

令和元年6月14日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06728

研究課題名(和文) 狂犬病ウイルスP蛋白質アイソフォームの細胞種依存的なIFN産生抑制活性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cell type-dependent inhibitory activity against IFN induction of rabies virus P protein isoforms

研究代表者

岡田 和真 (Okada, Kazuma)

岐阜大学・応用生物科学部・研究員

研究者番号：50806354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究により、狂犬病ウイルスは細胞種ごとに異なる免疫回避機序を有している可能性が示唆されていた。その回避機序には狂犬病ウイルスのP蛋白質アイソフォーム(P1およびtPs)が関与している可能性があるため、本研究では各細胞種におけるアイソフォームの必要性の違いを検討した。その結果、神経細胞では自然免疫を司るインターフェロンの産生抑制にP1のみが必要なのに対し、筋肉細胞ではP1に加え、tPsも重要な役割を担うことが明らかとなった。以上の結果は、各細胞種での自然免疫に対し、狂犬病ウイルスがP蛋白質アイソフォームの発現によって柔軟に対応している可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

狂犬病ウイルスは筋肉細胞における増殖により神経系に侵入した後、中枢神経系内の神経細胞において増殖し、その病態を形成する。病態形成において狂犬病ウイルスが異なる細胞種に感染し増殖する機序の一端を、本研究の成果により明らかにすることができた。この成果は、今後、狂犬病ウイルスが神経系に侵入するのを阻害する発症阻害薬、またより効果的かつ安全なワクチン開発の研究において必要となり得る情報の蓄積に貢献した。

研究成果の概要(英文)：It has been showed that rabies virus (RABV) P protein isoforms (P1 and tPs) are known as viral antagonists of interferon (IFN), which play the key role to mediate the host innate immune responses. In our previous study, RABV requires P1 and P2-5 for viral replication in muscle tissues, while it requires only P1 for the replication in neural tissues (Okada et al, J. Virol., 2016), leading to the hypothesis that different isoforms contribute to the inhibition of IFN induction in neural and muscle cells. This study investigated this hypothesis and indicated that P1 is sufficient to inhibit IFN induction in neural cells infected with RABV, whereas P2-5 are also required to suppress the induction in infected muscle cells.

研究分野：獣医学

キーワード：狂犬病ウイルス 自然免疫 神経細胞 筋肉細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から、感染細胞において、狂犬病ウイルスの P 遺伝子が自然免疫抑制に重要な役割を有していることが示されていた [2,3,5,9,10]。さらにその P 遺伝子から発現する複数の P 蛋白質アイソフォーム (P1 および tPs) の各々が、宿主の自然免疫を司るインターフェロン (IFN) のアンタゴニストとしての機能を有することが強く示唆されていた [1,4,6-8]。そのような背景の中、以前の我々の研究において、筋肉細胞における狂犬病ウイルスの増殖には P1 および tPs が必要であるのに対し、神経細胞における増殖では tPs の必要性が低い現象が確認された [8]。この結果より、筋肉細胞における IFN 産生抑制には P1 および tPs が必要であるものの、神経細胞では P1 のみが必要であるという仮説が得られた。

#### 2. 研究の目的

上述の背景の通り、狂犬病ウイルスは感染する細胞種ごとに、P 蛋白質アイソフォームによる異なる IFN 産生抑制機構を有している可能性が示された。このような細胞種ごとに異なる IFN 産生抑制機構を解明することは、細胞種に特化した効率的なウイルス増殖抑制法の開発に重要な知見となり得る。しかしながらこれまでに、細胞種に着目して狂犬病ウイルスの IFN 産生抑制能を検討した研究はなく情報は得られていないままである。そこで本研究では、狂犬病ウイルスの P 蛋白質アイソフォームによる細胞種依存的な IFN 産生抑制機構を明らかとすることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

以前の研究において、強毒の実験室株の CE(NiP) の遺伝子改変により、tPs の発現能を欠失した CE(NiP) $\Delta$ P2-5 を作出した。本研究においても、これらのウイルスを用いた比較解析により、各細胞種での IFN 産生抑制に tPs が必要か否かを検証した。

