

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790444

研究課題名(和文)麻疹ウイルスによる亜急性硬化性全脳炎の病原性基盤の解明および治療薬の開発

研究課題名(英文) Study of pathogenesis for SSPE caused by measles virus infection and development of the antiviral drug

研究代表者

渡辺 俊平 (Watanabe, Shumpei)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10621401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルスは中枢神経系に持続感染して亜急性硬化性全脳炎(SSPE)を引き起こす。しかし、ウイルスの神経細胞への侵入は非効率的であるため、いかにしてウイルスが神経病原性を獲得するか不明であった。我々は本研究を通して、SSPE患者より分離されたウイルス株のF遺伝子の多くに、ウイルスの膜融合を亢進する、アミノ酸変異が存在することを明らかにした。また同変異は中枢神経系におけるウイルス感染の効率的な広がりにも寄与することを示した。従って麻疹ウイルス膜融合の阻害は、SSPEの病態進行を防ぐ新たな治療標的となり得ることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) is a fatal degenerative disease caused by persistent measles virus (MV) infection in the central nervous system (CNS). It was one of concerns in SSPE pathogenesis how MV could spread in the CNS and cause disease, because MV inefficiently infects or enters neural cells. In this study, we report that several mutations in the MV F gene of multiple SSPE strains, greatly enhanced virus fusion. Moreover, we demonstrated that these fusion-enhancing mutations critically contributed to MV spread in the CNS. Therefore, it is suggested that blocking MV-mediated fusion has a potential to be a good therapeutic approach for SSPE.

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：抗ウイルス薬開発 神経病原性発現機構 亜急性硬化性全脳炎 麻疹ウイルス 膜融合

1. 研究開始当初の背景

麻疹ウイルスは、免疫系細胞に特異的に発現する主要な受容体 SLAM を介して体内へ侵入し、麻疹とよばれる急性ウイルス感染症を引き起こす。一方で、麻疹ウイルスは未知の受容体を介して神経細胞に侵入するが、SLAM を発現しない神経細胞において、麻疹ウイルスはウイルス感染を効率的に広げることができない。従ってウイルスが中枢神経系に感染したとしても一過性に排除されると考えられる。しかしながら、通常の麻疹を経験した小児の中には、頻度は少ないながら亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) が発生することが知られている。中枢神経系に麻疹ウイルスの持続感染が成立すると、数年の潜伏期間を経て SSPE が発症し、進行性に大脳機能が侵され例外なく死亡する。現在のところ SSPE に対して有効な治療薬は存在しない。インターフェロン、リバビリン、イノシプラノベクス等の広い抗ウイルススペクトルを持つ抗ウイルス薬を用いた治療により、生存期間のある程度の延長が期待されているが、発症の進行を阻止することはできない。従って SSPE に対する有効な治療薬の開発が必要である。これまでに、SSPE 患者の剖検脳からは、ウイルス分離の報告が多くなされている。こうした SSPE ウイルス株は、ウイルス粒子形成能を欠損しており、野生型の麻疹ウイルスとは性質が異なるため、遺伝子解析が多くなされている。SSPE 株においては、粒子形成に重要な M 蛋白質に変異が蓄積しており、そのために粒子形成能を欠くと考えられている。しかしながら、麻疹ウイルスが神経細胞に侵入した後に、いかにして感染を広げて神経病原性を獲得するかについてのメカニズムは、これまでによくわかっていない。

2. 研究の目的

これまでに我々は、ウイルスの膜融合を亢進

する、ウイルス Fusion (F) 蛋白質のアミノ酸変異を複数同定している。一方、同種の変異は SSPE 株にも見出すことができる。そこで「ウイルス膜融合能の亢進が、細胞融合を介した cell-to-cell 感染を促進し、ウイルスの神経病原性を規定する」という仮説を考えた。この仮説を動物モデルを利用して検証する。また麻疹ウイルスの膜融合を *in vitro* で阻害する膜融合阻害剤について、動物モデルを用いて効果の検討を行う。同検討により、中枢神経系におけるウイルス感染の広がりを効果的に防御する薬剤を探索する。また既知の融合阻害剤の化学修飾を行い、効果の増強を図る。以上の研究により、新しい SSPE 治療薬の開発を試みる。

