

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006 年度～2008 年度
 課題番号：18300136
 研究課題名（和文）齧歯類におけるハンタウイルス持続感染成立機構（感染免疫担当細胞の機能）の解析
 研究課題名（英文）Studies on persistent hantavirus infection in rodents; throughout analysis of function of immune cells
 研究代表者 有川 二郎 Jiro Arikawa 北海道大学・大学院医学研究科 教授
 研究者番号：(10142704)

研究成果の概要：ハンタウイルスは持続感染齧歯類が感染源となる人獣共通感染症でヒトに腎症候性出血熱やハンタウイルス肺症候群という重篤な疾病を引き起こす。齧歯類は血中に高い中和抗体を保有しつつ不顕性にウイルスを排泄し続けるというきわめて特徴的な持続感染を成立させている。本研究では齧歯類におけるウイルス特異的CTL抑制を中心とする免疫抑制を介したハンタウイルス持続感染成立機構の詳細を明らかにすることを目的とする。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学・6912

キーワード：①ハンタウイルス ②免疫抑制 ③CTL ④MHC テトラマー
 ⑤持続感染 ⑥HFRS ⑦自然宿主 ⑧実験感染

1. 研究開始当初の背景

(1)ハンタウイルス感染症と自然宿主齧歯類の病態

●ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類される RNA ウイルスでヒトに腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)という重篤な出血熱を引き起こす。

●持続感染齧歯類が感染源となる人獣共通感染症である。齧歯類は血中に高い中和抗体を保有しつつ不顕性に生涯ウイルスを排泄するという、RNA ウイルスの感染病態としては極めて特徴的な持続感染を成立させているが、持続感染の成立機構については不明である。

(2)自然感染ドブネズミの生態学的研究

●申請者はこれまでに自然感染ドブネズミの汚染コロニーを対象に5年間継続疫学調査をした成績から、幼若ネズミは移行抗体によって感染から防御され、移行抗体消失(生後2-3ヶ月)に一致して感染し、持続感染成立することによりコロニー内でウイルスが持続される可能性を明らかにした(J. Vet. Med. Sci. 1994)。

(3)実験マウスモデルの開発と解析

申請者はこれまでにほ乳マウスと SCID マウスモデルを開発し、以下の点を明らかにし

てきた

● 致死量以下のハンタウイルス接種で耐過したほ乳マウスは持続感染し、特異的 T 細胞が抑制されていた。(J. Virol. 2003, Arch. Virol. 2004)

● 感染 2 週間後の SCID マウスに正常マウス由来脾臓細胞や T 細胞を移入しても特異的 T 細胞の出現が 3 ヶ月間以上抑制され、感染の拡大と宿主免疫応答時期のバランスが持続感染成立に重要であることを明らかにした。(Virol. 2004)

● ハンタウイルス核蛋白 (nucleocapsid protein) 上の T 細胞エピトープ配列を明らかにし、合成されたペプチドと MHC テトラマーによって特異的 T 細胞検出系を確立した (未発表成績)。

● 持続感染へ移行する途中の、新生児期にウイルスを摂取した感染マウス脾臓中では樹状細胞に感染が限局していることを発見し、免疫細胞の感染が持続感染成立と強い関連を持っている証拠を得た (未発表成績)。

2. 研究の目的

げっ歯類におけるハンタウイルス持続感染成立機構を明らかにすることを目的として、免疫担当細胞 (樹状細胞やマクロファージ系等) の感染が細胞性免疫を抑制するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

持続感染モデルマウスを用いて以下の解析を進めた。

(1) MHC tetramer 陽性脾細胞の FACS を用いたカウント

(2) 抗原 ペプチドを用いた抗原刺激に対する CD8 陽性 T 細胞における IFN-gamma の産生

(3) 肺のホモジネートの Western Blot によるウイルス核蛋白の検出

(4) 持続感染樹状細胞・マクロファージ系細胞の準備

1) In vivo での準備

ほ乳マウスに生後 2 4 時間以内にハンタウイルスを接種したマウスでは、接種後 2 週間で脾臓内の CD11c 陽性細胞が感染している。脾細胞を単離した後 CD11c 抗体を用いて CD11c 陽性細胞分画を得る。この操作でハンタウイルス感染細胞が濃縮されることはすでに確認している。

2) in vitro での準備

マクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞の株化細胞および初代培養細胞をハンタウイルスに持続感染させることを試みる。初代培養の CD11c 陽性細胞、腹腔マクロファージ、株化樹状細胞の BC-1 などはほとんどハ

ンタウイルスに感染しないことが分かっている。これらの細胞を Fc レセプター、補体レセプターなどを介して抗体依存性、補体依存性に感染を成立させることを試みる。

(5) ハンタウイルス持続感染樹状細胞の機能の変化

1) 付着能、大きさ、貪食能、などの一般性状の変化

2) 抗原提示能の変化 ---- IFN gamma の産生を指標として

ハンタウイルス特異的抗原提示能

ペプチドエピトープによる他の抗原に対する抗原提示能

3) 液性因子産生能の変化

(6) ハンタウイルス持続感染樹状細胞の遺伝子発現パターンの変化・持続感染樹状細胞の DNA アレイを用いた解析および表面マーカーを用いた解析

4. 研究成果

(1) (2) (3) 持続感染マウスの T 細胞においては MHC tetramer 陽性細胞は観察されるものの、抗原刺激後の IFN-gamma の産生が抑制されており、肺のホモジネートからはウイルス蛋白が多量に検出された。

(4) 持続感染の key として考えられる持続感染樹状細胞およびマクロファージを in vivo および in vitro で調整することを試みた。樹状細胞はごく一部が感染し、その表面マーカーからは形質細胞様樹状細胞であることが予測されたが、これは感染後アポトーシスによる細胞死に向かい、持続感染細胞を調整することができなかった。一方マクロファージは株化細胞では持続感染するが primary では感染効率が上がらなかった。

