

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670223

研究課題名(和文) 脳内侵潤T細胞の免疫学的解析に基づくフラビウイルス脳炎の病態形成機序の解明

研究課題名(英文) The pathogenesis of flaviviral encephalitis bases on the immunological

研究代表者

倉根 一郎 (KURANE, ICHIRO)

国立感染症研究所・その他部局等・所長

研究者番号：90278656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳内侵潤T細胞における抗原特異性とクローナリティに関して明らかにした。25%以上体重が減少し死亡したマウスと、体重の減少が10%以下で生存したのものから5頭ずつ選び解析を行った。脳内ウイルス量は両群に差がなかった。VA8-1、VA10-1あるいはVB2-1を発現しているT細胞は死亡群、生存群いずれにおいても増加していた。T細胞レセプターのCDR3部位のアミノ酸配列を比較すると、両軍間には相違がみられた。Th1型サイトカインとTh2型サイトカインの比は、生存群に比べ死亡群において高い値を示した。脳内に浸潤するT細胞の質的な相違も生死の決定に関わっていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We identified brain-infiltrating T cells associated with a fatal outcome of Japanese encephalitis (JEV) infection in mice. Five each of dying mice and surviving mice were used. Virus titers were at the similar levels between two groups. Cytokine patterns in the brain revealed a higher ratio of Th1-related cytokine genes in dying mice. The expression levels of CD3, CD8, CD25, and CD69 increased in JEV-infected mice relative to mock-infected mice. However, expression levels of these cell-surface markers did not differ between the two groups. T cells expressing VA8-1, VA10-1, and VB2-1 increased in both groups. However, the dominant T-cell clones as defined by CDR3 amino acid sequence differed between the two groups. The results indicate that the outcome of JEV infection, death or survival, was determined by qualitative differences in infiltrating T-cell clones with unique CDR3 amino acid sequences.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 基礎医学 微生物 脳神経 免疫学

1. 研究開始当初の背景

フラビウイルスによる脳炎は全世界において最も重要な感染症の一つである。特に、日本脳炎はわが国を含むアジアにおいて最も重要なウイルス脳炎といえる。また、これまでは感染個体の生死は脳内におけるウイルス増殖の程度によって決定されると考えられてきた。一方我々は、これまでフラビウイルス脳炎マウスモデルにおいて脳内浸潤 T 細胞が厳格な特異性を有している事を報告してきたが、これら脳内浸潤 T 細胞これら脳内浸潤 T 細胞が生体防御に作用するか、あるいは脳炎発症に向かわせるのかに関しては明確な答えは得られていない。

2. 研究の目的

日本脳炎ウイルス感染マウスをモデルとし、脳内浸潤 T 細胞における抗原特異性とクローナリティに関して、特に T 細胞レセプター(TCR)解析に基づき明らかにする。本研究ではフラビウイルス感染からの回復あるいは免疫病理学的病態形成機序における脳内浸潤 T 細胞の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

日本脳炎ウイルス Ja0ArS982 株を腹腔内接種しその後の体重変化を追跡した。感染後体重が減少するマウスと体重が減少しないマウスが存在したが、感染後 13 日までに 25% 以上体重が減少したマウスは、21 日目までにすべて死亡した(死亡群)。一方、13 日目までに体重の減少が 10% 以下であったものはすべて生存した(生存群)。これらの死亡群、生存群から 5 頭ずつ選び、脳内のウイルス学的、免疫学的解析を行った。

脳内浸潤 T 細胞の T 細胞レセプターの解析は以下のように行った。得られた PCR 産物を全 TCR 鎖可変部(TCR α V)及び TCR 鎖可変部(TCR β V)ファミリーにそれぞれ相補的なオリゴ DNA を固相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した。得られた吸光度から各 TCRV 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 TCRV ファミリーの偏在性を検討した。

4. 研究成果

まず、脳内ウイルス量においては選択した死亡マウス群、生存マウス群の両群に差がなかった(図 1)。

VA8-1、VA10-1 あるいは VB2-1 を発現している T 細胞は死亡群、生存群いずれにおいても増加していた(図 2)。しかし、これらの T 細胞レセプターの CDR3 部位のアミノ酸配列を比較すると、両軍間には相違がみられた(図 3)。