神経細胞には、マウス神経芽細胞腫由来の SK-N-SH、ならびにヒト神経芽細胞腫由来の SYM-1 を使用した。また筋肉細胞には、マウス筋芽細胞由来 G-8、ならびにヒト横紋筋肉腫由来 A-673 を使用した。

上述のウイルス株および培養細胞を用いて、以下の各実験を行った。

(1) CE(NiP) または CE(NiP) $\Delta$ P2-5 をマウスに脳内接種した後、脳を回収し、同組織中における IFN- $\gamma$  mRNA 遺伝子の発現量を比較した。また同様に両株をマウスに筋肉内接種した後、接種部位の筋肉を回収し、同組織中の IFN- $\gamma$  mRNA 遺伝子の発現量を比較した。

(2) CE(NiP) または CE(NiP) $\Delta$ P2-5 を各種培養細胞に接種し、各感染細胞における IFN- $\gamma$  mRNA 遺伝子の発現量を比較した。

(3) IFN- $\gamma$  遺伝子のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を有するレポータープラスミドを各種培養細胞に導入した後、CE(NiP) または CE(NiP) $\Delta$ P2-5 を感染させ、各感染細胞におけるルシフェラーゼ活性を比較した。

(4) CE(NiP) および CE(NiP) $\Delta$ P2-5 の P 遺伝子をそれぞれコードする pC-NiP および pC-P $\Delta$ P2-5 プラスミドを作製した。pC-NiP からは P1 および tPs が発現するのに対し、pC-P $\Delta$ P2-5 からは P1 のみが発現することが考えられる。これらの各プラスミドに加え、(3) において用いたレポータープラスミドを同時に培養筋肉細胞に導入したのち、Newcastle Disease Virus の弱毒ワクチン株を感染させ、感染刺激を与えた。その後、同感染細胞におけるルシフェラーゼ活性を比較した。

#### 4. 研究成果

(1) CE(NiP) $\Delta$ P2-5 を接種したマウス脳内での IFN- $\gamma$  mRNA の発現量は、CE(NiP) 感染マウスの

脳内の発現量に対し 1.23 倍高い値を示した。一方、CE(NiP) $\Delta$ P2-5 を接種したマウス筋肉内の IFN- mRNA の発現量は、CE(NiP)感染マウスの筋肉内よりも 2.4 倍高い値を示した。以上のように、脳内よりも筋肉内において、tPs を発現しない CE(NiP) $\Delta$ P2-5 がより IFN- mRNA の発現を誘導する傾向にあることが明らかとなった。

( 2 ) CE(NiP)および CE(NiP) P2-5 を感染させた培養神経細胞では、同等の IFN- mRNA の発現量が検出された。一方、CE(NiP) P2-5 を感染させた筋肉細胞では、CE(NiP)感染細胞よりも有意に高い IFN- mRNA の発現が認められた ( 図 1 )。

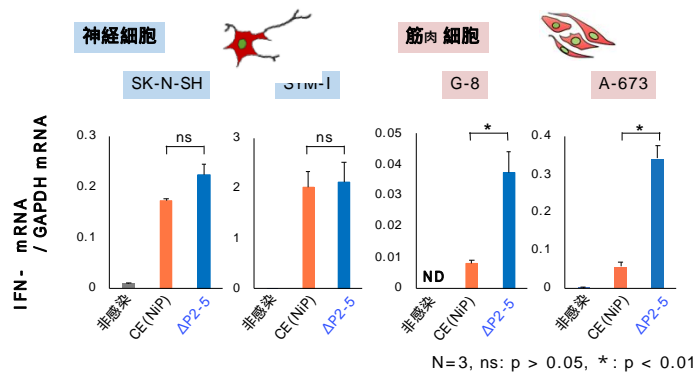


図1 各感染細胞における IFN- mRNA の発現量の比較

( 3 ) CE(NiP)および CE(NiP) P2-5 を感染させた培養神経細胞では、同等のルシフェラーゼ活性が検出された。一方、CE(NiP) P2-5 を感染させた筋肉細胞では、CE(NiP)感染細胞よりも有意に高いルシフェラーゼ活性が認められた。従って、神経細胞よりも筋肉細胞において、CE(NiP) $\Delta$ P2-5 はより IFN- プロモーターを活性化させることが示された。