(5) 持続感染樹状細胞が細胞死により確立できなかったことから、解析を行うことができなかった。一般にハンタウイルスは細胞傷害性を持たないと考えられており、この細胞にのみ細胞障害を起こすことは大変特殊な例で有ると考えられた。

(6) 抑制系のコレセプターである PD1 が持続感染マウスの脾臓細胞全体に高率に発現していることが明らかとなり、ハンタウイルス感染抗原提示細胞からの何らかの不正な働きかけによって、PD1 システムによる免疫抑制が CTL に起こり、結果として持続感染が成立している可能性が示された。また、DNA アレイの結果からは IRF7 の情報伝達系に不調が起きている可能性が示された。

以上の結果をふまえ野生ラットでの本抑制システムの実証を目指して、ラットでの感染実験を進めた。成熟ラットにハンタウイルスを実験感染し、一過性感染を誘導した。

このラットからIgM検出系・リアルタイムPCRによるウイルスゲノム定量系を構築した。この二つはIgG抗体と並んで持続感染の指標となると考えられる。これらのラットを用いてこれまでに合成したソウルウイルス合成ペプチドを用いて CTL エピトープの検索を進めている。さらにサイゴン湾を持続感染ラットのフィールドとして選定し、サイゴン湾由来ウイルスの配列に準じたリアルタイム PCRによるゲノム検出システムを開発した。現在これらの解析系を用いて自然感染ラットにおける免疫の状態を解析中である。これまでの結果では自然感染ラットは高いIgG抗体を持ちながらウイルスゲノムも同時に保有し、さらにIgMも検出される。この状態はこれまでの実験マウスを用いた持続感染モデルで得られた結果と一致することから、おそらく昨年度までに解析を進めた実験感染モデルは野外の状況を反映した解析系で有ると考えられた。今後CTLの抑制と抑制系分子の発現についても解析を進めることで、持続感染成立のメカニズムを実験感染および野外例の解析の両面から明らかにすることができると考えられる。

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4件)

- ①Chandy S, Yoshimatus K, Ulrich RG, Mertens M, Okumura M, Rajendran P, John GT, Balraj V, Muliril J, Mammen J, Abraham P, Arikawa J, Sridharan G. Seroepidemiological study on hantavirus infections in India., ELSEVIER/Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 査読有り102巻, 2008, P70-74
- ②Taruishi M, Yoshimatsu K, Hatsuse R, Okumura M, Nakamura I, and Arikawa J, Lack of vertical transmission of hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice., Archives of Virology, 査読有り153 (8) 巻, 2008, P1605-1609

③Yamamoto H, LI T-C, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Inuki K and Takeda N, Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan

Experiment Animals 査読有り 57(4) 2008 P367-376

④Arai S, Ohdachi S D, Asakawa M, Kang H J, Mocz G, Arikawa J, Okabe N, Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotichus talpodeis*), Proceedings of the National Academy of Sciences

査読有り, 105 巻, 2008, P16296-16301

[学会発表] (計7件)

- ①駒貴明, 吉松組子, 垂石みどり、遠藤理香、海老原秀喜、有川二郎、新世界ハンタウイルス感染の血清型鑑別診断法の確立, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008年10月26日, 岡山コンベンションセンター (岡山)
- ②Nur Hardy Abu Daud, 苺和宏明、石塚万里子、瀬戸隆弘、宮下大輔、真田崇弘、中内美名、好井健太郎、前田秋彦、吉松組子、有川二郎、Evgeniy Tkachenko, 高島郁夫 Genetic and antigenic characterization of Puumala virus strain DTJ-Ufa-97 isolated from a patient of hemorrhagic fever with renal syndrome, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008年10月26日, 岡山コンベンションセンター (岡山)

③新井智、大館智志、浅川満彦、有川二郎、Mocz Gabor、岡部信彦、Yanagihara Richard、国立感染症研究所 感染症情報センター、北海道大学 低温科学研究所、酪農学園大学 獣医学部、北海道大学 医学部、University of Hawaii at Manoa, USA, Newfound Hantavirus Sequences in the Japanese Shrew Mole (*Urotrichus talpoides*), 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008年10月26日, 岡山コンベンションセンター (岡山)

④Tegshduuren Erdenesaikhan, 吉松組子、有川二郎、石原智明:モノクローナル抗体を用いた食中由来ハンタウイルス Thottapalayam ウイルスの抗原性の解析, 第146回日本獣医学会学術集会 2008年9月24日, ワールドコンベンションセンターサミット(宮崎)

⑤真田崇弘、莉和宏明、瀬戸隆弘、谷川洋一、宮下大輔、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫
多種類のハンタウイルス血清型の検出が可能な抗原検出法の開発,
第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月24日, ワールドコンベンションセンターサミット(宮崎)

⑥Yoshimatsu, K. Taruishi, M. Arikawa, J., Analysis of the hantavirus-specific

CD8+ T cell response in mice,
The 7th Japan-China International
Conference Virology, 2008年6月1日, 東京
大学医学部2号館本館大講堂

⑦吉松組子、垂石みどり、有川二郎、マウスのハンタウイルスに対する細胞性免疫応答の解析
第55回日本実験動物学会総会, 2008年5月15日, 仙台国際センター(仙台)

以上

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有川 二郎 (ARIKAWA JIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 10142704

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

森松 組子 (吉松 組子)

(YOSHIMATSU-MORIMATSU KUMIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・準教授

研究者番号: 90220722

遠藤 理香 (ENDO RIKI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30399852

莉和 宏明 (KARIWA HIROAKI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・準教授

研究者番号: 70224714