

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年 6月 12日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200036

研究課題名（和文） 脳炎発症性パラミクソウイルスの神経伝播機序の解析

研究課題名（英文） Analysis of propagation manners of paramyxoviruses in neural cells.

研究代表者 米田 美佐子 (YONEDA MISAKO)

東京大学 医科学研究所 准教授

研究者番号：40361620

研究成果の概要（和文）：本研究は、急性および持続感染後の再活性化により致死性脳炎を引き起こすパラミクソウイルス科のウイルスである麻疹ウイルスおよびニパウイルスの、神経細胞間伝播機序を明らかにすることを目的とした。ラット神経細胞を AMCA(on-chip agarose microchamber array)培養系を用いて培養し、蛍光蛋白発現組換え麻疹ウイルスを感染させる実験により、隣接する神経細胞間での麻疹ウイルスの伝播様式を明らかにすることができた。また、蛍光標識を付加したニパウイルス構成蛋白を作製し、細胞内での挙動を解析した結果、これまで知られていなかったウイルス蛋白同士の相互作用領域を同定することができた。さらに、EGFP 発現ニパウイルスを用いてアフリカミドリザル体内でのウイルス伝播をマクロに解析した。その結果、脳への伝播は比較的遅く全身感染後に起こることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Both Measles and Nipah virus causes severe acute or late-onset encephalitis in human. In this study, we aimed to investigate the mechanisms of measles and nipah virus spread between neural cells. We established the AMCA (on-chip agarose microchamber array) system for primary neural cells, and elucidated the propagation manner of MV to neighboring cells. By using fluorescent labeled- viral protein, a new domain, which was important for interaction of NiV N and P protein, was identified. Further, we investigated NiV spread in African green monkey by using EGFP-expressing recombinant NiV. The results indicated that lethal infection to CNS occurred after systemic infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：細胞

1. 研究開始当初の背景  
MV は急性脳炎のみでなく、持続感染後に致死

性の亜急性硬化性全脳炎を発症させるが、本病は現在でも治療法がなく難病に指定され

ている。NiV 感染症は、近年アジアで出現した新興感染症で、急性脳炎により 40-75%が死亡する。持続感染後の再発重篤例も多く、やはり治療法はない。パラミクソウイルス科には同様の急性および持続感染性の脳炎を生じさせるものが存在し、持続感染機序および脳神経細胞間の感染・伝播機序の解明は極めて重要な課題であるが、ほとんどわかっていない。夫々のウイルスの感染・増殖・伝播機序は、増殖の良い株化上皮細胞等で解析が進められており、通常 in vitro の神経細胞での増殖が悪いことや伝播経路の優れた解析系がないことなどから、細胞レベルでの神経細胞間伝播機序の解析報告はほとんどない我々は、これらのウイルスについて組換えウイルスを作出する技術を世界に先駆けて開発していた。本研究により神経細胞間伝播機序や神経細胞内でのウイルス成熟過程を明らかにできれば、治療薬の開発にも繋がると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、急性および持続感染後の再活性化により致死性脳炎を引き起こすパラミクソ科のウイルスである麻疹ウイルス (MV) およびニパウイルス (NiV) の、神経細胞間伝播機序を明らかにすることを旨とするものである。そのために、神経細胞を 1 細胞単位で培養する技術を確認し、ウイルスが神経細胞間をどのように伝播するのかを明らかにする。また、ウイルス蛋白に蛍光標識を付加し、細胞内でのウイルス蛋白の挙動を観察し、神経細胞におけるウイルスの成熟過程や出芽様式を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1) MV の神経細胞間伝播機序の解析

ラットの脳継代により樹立されたラットに脳炎を起こす MV 株の個々の遺伝子を MV-HL 株に組換えたウイルスを作出して、ラット脳親和性に関与するウイルス蛋白を同定し、その部分のみを組換え、齧歯類に脳炎を起こさせる rMV-CAM(HP)-EGFP を開発した。これを、AMCA (on-chip agarose microchamber array) 培養系を用いて培養した神経細胞に感染させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行なう。また、神経突起を介したウイルス伝播が、ウイルス粒子放出によるか細胞融合によるかをだぶるパッチクランプで解析する。

### 2) NiV の各構成蛋白の細胞内移動の解析

NiV の構成蛋白の C 末に蛍光蛋白を連結した蛍光融合蛋白発現ベクターを作出し、ハムスター胎児初代培養神経細胞に導入し、細胞ないでの動態を観察する。

### 3) NiV の感染経路の解析

EGFP 発現 NiV を感受性動物であるアフリ

カミドリザルに感染させ、経時的に各臓器でのウイルスの蛍光を観察することにより、個体内でのウイルス伝播を解析する。

## 4. 研究成果

### 1) MV の神経細胞間伝播機序の解析

ラット脳海馬領域より神経細胞を回収して初代培養細胞を作製した。連携研究者および分担研究者により、リジンコートしたディッシュにアガロスを重層し、顕微鏡下でレーザー照射により well および神経回路の溝を設計する培養系である AMCA 培養系を作製した。神経突起を介して隣接する細胞へ接触できる最適 well 間隔などの条件検討を行なった後、この well に組換えウイルスである MV-GFP を感染させた神経細胞を生着させ、単個の培養神経細胞間において神経突起を介した MV 感染伝播が起こるかを GFP の蛍光を示標に観察した。隣接する細胞へウイルスが伝播する際の伝播様式を解析するため、さらに接合部位の電子顕微鏡観察やパッチクランプ解析を行なった。その結果、神経突起を介して隣接する神経細胞体に伝播する様子が観察できた。さらにこの伝播は、ウイルスの budding によるのではなく、細胞融合によることも示唆された。

### 2) NiV の各構成蛋白の細胞内移動の解析

NiV のゲノムの複製に関与する N、P 蛋白にそれぞれ異なる蛍光標識を付加し、細胞を生きた状態で観察することにより、これまで知られていなかった N-P 相互作用領域を同定することができた。また、蛍光標識を付加した M 蛋白を発現する組換え NiV の作出に成功した。さらに、ウイルスの出芽への関与が示唆されている M 蛋白中のアミノ酸 2 残基を置換した組換えウイルスも作出して比較観察を行なったところ、明らかに異なる細胞融合像を示すことが明らかとなった。

### 3) NiV の感染経路の解析

EGFP を発現するウイルスを用いてアフリカミドリザルの感染実験を行い、感染初期からのウイルス伝播をマクロに解析した。経鼻、経口摂取後初期に扁桃や気管などでウイルスの蛍光が観察され、その後腹腔内の臓器に広がり、脳においては接種後 12 から 14 日に前頭葉の脳蹄に蛍光が観察され始めた。ニパウイルスは非常に広範の組織に感染するが脳神経へ感染が広がることで致命的になると考えられているが、今回の観察結果から、脳への感染は全身感染後に起こることが明らかになり、その間の治療の重要性が示唆された。

## 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 9 件)

1. Imai, C., Fujita, K., Shimizu, F., Sugai, A., Yoneda, M. and Kai, C. Comparative and mutational analyses of promoter regions of rinderpest virus. *Virology*, 396: 169-177, 2010.

2. Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Terao-Muto, Y., Sato, H., Kai, C. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J. Virol.*, 84 (9), 4183-4193, 2010.

3. Yoneda, M., Guillaume, V., Sato, H., Fujita, K., Georges-Courbot, M-C., Ikeda, F., Omi, M., Muto-Terao, Y., Wild, F. and Kai, C. The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in vivo. *PLoS ONE*, 5(9), e12709(1-8), 2010..

4. Omi-Furutani, M., Yoneda, M., Fujita, K., Ikeda, F. and Kai, C. Novel phosphoprotein-interacting region in Nipah virus nucleocapsid protein and its involvement in viral replication. *J. Virol.* 84(19), 9793-9799.

5. Watanabe, A., Yoneda, M., Ikeda, F., Sugai, A., Sato, H. and Kai, C. Peroxiredoxin 1 is Required for the efficient transcription and replication of measles virus. *J. Virol.*, 85(5), 2247-2253 2010.

6. Huang M., Sato H., Hagiwara K., Watanabe A., Sugai A., Ikeda F., Kozuka-Hata H., Oyama M., Yoneda, M. and Kai, C. Determination of phosphorylation site in Nipah virus nucleoprotein and its involvement in viral transcription. *J. Gen. Virol.*, 92(Pt9);2133-2141, Epub 2011 May 25.

7. Takayama, I., Sato, H., Watanabe, A., Omi-Furutani, M., Kanki, K., Yoneda, M. and \*Kai, C. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, 424, 45-55, 2012.

8. Sugiyama, T., Yoneda, M., Kuraishi, T., Hattori, S., Inoue, Y., Sato, H. and Kai, C. Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activation molecule as a novel oncolytic virus for breast cancer treatment. *Gene Therapy*, 1-10, 2012.

9. Sugai, A., Sato, H., Yoneda, M. and Kai, C. Phosphorylation of measles virus phosphoprotein at S86 and/or S151 downregulates viral transcriptional activity. *FEBS Letters*, 586(21):

3900-7, 2012.

[学会発表] (計6件)

1. 米田美佐子, 佐藤宏樹, 藤田賢太郎, 寺尾由里, 池田房子, 小見美央, 甲斐知恵子. ニパウイルスアクセサリー蛋白の病原性への関与. 第56回日本ウイルス学会, 東京, 2009年10月.
2. 小見-古谷美央, 米田美佐子, 池田房子, 甲斐知恵子. 蛍光融合蛋白を用いたニパウイルス N 蛋白の P 蛋白相互作用領域の解明. 第56回日本ウイルス学会, 岡山, 2009年10月25-27日
3. Huang, M., Sato, H. Hagiwara, K., Watanabe, A., Ikeda, F., Oyama, M., Yoneda, M. and Kai, C. Analysis of phosphorylation residues on Nipah virus nucleoprotein role of the phosphorylation. Florida, USA, March 9-12, 2010.
4. Yoneda, M., Guillaume, V., Sato, H., Fujita, K., Omi, M., Geroges-Courbot, M-C. Ikeda, F., Wild, F. and Kai, C. The role of Nipah virus accessory proteins in it's pathogenicity in vivo. XIVth Int. Conf. on Negative Strand Viruses. Bruges, June 21-25, 2010.1
5. Omi, M., Yoneda, M., Fujita, K., Ikeda, F. and Kai, C. Identification of novel N-P interacting domain in Nipah virus nucleocapsid protein. XIVth Int. Conf. on Negative Strand Viruses. Bruges, June 21-25, 2010.
6. Yoneda, M., Mogi, R., Soda, D., Ikeda, F., Ishii, M., Kawaguchi, Y., Sato, H. and Kai, C. Safe and highly effective vaccine for pig Nipah virus infection using recombinant pseudorabies virus. XVth Int. Cong. Virol. Sapporo, Japan, September 11-16, 2011.

[図書] (計2件)

1. 米田美佐子, 甲斐知恵子 ニパウイルス, ヘンドラウイルス (特集: 種の壁を越える感染症-EpidemiologyとEpizootiology-)、*臨床と微生物*、近代出版 37(2):133-138, 2010.
2. Kai, C. and Yoneda, M. Henipavirus infections - An expanding zoonosis from fruit bats. *Journal of Disaster Research*, 6, 390-397, 2011.

[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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米田 美佐子 (YONEDA MISAKO)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：40361620

### (2) 研究分担者

藤幸 知子 (FUJIYUKI TOMOKO) (H23)  
東京大学・医科学研究所・特任研究員  
研究者番号：50610630

#### 研究分担者

小見 美央 (OMI MIO) (H21-22)  
東京大学・医科学研究所・特任研究員  
研究者番号：00526767

### (3) 連携研究者

安田 賢二 (YASUDA KENJI) (H21-23)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
教授  
研究者番号：20313158