

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860298

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治療法の開発

研究課題名(英文)Development of therapeutic measures against hantavirus infection using animal model

研究代表者

清水 健太(Shimizu, Kenta)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：20466840

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)：ハンタウイルス感染症の病態発現には宿主の免疫系が関与するとされるが不明な点が多い。本研究では、ハンタウイルス感染症のマウスモデルを用いて、抗体投与により体内で特定の免疫細胞を減少させる手法により、病態発現に関与する免疫細胞の同定を試みた。その結果、細胞性免疫に重要なCD8陽性T細胞が病態発現に関与することが明らかとなった。CD8陽性T細胞はハンタウイルス感染症の治療標的の候補として重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although host immunity is thought to be involved in the pathogenesis of hantavirus infection, the mechanism remains to be elucidated. In this study, I tried to identify immune cells relating to the disease development of hantavirus infection using a mouse model and a technique to deplete specific immune cells by antibody administration. As a result, I found that CD8+ T cells that have an important role in cell-mediated immunity were involved in the disease development of hantavirus infection. I anticipate that CD8+ T cells will be a possible target for the therapeutic measures for hantavirus infection.

研究分野：微生物学

キーワード：CD8陽性T細胞

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 (Hemorrhagic fever with renal syndrome: HFRS) およびハンタウイルス肺症候群を起こす。その病態には、「免疫病原性」と「血管透過性の亢進」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、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り組み、次のような成果を得ている。

(1) HFRS に特徴的な腎臓の出血性病変を成熟マウスで再現

韓国の HFRS 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、HFRS に特徴的な腎臓の出血性病変を再現することに、世界で初めて成功した (図 1)。

(2) 近縁な弱毒型ウイルスクローンの発見

同じ分離ウイルスの中から、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。また、強毒および弱毒株間でウイルス糖蛋白質 Gn の 1 アミノ酸が異なることを明らかにした。

(3) 出血性病変形成における T 細胞の関与

T 細胞を欠く免疫不全マウスに強毒株を接種した場合、出血性病変が起こらないことを明らかにした。



図 1. 動物モデルにおける腎臓髄質の出血性病変

2. 研究の目的

そこで、本研究では、この動物モデルを用いて、病態発現に関与する T 細胞の種類を同定することを目的とした。また、血管透過性亢進を阻害する薬剤の治療効果の有無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 T 細胞の種類と同定

T 細胞は、宿主の免疫系において重要な役割をしているリンパ球の一種で、複数の種類

が存在する。なかでも CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞は、それぞれ「ヘルパー T 細胞」および「キラー T 細胞」とも呼ばれ、「司令官」や「殺し屋」として機能している。本研究では、これら CD4 および CD8 陽性 T 細胞が病態発現に関与するかどうか調査した。CD4 および CD8 陽性 T 細胞は、名前の通り、CD4 および CD8 という蛋白質を細胞表面に発現している。それらに対するラットの抗体をマウスに投与し、補体系などの作用により、体内の各 T 細胞を減少させた。その後、強毒株を静脈内接種し、12 日間、臨床症状の観察と体重測定を行った。その後、血清および腎臓を採取し、抗体の測定、腎出血の有無の検査および腎臓中のウイルス RNA 量の測定を実施した。

(2) 血管透過性亢進を阻害する薬剤の治療効果の検討

血管透過性の亢進は多様なメカニズムで誘導される。また、他の疾患においても病態形成に重要な役割を果たしており、すでにいくつかの治療薬が認可・使用されている。本研究では、まず、血管透過性との関連が深い血管新生関連因子の血清中の発現量を抗体アレイ解析により調べ、病態発現に関連する因子を同定した。次に、その因子の血管透過性亢進作用機序に基づき、その作用を阻害する薬剤を選択し、その薬剤のハンタウイルス感染症に対する治療効果の有無をマウスモデルで検証した。

4. 研究成果

(1) 病態発現に関与する T 細胞の種類と同定

まず、CD4 および CD8 陽性 T 細胞を体内で減少させるのに必要な抗体の量を検討した。25、50、100 および 200 μ g の抗 CD4 および CD8 抗体を腹腔内投与し、9 日後に脾臓中の CD4 および CD8 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメーターにより解析した。その結果、50 μ g 以上の抗体を投与した場合に各 T 細胞が大きく減少することが明らかとなった (図 2)。

そこで、100 μ g の抗体を投与し、2 日後に強毒株を接種し、病態を比較した。その結果、CD4 陽性 T 細胞を減少させた場合には、対照群と同様に、一過性の体重減少、被毛粗剛および腎髄質の出血が認められた。一方、CD8 陽性 T 細胞を減少させた場合には、症状は認められなかった (図 3)。このことから、CD8 陽性 T 細胞が病態発現に関与することが明らかとなった。CD4 陽性 T 細胞を減少させたマウスは抗体産生が減少していたが発症した。一方、CD8 陽性 T 細胞を減少させたマウスでは抗体産生は阻害されていなかったが、発症しなかった (表)。このことから、抗体の有無は病態発現に重要ではないことが示唆された。また、腎臓中のウイルス RNA 量は、どちらのマウスでも対照群よりも増加していたことから (表)、CD4 および CD8 陽性 T 細胞のどちらもウイルスの排除に関与している

