を解明し、治療法を開発することは、我が国のみならず、地球規模で重要な課題となっている。

ハンタウイルスは出血熱ウイルスのひとつで、ヒトに腎症候性出血熱を起こす。その病態には、「免疫病原性」が関与すると推定されている。しかし、ヒトでの疾患を再現する適切な動物モデルがないため、実際の病態との関係は明らかではない。

研究代表者は、これまでに、動物モデルの開発に取組み、韓国の腎症候性出血熱患者の血液から分離されたウイルスのクローン(以下、強毒株)を成熟 BALB/c マウスに静脈内接種することにより、腎症候性出血熱に特徴的な腎臓の出血性病変を発現させることに世界で初めて成功した。また、患者由来の分離ウイルスのクローンのなかから、成熟マウスに腎臓の出血性病変を起こさないクローン(以下、弱毒株)を発見した。さらに、機能的な T および B 細胞を欠く免疫不全マウスに強毒株を接種した場合、腎出血が認められないことを発見した。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、腎症候性出血熱の動物モデルを用いて、病態発現に関与するウイルスゲノム領域および免疫細胞を同定することを目的とした。さらに、感染・発症時に誘導されるサイトカイン応答を比較解析し、病態発現に関連するサイトカインを同定し、病態との因果関係を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 病態発現に関与するウイルスゲノム領域の同定

強毒株および弱毒株感染細胞より抽出した RNA を鋳型とし、ランダムプライマーを用いて逆転写反応により complementary DNA (cDNA) を合成した。既報のハンタウイルスの配列情報を基に設計した各種プライマーを用い、Polymerase Chain Reaction (PCR) により cDNA を増幅した。定法により、塩基配列を決定し、比較した。

### (2) 病態発現に関与する免疫細胞の同定

免疫系の正常な BALB/c マウス、機能的な T および B 細胞を欠損する重度複合免疫不全 (Severe Combined Immunodeficiency: SCID) マウスおよび機能的な T 細胞を欠損するヌードマウスに、それぞれ  $10^5$  focus-forming units (FFU) の強毒株を静脈内接種し、3 週間、臨床経過の観察と体重測定を行った。

### (3) 病態発現に関連するサイトカインの同定

BALB/c マウスに  $10^5$  FFU の強毒株を静脈内接種し、3、6、9 日後に血清および腎臓を採取した。コントロールとして、ウイルスの希釈に使用した Minimum Essential Medium (Gibco 社) を同様に接種し、3 日後に採取した血清および腎臓を用いた。Mouse Cytokine Array (R&D Systems 社) を用いて、血清および腎臓中の 40 種のサイトカインを検出した。シグナル強度を ImageQuant TL (GE Healthcare) により数値化し、比較した。

### (4) 同定したサイトカインと病態との因果関係の検証

腎臓において、発症時に最も顕著な発現量の増加を示したサイトカイン、CXCL9 (C-X-C motif Chemokine Ligand 9) の機能を阻害する活性を持つ抗 CXCL9 ヤギ抗体 (R&D Systems 社) を BALB/c マウスに腹腔内投与した。コントロールとして、正常ヤギ抗体 (R&D Systems 社) を同様に投与した。1 日後、 $10^5$  FFU の強毒株を静脈内接種し、12 日間、臨床経過の観察と体重測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 病態発現に関与するウイルスゲノム領域の同定

強毒株および弱毒株のゲノム配列を決定し比較した結果、外殻に存在し、宿主細胞への吸着・侵入に関与する糖蛋白質のコード領域に 1 塩基、ゲノムの転写および複製に関与する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼのコード領域に 1 塩基の違いが認められた。推定アミノ酸配列を比較した結果、糖蛋白質 Gn の 417 番目のアミノ酸が強毒株ではグルタミン酸、弱毒株ではリジンであることが明らかとなった。RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの推定アミノ酸配列は同一であった。これらのことから、糖蛋白質 Gn の 417 番目のアミノ酸が病態発現に関与することが明らかとなった。強毒株で認められた Gn の 417 番目のグルタミン酸は、ハンタウイルス属の間で高度に保存されていた。したがって、このアミノ酸が関与するメカニズムはハンタウイルス属に共通するものである可能性がある。今後、そのメカニズムを解明することが重要と考えられる。

### (2) 病態発現に関与する免疫細胞の同定

免疫系の正常な BALB/c マウスに強毒株を静脈内接種すると、一過性の体重減少および腎髄質の出血が起こる。一方、機能的な T および B 細胞を欠損する SCID マウスでは、持続的な体重減少が起こり、腎症候性出血熱に特徴的な腎髄質の出血は起こらず、衰弱して死亡する。これらのことから、T および B 細胞のどちらかあるいは両方が腎臓の出血性病変の形成に関与していると考えられる。そこで、機能的な T 細胞を欠損するヌードマウスを用いて、感染実験を行った。その結果、ヌードマウスに体重減少は起こらず、無症状

で経過した。このことから、T細胞が腎臓の出血性病変の形成に關与することが示唆された(表)。

表. 感染マウスにおける腎出血の有無

| マウス    | T細胞 | B細胞 | 腎出血 |
|--------|-----|-----|-----|
| BALB/c |     |     | あり  |
| SCID   | x   | x   | なし  |
| ヌード    | x   |     | なし  |