3. 研究の方法

幼若ハムスターを用いた麻疹ウイルスの神経感染動物モデルでは、神経症状を 1 週程度の短期間で評価可能である。このモデルを利用して、融合能を亢進した組換え麻疹ウイルスの神経病原性を確認した。また、確立したハムスターモデルを用いて、麻疹ウイルス融合阻害剤の効果を *in vivo* において検討した。また、融合阻害剤に化学修飾を行い阻害効果の増強を試みた。

4. 研究成果

複数の SSPE 株が持つ F のアミノ酸変異 (T461I, S103I/N462S/N465S) および、我々が以前に同定した膜融合能を亢進する F の 1 アミノ酸変異 (S262R, L354M, N462K) を持つ GFP 発現組換えウイルスを、それぞれ 10 日齢の哺乳ハムスターに脳内投与を行った。その結果、L354M 変異を持つ組換えウイルスを投与した場合を除いて、組換えウイルスを投与したハムスターにおいて投与量に関わらず神経症状が認められ、投与 1 週後にハムスターの死亡が確認された。一方で L354M 変異を持つウイルス、または野生型の麻疹ウイルスを投与した個体で

はいかなる症状も確認されず、投与後1月後まで観察を続けてもハムスターは生存した。L354Mの変異は、注目した変異の中では、最も膜融合亢進効果が小さい。従って膜融合能の高い組換えウイルスが高い神経病原性をもつことがわかった。また上記のF変異組換えウイルスは、野生型ウイルスに比べて、ハムスターの脳全体にウイルス感染を効率的に広げることがわかった(図1)。ハムスターの死亡率、および脳内でのGFP発現ウイルスの広がり程度は、組換えウイルスの膜融合能と相関すると考えられた。

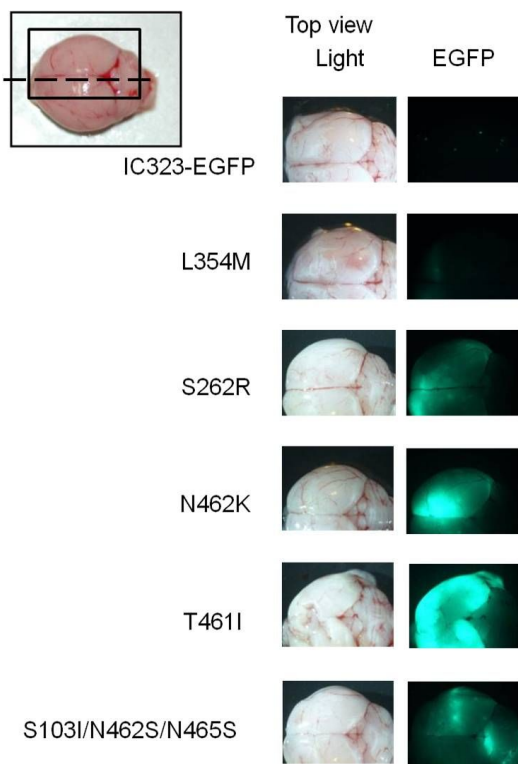


図1 ハムスター脳における、GFP発現F変異組換えウイルスの広がり

組換え麻疹ウイルスに対するハムスター感受性について10日齢以降のハムスターを用いて検討したところ、生後3週齢以降のハムスターでは膜融合亢進ウイルスに対する感受性が失われた。以上の検討から、10の4乗PFU量のSSPE株型F変異ウイルスを10日齢の哺乳ハムスターに脳内投与する、麻疹ウイルスの神経

感染動物モデルを確立した。またハムスター動物モデルを用いて、ウイルスの膜融合能が神経病原性を規定することを示すことができた。以上の成果をJ. VirolおよびNat. Commun., Trends Microbiolに報告した。これまで、SSPE株の持つ特徴的な変異としては、M遺伝子の発現や機能の欠損、およびF遺伝子の細胞質領域の変異(または短縮)が注目されてきた。しかしながら、本研究により、細胞外領域を含むF遺伝子領域全長のアミノ酸変異が麻疹ウイルスの神経病原性発現において重要な役割を持つことが明らかになった。またこれまでに知られてきた、SSPE株に特徴的なMまたはFの細胞質内領域の変異単独では、神経細胞における膜融合亢進効果は小さいことがわかった。従って、本研究により、麻疹ウイルスは神経細胞に侵入した後に、膜融合を亢進するアミノ酸変異を獲得することで、cell-to-cell fusionを介して中枢神経系において効率的に感染を広げるといふ、麻疹ウイルスの神経病原性発現機構の一端が明らかとなった(図2)。

