

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660229

研究課題名(和文)フラビウイルス脳炎重症化機序のin vivo分子イメージング解析

研究課題名(英文)In vivo molecular imaging of viral encephalitis

研究代表者

早坂 大輔 (HAYASAKA, Daisuke)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：10346926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルス感染症の生体内における病態画像化を目的として、ウイルス感染マウスモデルを用いたポジトロン断層法(PET)による分子イメージング解析を行った。脳炎ウイルスでは、コントロールマウスにくらべ、脳における18F-FDGの取り込みが減少していた。一方、腸炎を起こすウイルスでは、病変部位と一致して、消化管での18F-FDG集積が確認された。現在のところ、ウイルス感染症による分子イメージング研究は非常に限定的であるため、本研究成果は、ウイルス感染症イメージング研究に先駆けた基礎データを提供するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated in vivo molecular imaging of virus-infected mice. We inoculated encephalitis viruses (Japanese encephalitis virus and Tick-borne encephalitis virus), Severe fever with thrombocytopenia virus (SFTSV) and newly isolated Nairovirus (TFLV) in each susceptible mouse. Following encephalitis virus infections, decrease of 18F-FDG uptakes were observed in the brains of virus-infected mice compared with mock-infected mice. On the other hand, following infections with SFTSV and TFLV, significant uptakes of 18F-FDG were observed in the small intestines of virus-infected mice but not in mock-infected mice. These data will provide useful information for further study of molecular imaging in the field of virology.

研究分野：ウイルス学、獣医学

キーワード：分子イメージング、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、ナイロウイルス、SFTSウイルス、マウス、18F-FDG、ポジトロン断層法(PET)

1. 研究開始当初の背景

日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV) やダニ媒介性脳炎ウイルス (Tick-borne encephalitis virus: TBEV) などの脳炎フラビウイルスは、節足動物の吸血で感染し、ヒトや動物に重篤な脳炎を起こす人獣共通感染症の原因ウイルスである。これらの感染症の克服には自然界での調査や病態発現機序解明を基にした予防・治療法の確立が重要となる。

脳炎フラビウイルス感染による病態発現機序には、古くからマウスモデルがよく用いられてきた。そして、一般的には、ウイルスが脳内へ侵襲することで脳炎が発症した個体が死に至り、生存個体では脳内へのウイルス感染がなかった結果として考えられていた。

そこで、我々は、マウスモデルを用いた研究から、遺伝的背景が均一な近交系マウスに JEV や TBEV を同条件で感染させても、ほぼすべての個体で脳炎はみられるが、重症経過で死に至る個体と軽症経過で生き残る個体にわかれること、すなわち、神経感染や免疫応答に個体間のばらつきが生じ、結果として病態が分かれることを示してきた。

一般的に、ウイルス感染マウスを用いた中枢神経組織病変などの病態解析では、個体を安楽死させ病理解析や遺伝子発現解析などを行う。しかしながら、脳炎フラビウイルス感染では個体毎に病態にばらつきが生じるため、安楽死した時点ではその後の転機が不明であり、特に早い時期での区別は不可能である。

そこで、フラビウイルス脳炎の重症化機序の解析には感染個体の病態を生体内 (in vivo) で経日的に把握し、個体毎に最終的な病態と関連づける必要が考えられた。

単一光子放射断層撮影法 (SPECT) やポジトロン断層法 (PET) による分子イメージングは、生体内の分子プロセスを画像化する技術であり、非侵襲的に生体内の生理的機能を把握することができる。

そこで、脳炎フラビウイルス感染において、分子イメージングは、生体内の病態のようすを非侵襲的に把握するための有用な技術と考えられた。

これまでに、ウイルス感染における分子イメージング研究は非常に限定的であり、脳炎フラビウイルスを含む多くのウイルスについての報告はほとんどなかった。

したがって、脳炎フラビウイルスおよびその他のウイルスを感染させたマウスモデルによる分子イメージング解析は病態を把握する上で有用であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、JEV、TBEV 感染後の中枢神経病態の in vivo イメージングとして、分子イメージングに着目し、フラビウイル

ス脳炎による中枢神経病態のイメージングの確立を目指した。JEV、TBEV 感染マウスモデルを用い、 ^{18}F -FDG および ^{68}Ga -citrate による PET/CT 撮像を行い、脳内における各トレーサーの集積と病態との関連性を調べることを目的とした。

(2) 脳炎ウイルス以外のウイルスについても、分子イメージングモデルの解析法の確立を目指した。本研究では、マダニ媒介性のブニヤウイルスを感染させたマウスモデルを用い、 ^{18}F -FDG による PET/CT 撮像を行い、病変部位と ^{18}F -FDG 集積部位との関連性を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TBEV Oshima 株 10^4 pfu を C57BL/6 マウス (5 ~ 6 週齢) に皮下感染させ、感染 9、13 日目に ^{18}F -FDG を静脈内投与し、PET/CT による撮像を行った。13 日目の時点では体重減少率により軽症個体 (感染 0 日目に対する体重比 > 0.75) と重症個体 (感染 0 日目に対する体重比 < 0.75) で区別して行った。