( 4 ) コントロールとして空ベクターを導入した筋肉細胞では、NDV の感染刺激によるルシフェラーゼ活性の上昇が検出され、IFN- プロモーターの活性化が確認された。空ベクターを導入した細胞に対し、pC-NiP および pC-P $\Delta$ P2-5 を各々導入した筋肉細胞では、有意に低いルシフェラーゼ活性が確認された。一方で、pC-NiP および pC-P $\Delta$ P2-5 を導入した各細胞において検出されたルシフェラーゼ活性の間には優位な差は認められなかった。従って、プラスミドによる P 蛋白質アイソフォームの発現、ならびに感染刺激として NDV を用いる条件では、( 3 ) において認められた tPs の発現の有無が IFN- プロモーター活性に影響する現象は確認できなかった。

( 5 ) まとめ : ( 1 ) および ( 2 ) の実験結果より、筋肉細胞における IFN 産生抑制には P1 のみならず tPs が必要となる一方、神経細胞における IFN 産生抑制には tPs の必要性が低いことが示された。さらに ( 3 ) の実験から、筋肉細胞および神経細胞における tPs の必要性の違いが、IFN- プロモーター活性を抑制する機構に由来することが示唆された。これまでに細胞種に依存したアイソフォームの IFN 産生抑制機能を検証した報告はなく、本研究は狂犬病ウイルスの自然免疫抑制機序の一端を明らかにする成果を得ることができた。

当初の予測では、各種感染細胞内における P 蛋白質アイソフォームの発現パターンの差が、同蛋白質による細胞種に依存した IFN 産生抑制に関与していると考えていた。本研究では、各細胞種によって IFN 産生抑制に必要なアイソフォームが異なることを示すことができたため、次にこの点を検討する予定であった。しかしながら、筋肉細胞に対するウイルスの感染能が、神経細胞に比べ著しく低く、感染細胞での発現パターンの検出・比較が困難であった。また、( 4 ) の実験において観察されたように、pC-NiP および pC-P $\Delta$ P2-5 を導入した筋肉細胞に NDV による感染刺激を加えた場合、( 3 ) の実験において観察された IFN- プロモーター活性の差が認められ

なかった。この結果は、P 蛋白質を発現させ、かつ NDV による感染刺激を与えても、感染細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現パターンや同蛋白質による IFN 産生抑制活性を検証できないことを示している。したがって、今後はより狂犬病ウイルスの感染細胞に近い状況を再現するため、P 蛋白質のみならず、P 蛋白質と結合しウイルス感染において重要な役割を担うことが知られている N 蛋白質および L 蛋白質を共発現させる必要があると考えられる。その上で、( 4 ) と同様の実験、ならびに P 蛋白質アイソフォームの発現パターンを検討する必要がある。

#### < 引用文献 >

1. Blondel, D., *et al.*, 2002, *Oncogene* **21**: 7957-7970.
2. Brzozka, K., *et al.*, 2005, *Journal of virology* **79**: 7673-7681.
3. Brzozka, K., *et al.*, 2006, *Journal of virology* **80**: 2675-2683.
4. Chenik, M., *et al.*, 1995, *Journal of virology* **69**: 707-712.
5. Ito, N., *et al.*, 2010, *Journal of virology* **84**: 6699-6710.
6. Marschalek, A., *et al.*, 2011, *European journal of cell biology* **91**: 17-23.
7. Moseley, G. W., *et al.*, 2009, *Journal of cell science* **122**: 3652-3662.
8. Okada, K., *et al.*, 2016, *Journal of virology* **90**: 8226-8237.
9. Shimizu, K., *et al.*, 2006, *Microbiology and immunology* **50**: 975-978.
10. Vidy, A., *et al.*, 2005, *Journal of virology* **79**: 14411-14420.

#### 5 . 主な発表論文等

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

(1) Kazuma Okada, Naoto Ito, Tatsuki Takahashi, Shoko Nishiyama, Makoto Sugiyama. Different rabies virus P protein isoforms contribute to the suppression of IFN induction in neural and muscle cells, the 66th Annual Meeting of the Japanese Society of Virology, 2018

(2) 岡田 和真, 伊藤 直人, 高橋 龍樹, 西山 祥子, 杉山 誠. 神経細胞および筋肉細胞での IFN 産生抑制における P 蛋白質アイソフォームの重要性, 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。