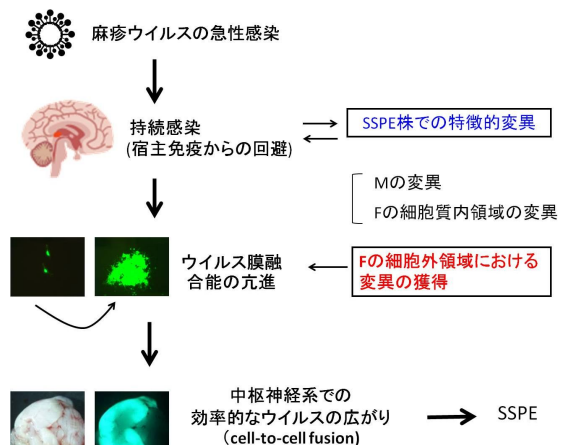


図2 麻疹ウイルス神経病原性発現機構のモデル

次に既存の麻疹ウイルス膜融合阻害剤を用いて、膜融合亢進組換えウイルスに対する融合阻害効果の検討を行った。麻疹ウイルスの膜融合阻害剤としては、F蛋白質のfusion peptide領域N末3アミノ酸に相同なペプチド

(Phe-Phe-Gly)、F蛋白質のHeptad Repeat-B領域の約30アミノ酸からなるペプチド(HR-Bペプチド)が膜融合阻害効果を持つことがよく知られている。そのため、両者のペプチドを用いて膜融合の阻害を試みた。阻害実験は培養細胞を用いて行った。その結果、後者のペプチドにおいて膜融合亢進組換えウイルスに対し、より強い融合阻害が認められた。膜融合阻害効果はVirus-cell fusion(ウイルス侵入)およびcell-cell fusion(巨細胞形成能)の2つの観点から確認することができた。そこでさらにHR-Bペプチドを膜融合亢進ウイルスと混和して、ハムスターに脳内投与を行い、感染防御効果を検討した。しかし投与後1週でハムスターは死亡した。従って、HR-Bペプチドの投与により、膜融合亢進ウイルスの神経感染を効果的に防御することはできなかった。

そこで次に、HR-Bペプチドに化学修飾を行い、ペプチドの安定性を増強することを考えた。化学合成したペプチドとコレステロールを反応させ、ペプチドのC末端にコレステロール基を導入した。カラムクロマトグラフィーによる精製・分取の後で、麻疹ウイルス膜融合阻害能を検討した。その結果、膜融合亢進ウイルスおよび野生型ウイルスそれぞれについて、ウイルス膜融合の阻害が強く増強されることが培養細胞を用いた実験でわかった。コレステロール基の導入部位や導入方法の検討により、さらなる阻害効果の増強が可能であると考えられる。

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 3 件)

Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation: another mechanism of viral evolution. Trends Microbiol. 査読有、2013, 21(7):320-4. doi: 10.1016/j.tim.2013.05.004.

Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in human neuronal cells and brains of suckling hamsters. J Virol. 査読有、2013, 87(5):2648-59. doi: 10.1128/JVI.02632-12.

Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. Nat Commun. 査読有、2012, 3:1235. doi:10.1038/ncomms2252.

〔学会発表〕(計 5 件)

渡辺俊平、白銀勇太、大野真治、柳雄介、膜融合能が亢進した麻疹ウイルスはIFN betaを強く誘導する、第61回日本ウイルス学会、2013年11月10-12日、神戸

Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in the central nervous system. Third measles virus minisymposium, 2013年9月9-10日、Annecy, France

渡辺俊平、白銀勇太、鈴木諭、池亀聡、古賀律子、柳雄介、ハムスター動物モデルを用いた麻疹ウイルス神経病原性発現機構の解明、第155回日本獣医学会2013年3月28-30日、東京

Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Enhanced fusion activity is critical for measles virus spread in the central nervous system. The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study, 2013年1月9-11日、Fukuoka, Japan

渡辺俊平、白銀勇太、鈴木諭、池亀聡、古賀律子、柳雄介、麻疹ウイルスの神経病原性はウイルスの膜融合能によって規定される、第60回日本ウイルス学会、2012年11月13-15日、大阪

〔その他〕
九州大学研究者情報

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003946/research.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 俊平 (WATANABE, Shumpei)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：10621401

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

柳 雄介 (YANAGI, Yusuke)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：40182365