

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450433

研究課題名(和文) ウイルス性神経疾患に影響を及ぼす宿主要因と環境要因

研究課題名(英文) Contribution of cellular and environmental factors to neuroviral infection

研究代表者

西野 佳以 (NISHINO, Yoshii)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：00271544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 関東地方のネコにおけるボルナ病ウイルス(BDV)血清疫学調査により、1歳未満の検体を含む約1/4が抗体陽性であった。健康状態、年齢、季節、性別における抗体陽性率に差は認められなかった。以上より、垂直伝播が主な感染経路である可能性と他の発症要因の必要性が示唆された。(2) BDV感染グリオーマ細胞ではTGF-βファミリー活性が変化していた。特に内因性BMP活性の上昇はIGFBP-3発現を誘導することが示された。(3) コルチコステロン(CORT)は神経初代培養細胞におけるBDVの伝播性を亢進した。BDV感染により、CORTあるいはカイニン酸による神経細胞の障害は亢進された。

研究成果の概要(英文)：(1) Our epidemiological study revealed that the specific antibodies against BDV were present in one fourth of cats, even in cats aged below one year. The seropositive ratio was constant, irrespective of age and sampling season. The present study suggests that additional factors are required for onset of Borna disease in naturally infected cats and that BDV is transmitted through vertical routes in cats. (2) The regulatory expression of genes related to the TGF-β family, and the role of the enhanced BMP pathway in modulating cell responses in BDV-infected glial cells, suggesting that endogenous BMP activity is responsible for the expression of IGFBP-3. (3) