

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658247

研究課題名(和文) ウエストナイルウイルスの脳血管関門通過機構の解明と脳炎の治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of intracellular trafficking and entry to the central nervous system of West Nile virus and development of therapeutic strategy of West Nile virus encephalitis

研究代表者

澤 洋文(SAWA, HIROFUMI)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：30292006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ウエストナイルウイルス(WNV)はアメリカ合衆国、アフリカ等広域に分布しており、ウエストナイル脳炎の致死率が高い。本研究はWNVの細胞内輸送動態を解明し、得られた基礎的知見に基づき脳炎治療法の開発の基盤を形成することを目的とした。

本研究により、細胞への侵入段階においてWNVの輸送には少なくとも2種類の異なった細胞内輸送系が関与すること、チュブリンが輸送に関与すること、RabがWNV粒子の細胞からの放出に関与することが明らかになった。これらの結果はチュブリン、Rab等を抑制することによりWNV感染が抑制されることを示しており、今後のWNVによる脳炎の治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)： West Nile virus (WNV) is widely distributed in United States and African countries and so on. The mortality rate of WNV encephalitis is still high. This research project attempts to analyze the intracellular trafficking mechanisms of WNV and find basic findings which are related to therapeutic strategy against WNV encephalitis.

We found that following cellular entry, WNV subviral particle (SVP) movements could be divided into two phases: early (slow movement) and late (fast movement) phase. Moreover, fast viral particle movement at the late phase correlated with SVP-microtubule association. In addition, we found that the release of WNV from cells is regulated by cellular protein, Rab. According to these results, there are some possibilities to establish the therapeutic strategies against WNV encephalitis in which we can target cellular proteins, such as tubulin and Rab.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：人獣共通感染症 ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

ウエストナイルウイルス(WNV)はフラビウイルスに属する RNA ウイルスである。WNV 感染症はアフリカ、ヨーロッパ、中央アジア、西アジアなど広い地域に分布しており、ウエストナイル脳炎の致死率は高い。WNV のゲノムは C、prM、E の構造タンパクの他、NS1、2A、2B、3、4A、4B、5 の非構造タンパクの遺伝子からなる。WNV 粒子は M および E タンパクからなるエンベロープを有し、内部には C タンパクとウイルス RNA からなるヌクレオカプシドを含む。WNV は蚊により媒介され、血液を介して人間、馬等の体内に入り、リンパ組織で増殖し、1 次ウイルス血症を起こす。さらに細網内皮系での増殖に続いて 2 次ウイルス血症を起こし、最終的に WNV は血液脳関門を通過して脳内に侵入し、脳炎を惹起する。従来、WNV の血液脳関門の通過は、ウイルス感染により分泌が亢進した TNF- $\alpha$  の作用による、ウイルスの血管内皮細胞間隙の通過の亢進がその原因と考えられていた。しかし研究代表者は培養系を用いて、WNV の血管内皮細胞の通過が細胞間隙を介するものではなく、血管内皮細胞内を通過することを明らかにした。さらに「脳炎を惹起する強毒 WNV 株は、弱毒 WNV 株に比べ、血管内皮細胞内の通過性が著明に高いこと、強毒 WNV 株の血管内皮細胞内の通過性が E タンパク質の 2 個のアミノ酸により規定されていること。」を見出した (Hasebe et al, BMC Microbiol 10:165, 2010)。

本研究はこの結果を発展させ、細胞内の WNV の細胞内輸送動態を解明し、得られた基礎的知見に基づき脳炎治療法の開発の基盤を作ることを目的とする。

### 2. 研究の目的

WNV による脳炎は致死的であり、発症機構も不明な点が多い。従来 WNV による脳炎は、感染により産生が増加した炎症性サイトカインにより血液脳関門が破綻し、脳内に WNV が侵入することにより脳炎を惹起すると考えられていたが、研究代表者及び研究分担者の長谷部は「脳炎を惹起する強毒 WNV 株が、他の弱毒株に比べて血管内皮細胞内の通過性が著明に高いこと、血管内皮細胞内の通過性が WNV の構造タンパク質である E タンパク質の 2 個のアミノ酸 (Serine156 および Valine159) により規定されていること。」を見出した。

本研究は細胞内での WNV の輸送動態を解明することにより、WNV の脳内侵入機構を解明し、得られた知見に基づいて脳炎の治療法の開発の基盤を作ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) WNV ゲノムの定量法：マウス由来細胞に WNV (NY99 6LP 株) を感染多重度 (Multiplicity of Infection: MOI) を 1 で接種し、感染 12 時間後に細胞を回収し、Trizol と PureLink RNA Mini kit を組み合わせ

せて RNA を抽出した。抽出した RNA は Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix を用いて、Step One Plus real Time PCR System により RT-qPCR (One-step qPCR) を実施した。WNV の RNA の検出のために、3' 側の非翻訳領域にプライマープロンプセットを設計し、WNV 感染細胞を用いて至適条件を設定した。

(2) WNV 感染実験: 8 週齢のメス C57BL/6Cr Slc マウスを吸入麻酔後に 100 プラーク形成単位 (Plaque Forming Unit: PFU) の WNV の NY99 6-LP 株を脳内に接種し、10 日目に脳組織を採集し、免疫組織学的検索を実施した。

(3) WNV 様粒子の細胞内輸送機構の解析: WNV の構造タンパク質である prM 及び E タンパク質を、細胞に強制発現させ、細胞培養上清中に WNV 様粒子を放出する安定細胞株を樹立する。また WNV の粒子形態及び機能が保たれていることを、電子顕微鏡、生化学的実験にて確認する。作成した WNV 様粒子を放出する細胞株の細胞膜を蛍光色素である DiI で標識し、蛍光標識した WNV 様粒子を作成する。作成した蛍光標識した WNV 様粒子を細胞に接種し、WNV 様粒子の細胞内動態をタイムラプス顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に解析する。

(4) 宿主因子である Rab と WNV の細胞内輸送の関連: WNV のウイルス粒子の細胞外放出機構を明らかにするために、細胞内小胞輸送の重要な制御分子である Rab に注目し、ER から細胞膜までの anterograde な小胞輸送に重要であることが報告されている約 30 種類の Rab タンパク質を選択し、Rab siRNA ライブラリーを作成した。WNV NY99 6-LP 株の構造遺伝子である CME を発現するプラスミドとルシフェラーゼをマーカー遺伝子として持つ WNV のレプリコンをトランスフェクションすることにより Virus Like Particle (VLP) を作成し、Rab siRNA ライブラリーを用いて、Rab タンパク質の抑制による VLP 放出への影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) WNV ゲノムの定量法: WNV 感染細胞から抽出した RNA を 10 倍ずつ希釈して、検量線を作成した (図 1: 灰色の曲線、図 2: 赤い点)。得られた結果から本系における PCR の増幅効率はほぼ 100% であることが明らかとなり (相関係数は 0.999)、WNV 感染細胞由来の RNA を用いたウイルス RNA の定量に使用可能であることが明らかとなった。

(2) WNV 感染実験: WNV の脳内接種により、脳組織では神経細胞傷害が惹起されていた (図 3)。また、WNV は主に神経細胞に感染することが明らかになった (図 4)。

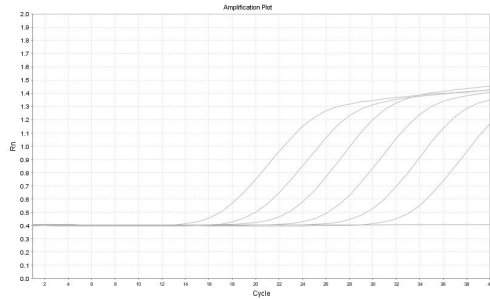


図 1: WNV 感染細胞から抽出した RNA を 10 倍ずつ希釈して実施した real time RT-PCR の結果。

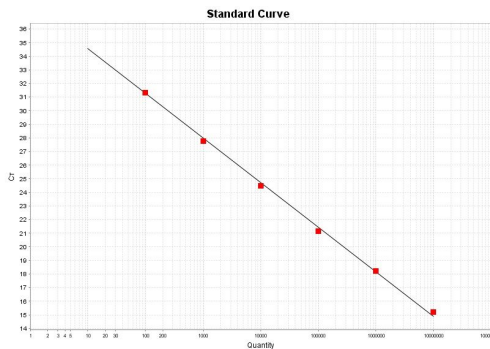


図 2: 図 1 の結果に基づいて作成した検量線。

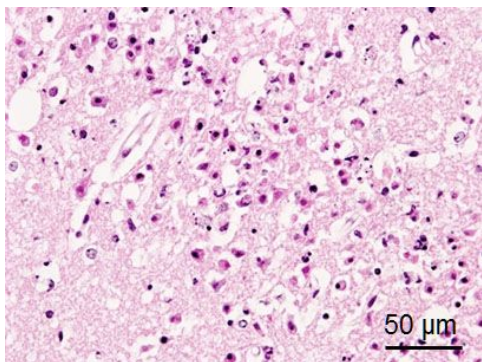


図 3: WNV 感染マウスの脳組織の HE 像。感染により神経細胞傷害が惹起されている。

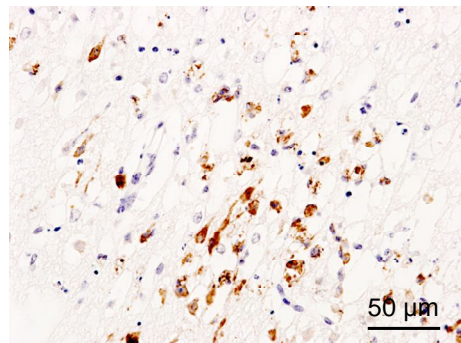


図 4: 図 3 で示した脳組織で WNV 抗原の発現を確認した免疫染色像。神経細胞に陽性シグナルが認められる。

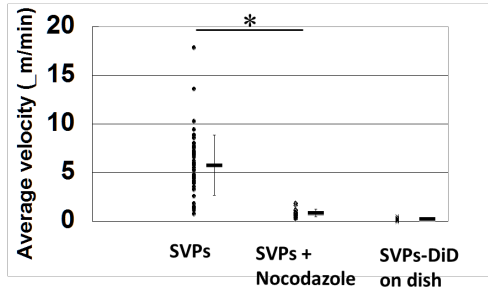


図 5: 微小管形成を阻害するノコダゾールで細胞を処理すると WNV 様粒子 (SubViral Particle: SVP) の速度が低下することを示した図。

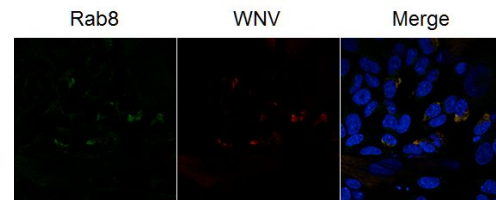


図 6: 神経系細胞に WNV (MOI=1) を接種し、Rab8 と WNV の抗原は共同在していた。

### (3) WNV 様粒子の細胞内輸送機構の解析:

WNV の構造タンパク質を細胞に強制発現させ、細胞培養上清中に蛍光色素で標識した WNV 様粒子を放出する安定細胞株を樹立した。また粒子の形態および機能が損なわれていないことを、電子顕微鏡、生化学的実験にて確認した。

蛍光標識した WNV 様粒子を細胞に接種し、WNV 様粒子の細胞内動態を詳細に観察した結果、WNV 様粒子は侵入段階において、移動速度が遅い相と速い相に分かれて輸送されていることを見出した。

輸送速度が速い相の WNV 様粒子の輸送は、微小管依存性であり、宿主因子であるチュブリンが関与していることを明らかにした (図 5)。

(4) 構造遺伝子 CME を発現するプラスミドとルシフェラーゼをマーカー遺伝子として持つ WNV のレプリコンを形質導入し、Virus Like Particle (VLP) を作成した。この細胞の培養上清を Vero 細胞に感染させ、感染した細胞で発現するルシフェラーゼ活性を測定することにより、培養上清中に放出された VLP 量を定量した。その結果、Rab8B の siRNA を用いたときのみ、有意に VLP の放出が抑制されることが明らかになった。

さらに、神経系の細胞である SK-N-SH 細胞に WNV を感染させ Rab8 との局在を検索した結

果、WNV 抗原と Rab8 は共局在していた( 図 6 )。

これらの結果から、Rab8 は WNV の細胞内輸送に何らかの影響を与えている事が示唆された。

(5) 以上の結果から、細胞への侵入段階において WNV 粒子は少なくとも 2 種類の速度の異なる細胞内輸送系により輸送されていることが判明した。また、輸送速度の速い相では輸送が宿主因子であるチュブリンが輸送に関与していること、また WNV 粒子の細胞からの放出に関しては Rab が関与していることが明らかになった。今後 WNV 粒子と細胞内のオルガネラ及び細胞骨格との局在の比較や、各種阻害剤処理等を行い、WNV 様粒子の動態に関連する他の宿主因子の同定と機能解析を試みる。

また本研究で得られた結果は、細胞内因子であるチュブリン、Rab 等を抑制することにより、WNV 感染が抑制されることを示したものであり、今後の WNV による脳炎の治療法の開発に寄与することが期待される。

#### 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 2 件 )

Makino Y, Suzuki T, Hasebe R, Kimura T, Maeda A, Takahashi H, Sawa H: Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in particle transport. **J Virol Methods** 195:250-257, 2013 査読有

DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.002.

Kobayashi S, Orba Y, Yamaguchi H, Kimura T, Sawa H: Accumulation of ubiquitinated proteins is related to the West Nile virus-induced neuronal apoptosis. **Neuropathology** 32(4): 398-405, 2012 査読有

DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01275.x.

[ 学会発表 ] ( 計 10 件 )

Kobayashi S, Orba Y, Yamaguchi H, Takahashi K, Sasaki M, Hasebe R, Kimura T, Sawa H: Autophagy inhibits West Nile virus replication: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, 2014, Sendai International Center, Sendai, Japan (Oral presentation)

Sawa H: Investigation of the mechanism of virion formation and its application in neurovirology research. The 12th International Symposium on NeuroVirology and 2013 Conference on HIV in the Nervous System, Capital Hilton in Washington, D.C., USA, Oct 29-Nov. 2, 2013 (Invited Speaker, Oral Presentation)

Kobayashi S, Orba Y, Yamaguchi H, Kimura T, Sawa H: Accumulation of ubiquitinated proteins is related to neuronal apoptosis induced by West Nile virus infection. The 4th International Researcher Seminar for Zoonosis Control, September 19-20, 2012, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan (Oral presentation)

小林 進太郎、大場 靖子、山口 宏樹、佐々木 道仁、長谷部 理絵、木村 享史、澤 洋文: オートファジーはウエストナイルウイルスの増殖を抑制する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸 (ポスター発表)

小林 進太郎、大場 靖子、山口 宏樹、佐々木 道仁、長谷部 理絵、木村 享史、澤 洋文: オートファジーによるウエストナイルウイルス増殖抑制機構の解明、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜 (口頭発表)

Kobayashi S, Orba Y, Hasebe R, Kimura T, Sawa H: Autophagy gene Atg5 inhibits West Nile virus replication. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、マリンメッセ福岡、福岡 (ポスター発表)

小林 進太郎、大場 靖子、山口 宏樹、木村 享史、澤 洋文: ウエストナイルウイルス感染神経細胞におけるユビキチン化タンパク質の蓄積。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 13 - 15 日、グランキューブ大阪、大阪 (口頭発表)

小林 進太郎、大場 靖子、長谷部 理絵、木村 享史、澤 洋文: オートファジーによるウエストナイルウイルスの増殖抑制。第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 14-16 日、岩手大学、盛岡 (口頭発表)

Kobayashi S, Orba Y, Yamaguchi H, Kimura T, Sawa H: Accumulation of ubiquitinated proteins contributes to the West Nile virus-induced neuronal apoptosis. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13-16 日、パシフィコ横浜 (ポスター発表)

小林 進太郎、大場 靖子、木村 享史、澤 洋文: ウエストナイルウイルス感染による神経細胞障害機構の解析。第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 19-21 日、大阪 大阪府立大学 (口頭発表)

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

○出願状況 ( 計 0 件 )

○取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.czc.hokudai.ac.jp/pathobiol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤 洋文 (SAWA, Hirofumi)  
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン  
ター・教授  
研究者番号：30292006

(2)研究分担者

長谷部 理絵 (HASEBE, Rie)  
北海道大学・(連合)獣医学研究科・講師  
研究者番号：70431335

(3)連携研究者

無し