(2) JEV S982 株 10^4 pfu を C57BL/6 マウス (5 ~ 6 週齢) に皮下感染させ、感染 9、13 日目に ^{18}F -FDG を静脈内投与し、PET/CT による撮像を行った。13 日目の時点では体重減少率により軽症個体 (感染 0 日目に対する体重比 > 0.9) と重症個体 (感染 0 日目に対する体重比 < 0.7) で区別して行った。また、感染 13 日目においては、 ^{68}Ga -citrate を投与したマウスについても、PET/CT 撮像を行った。

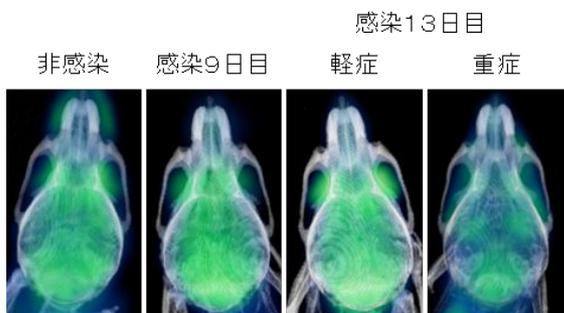
(3) 重症熱性血小板減少症候群ウイルス (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: SFTSV) を Type-I interferon receptor KO マウス (A129) に皮下感染 (10^6 ffu) させ 3 日後に ^{18}F -FDG を静脈内投与し、PET/CT による撮像を行った。

(4) マダニから新規に分離されたブニヤウイルス科に分類されるナイロウイルス (TFLV) を A129 マウスに皮下感染 (10^3 ffu) させ、3 日後に ^{18}F -FDG を静脈内投与し、PET/CT による撮像を行った。

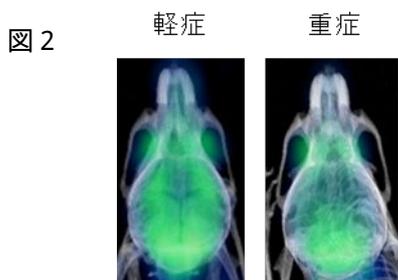
4. 研究成果

(1) TBEV 感染マウスにおいては、コントロールマウスにくらべ、感染 9 日目で ^{18}F -FDG 集積に顕著な違いはみられなかった。一方、感染 13 日目においては、重症個体の脳内の ^{18}F -FDG 集積がコントロールマウスや軽症個体より低い傾向でみられた (図 1)。また、重症個体では小脳領域の ^{18}F -FDG 集積が大脳皮質領域などの他の領域にくらべて高い傾向が見られた (図 1)。

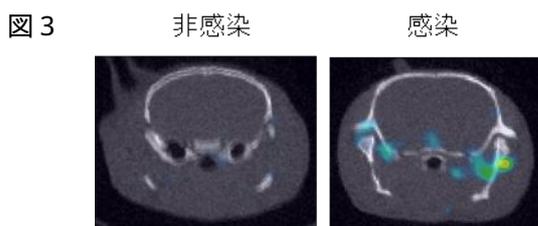
図 1



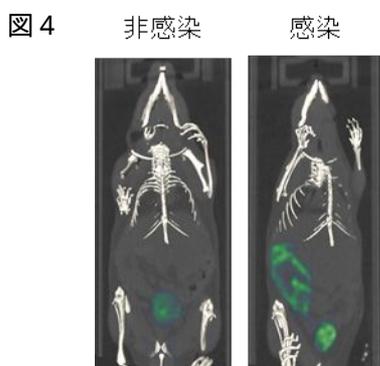
(2)JEV 感染マウスにおいては、TBEV 感染マウスと同様に、感染 13 日目において、重症個体では小脳領域の ^{18}F -FDG 集積が脳皮質領域などの他の領域にくらべて高い傾向が見られた (図 2)。



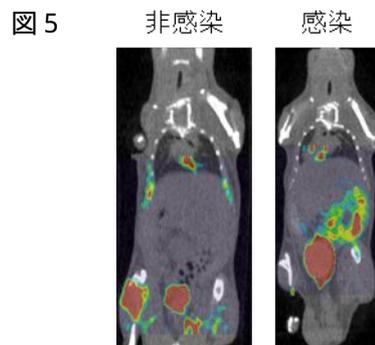
一方、 ^{68}Ga -citrate を投与したマウスでは、非感染および感染マウスの両方において、脳内への ^{68}Ga -citrate 集積は確認されなかった (図 3)。