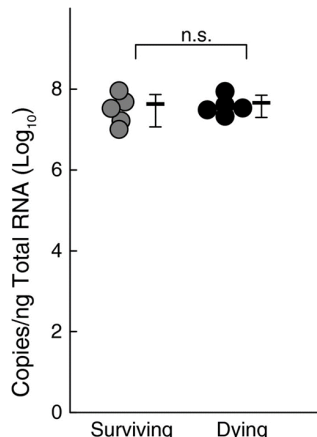


図 1: 死亡マウス群、生存マウス群のウイルス量

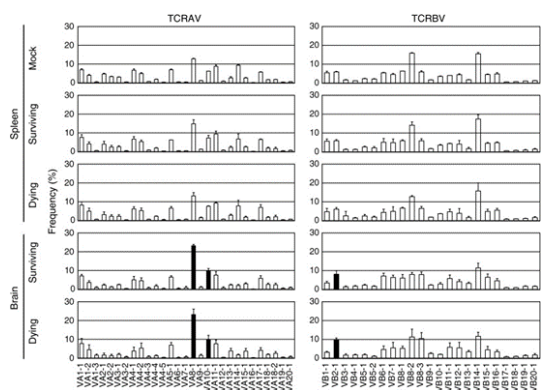


図 2: 脳内浸潤 T 細胞における各 T 細胞レセプター発現細胞の率

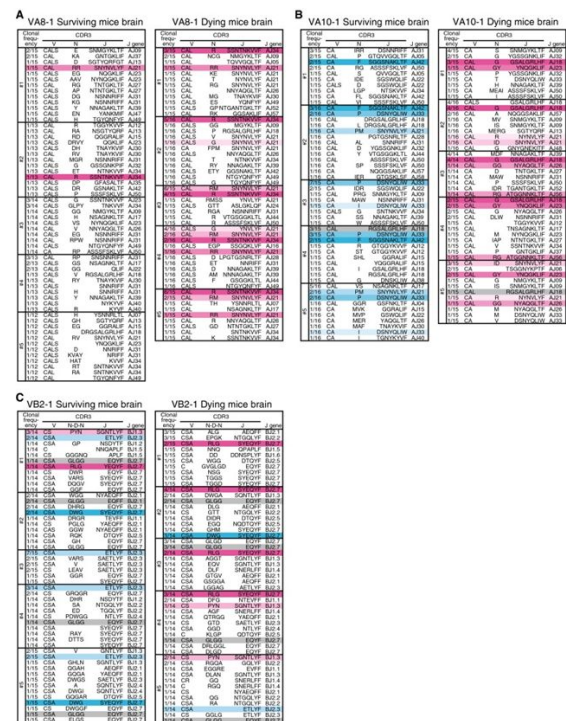


図 3: 各 T 細胞レセプターのアミノ酸配列

また、T細胞レセプターのJ領域の解析においても生存群と死亡群では差が見られた(図4)。

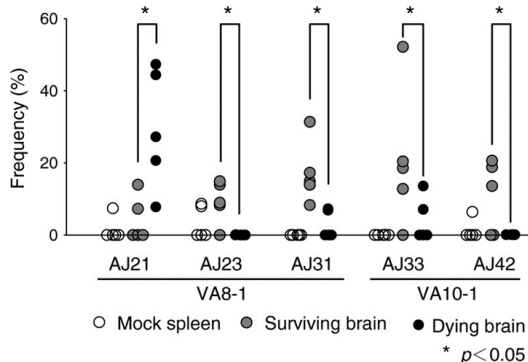


図4：T細胞レセプターのJ領域の使用状況

死亡マウス群、生存マウス群の両群において、脳内におけるCD3、CD4、CD8、CD25及びCD69の発現量においても差はなかった(図5)。IFN gamma、TNF alpha (Th1型サイトカイン)とIL4、IL5 (Th2型サイトカイン)の比は、生存群に比べ死亡群において高い値を示した(図6)。

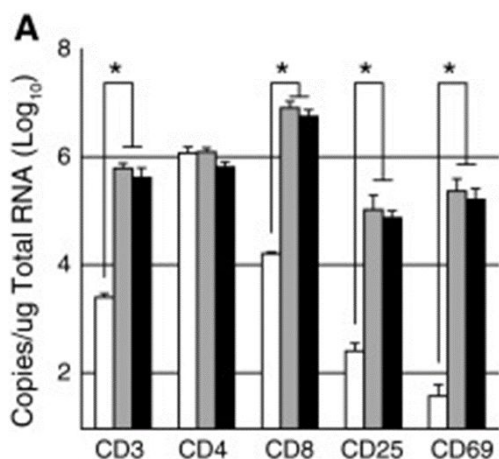


図5：脳内における各種T細胞マーカーの発現

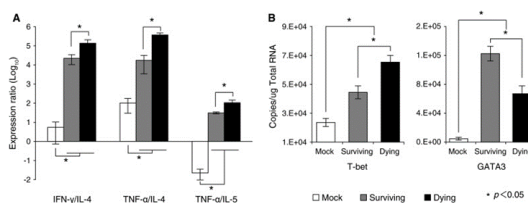


図6：生存群と死亡群のサイトカイン産生能の比較

これらの結果から、脳内浸潤T細胞の質的な違いが、日本脳炎ウイルス感染後の生死を決定していることが示唆された。これまで日本脳炎ウイルス感染後の生死は脳内ウイルス量により決定されるとする論文が多い、しかし、我々の研究結果は脳内に浸潤するT細胞の質的な相違も生死の決定に関わっていることを示唆している。本研究は、フラビウイルス脳炎の新たな予防・治療戦略の科学的基盤の確立に資する。

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1件)

Kenji Shirai, Daisuke Hayasaka, Kazutaka Kitaura, Tomohiko Takasaki, Kouichi Morita, Ryuji Suzuki and Ichiro Kurane.

Qualitative differences in brain-infiltrating T cells are associated with a fatal outcome in mice infected with Japanese encephalitis virus. Archives of Virology. 160:765-775, 2014 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔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 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

高崎智彦 (TAKASAKI, Tomohiko)

国立感染症研究所ウイルス第一部 室長

研究者番号：20221351