ことが明らかとなった。今回、CD8 陽性 T 細胞を減少させると発症しなくなったことから、CD8 陽性 T 細胞は治療の標的として有望と考えられる。ただ、ウイルスの排除が阻害される可能性があるため、注意する必要があると考えられる。

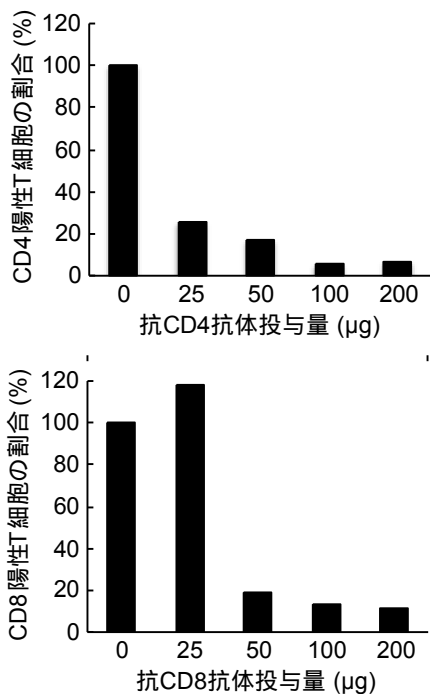


図2. 抗体投与後の CD4 および CD8 陽性 T 細胞の割合

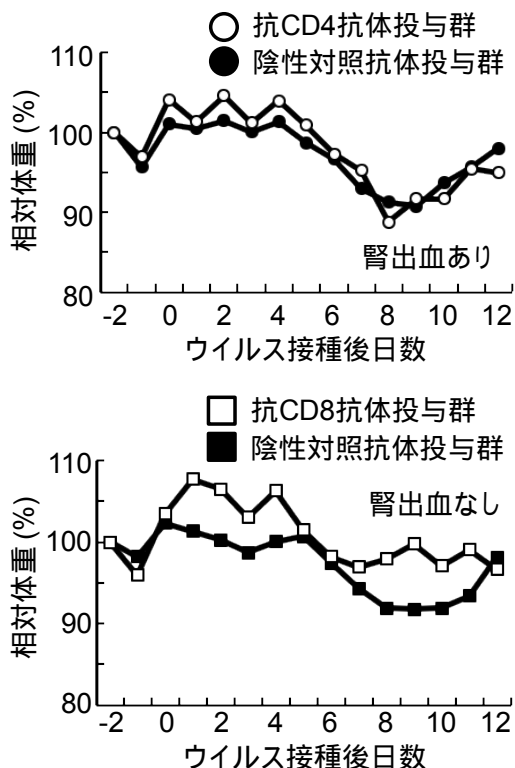


図3. 抗CD4抗体あるいは抗CD8抗体投与後、ウイルスを接種したマウスにおける体重変化

表. 各抗体投与群における感染後の抗体およびウイルス RNA 量

投与抗体	症状	抗体価	ウイルスRNA量 (copy/µg RNA)
抗CD4抗体	+	:80 :320	4.6×10^5
陰性対照抗体	+	:1280 :2560	8.0×10^4
抗CD8抗体	-	:1280 :2560	4.7×10^5
陰性対照抗体	+	:1280 :2560	2.5×10^4

(2) 血管透過性亢進を阻害する薬剤の治療効果の検討

まず、血管透過性との関連が深い血管新生関連因子の発現動態を調べた。その結果、Pentraxin-3の増加およびAngiopoietin-1の減少が認められた。これらは患者の臨床検体の解析でも認められることから、本モデルにおいてもヒトと同様の反応が起きていることが示唆された。Angiopoietin-1は、血管透過性亢進作用を持つ血管内皮細胞増殖因子の作用を抑制する機能を有する。このことから、Angiopoietin-1の減少により血管内皮細胞増殖因子の作用が増強され、血管透過性が亢進し、病態発現に至っている可能性が考えられた。

血管内皮増殖因子は腫瘍の増殖や転移にも関与することから、その作用を抑制する薬剤が抗がん剤として認可され、広く使用されている。そこで、最も使用されている抗がん剤のひとつであるPazopanibのハンタウイルス感染症に対する治療効果の有無をマウスモデルで検討した。しかし、Pazopanib投与群においても発症が認められ、治療効果は認められなかった。今後、他の血管透過性亢進因子についても治療の標的となりうるか検討する必要があると考えられる。

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, Arikawa J. Development of a mouse model of hemorrhagic fever with renal syndrome and evaluation of the role of CD4+ and CD8+ T cells in the pathogenesis. X International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses. 2016年5月31日~2016年6月3日、フォートコリンズ (アメリカ)

Shimizu K, Yoshimatsu K, Arikawa J. Involvement of CD8+ T cells in the development of renal hemorrhage in a mouse model of hemorrhagic fever with renal syndrome. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月22日~24日、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

清水 健太、吉松 組子、有川 二郎. 腎症候性出血熱マウスモデルにおける腎出血の発現に CD8 陽性 T 細胞が関与する. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 2015 年 9 月 7 日～9 日、北里大学獣医学部 (青森県・十和田市)

清水 健太、吉松 組子、有川 二郎. 腎症候性出血熱マウスモデルにおけるサイトカインおよび血管新生関連因子の発現動態の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10 日～12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔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

(4) 研究協力者
該当なし