(3)SFTS 感染マウスでは、消化管における顕著なウイルス感染と細胞壊死像、および消化不良がみられた。感染マウスでは ^{18}F -FDG 集積が消化管、特に小腸において顕著にみられた (図 4)。非感染個体では膀胱への集積がみられたが、消化管への集積は確認されなかった (図 4)。



(4)TFLV 感染においては、SFTS 感染と同様の傾向が観察され、感染マウスでは、消化管、特に小腸において ^{18}F -FDG 集積が顕著にみられた (図 5)。



本研究により、脳炎および腸炎を起こすウイルスの感染マウスモデルを用いた PET 分子イメージング像が示された。これらの結果はこれまでに報告がない新規のものである。特に、SFTSV や TFLV はこれらのマウスモデルで腸炎を起こしていたが、病変部位と一致して ^{18}F -FDG 集積を PET イメージングで確認できた点は、全く新しい知見であり、今後のウイルス性腸炎の研究発展に大きく寄与できることが期待される。

現在のところ、ウイルス感染症による分子イメージング研究は非常に限定的であり、診断などの臨床応用もほとんどなされていない。今後、ウイルス感染症イメージングは重要な研究課題となることが見込まれることから、本研究成果は、この分野の研究に先駆けた基礎データを提供するものと思われる。

5. 主な発表論文等 (雑誌論文)(計 6 件)

Takamatsu Y, Morita K, Hayasaka D. A unique amino acid substitution in NS2A protein of Japanese encephalitis virus affects virus propagation in vitro but not in vivo. *J Virol*. 2015. 89(11):6126-6130. doi: 10.1128/JVI.00370-15. 査読有。

Shimada S, Posadas-Herrera G, Aoki K, Morita K, Hayasaka D. Therapeutic effect of post-exposure treatment with antiserum on severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in a mouse model of SFTS virus infection. *Virology*. 2015.482:19-27. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.010. 査読有。

Tun MM, Aoki K, Senba M, Buerano CC, Shirai K, Suzuki R, Morita K, Hayasaka D.

Protective role of TNF- α , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Sci Rep*. 2014. 4:5344:1-9. doi: 10.1038/srep05344. 査読有。

Aoki K, Shimada S, Simantini DS, Tun MM, Buerano CC, Morita K, Hayasaka D. Type-I interferon response affects an inoculation dose-independent mortality in mice following Japanese encephalitis virus infection. *Virology*. 2014. 11(1):105: 1-7. doi: 10.1186/1743-422X-11-105. 査読有。

Luat le X, Tun MM, Buerano CC, Aoki K, Morita K, Hayasaka D. Pathologic potential of variant clones of the oshima strain of far-eastern subtype tick-borne encephalitis virus. *Trop Med Health*. 2014. 42(1):15-23. doi: 10.2149/tmh.2013-27. 査読有。

Hayasaka D, Shirai K, Aoki K, Nagata N, Simantini DS, Kitaura K, Takamatsu Y, Gould E, Suzuki R, Morita K. TNF- α acts as an immunoregulator in the mouse brain by reducing the incidence of severe disease following Japanese encephalitis virus infection. *PLoS One*. 2013 Aug 5;8(8):e71643. doi: 10.1371/journal.pone.0071643. 査読有。

[学会発表](計5件)

Mya Myat Ngwe Tun, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Corazon C. Buerano, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita and Daisuke Hayasaka : TNF- α and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice infected with Tick-borne encephalitis virus : The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity : 2014年9月25日、奈良県、奈良市、奈良新公会堂

早坂大輔、嶋田聡、Guillermo Posadas Herrera、森田公一 : 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルス感染マウスモデル

を用いた抗血清および薬剤効果の検討 : 第51回ウイルス学会九州支部総会 : 2014年9月5日、鹿児島県、鹿児島市、城山観光ホテル

Mya Myat Ngwe Tun、青木康太郎、千馬正敬、森田公一、早坂大輔 : ダニ媒介性脳炎ウイルス感染における TNF- α 、IL-10 および IL-2 応答の役割 : 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会 : 2014年5月16日、山口県、山口市、ホテルニュー田中

早坂大輔、淵上剛志、森田公一 : フラビウイルス脳炎の分子イメージング : 第156回日本獣医学会学術集会 : 2013年9月22日、岐阜県、岐阜市、岐阜大学

早坂大輔、淵上剛志、森田公一 : フラビウイルスの分子イメージング : 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会 : 2013年5月24日、神奈川県、熱海市、ニューウェルシティ湯河原

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 大輔 (HAYASAKA, Daisuke)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号 : 10346926

(2) 連携研究者

淵上 剛志 (FUCHIGAMI, Takeshi)
長崎大学・医歯薬総合研究科(薬学系)・
准教授
研究者番号 : 30432206