### (3) 病態発現に關連するサイトカインの同定

T細胞は、リンパ球の一種で、宿主の免疫系で重要な役割を果たす。免疫系は通常、宿主を防禦するために機能する。しかし、過剰な免疫応答により、宿主を傷害することもある。腎症候性出血熱でも、T細胞の關与する過剰な免疫応答が病態発現を誘導している可能性が考えられた。

そこで、免疫応答時に細胞間の情報伝達物質として機能する主要なサイトカインの発現量の動態を解析した。血清中のサイトカインの発現量を比較した結果、発症し始める時期にあたる接種6日後をピークとして、多くのサイトカインが増加する傾向が認められた。特に、CXCL9、CXCL10、CCL2 (C-C motif Chemokine Ligand 2)、CCL3 については、顕著な増加(非感染マウスの50倍以上)が認められた(図1)。一方、腎臓中では、顕著な増加を示したのはCXCL9のみであった(図2)。CXCL9はケモカインの一種で、細胞性免疫に關与する細胞傷害性T細胞などを引き寄せる活性がある。このことから、腎臓中で産生されたCXCL9が過剰な細胞性免疫を誘導し、腎出血を起こしている可能性が考えられた。

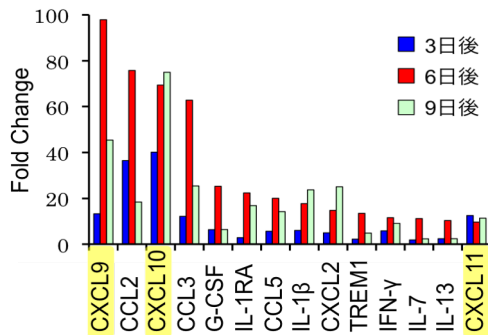


図1. 血清中のサイトカイン量の変化

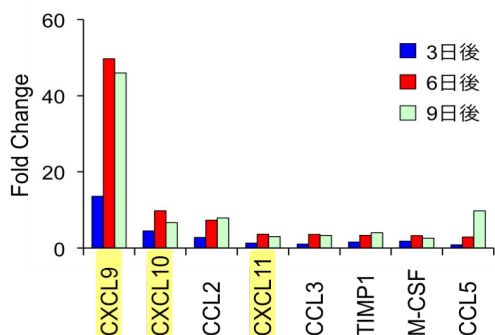


図2. 腎臓中のサイトカイン量の変化

### (4) 同定したサイトカインと病態との因果關係の検証

CXCL9の発現量の増加が病態発現の原因なのか、それとも結果なのか明らかにするため、CXCL9の活性を中和する抗体をBALB/cマウスに腹腔内投与し、1日後に強毒株を静脈内接種した。しかし、中和抗体投与群においても、コントロール抗体投与群と同様に一過性の体重減少および腎髄質の出血が認められ、中和抗体投与による病態発現の抑制効果は認められなかった。

CXCL9は、CXCL10、CXCL11とともに受容体であるCXCR3 (C-X-C motif Chemokine Receptor 3)を持つ細胞に作用する。CXCL10およびCXCL11の血清および腎臓中の発現量は比較的高いものであった。また、CXCL11はCXCR3への親和性が最も高いとされ、比較的小さい量で強い作用を発現すると考えられる。したがって、これらのケモカインが協調的に作用して過剰な細胞性免疫を誘導している可能性はある(図3)。今後、CXCR3を欠損するマウスでこれらケモカインの病態発現への關与の有無を検証する必要があると考えられる。

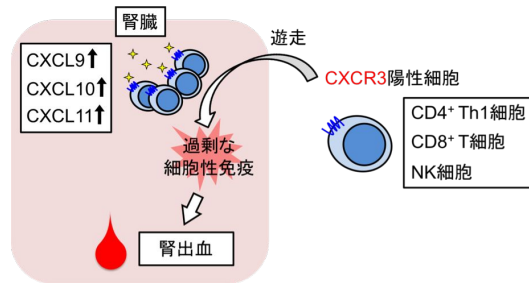


図3. 推定される腎出血のメカニズム

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)  
該当なし

〔学会発表〕(計 4件)

Shimizu K, Yoshimatsu K, Koma T, Arikawa J. Development of a mouse model of hemorrhagic fever with renal syndrome. XVIth International Congress of Virology. 2014年7月27日~2014年8月1日、モントリオール(カナダ)

清水 健太、吉松 組子、駒 貴明、有川 二郎. ハンタウイルス感染マウスモデルの開発. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会. 2014年6月19日~2014年6月20日、北海道大学(北海道・札幌市)

清水 健太、吉松 組子、駒 貴明、有川 二郎. マウスを用いた腎症候性出血熱の疾患モデルの開発. 第61回日本実験動物学会. 2014年5月15日~2014年5月17日、札幌

コンベンションセンター (北海道・札幌市)

清水 健太、吉松 組子、駒 貴明、伊勢川  
裕二、天田貴子、西尾佐奈恵、有川二郎、腎  
症候性出血熱の動物モデルの開発と病態発  
現機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学  
術集会. 2012 年 11 月 13 日～2012 年 11 月 15  
日、グランキューブ大阪 (大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 0 件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
該当なし

取得状況(計 0 件)  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 健太 (SHIMIZU, Kenta)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 20466840

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし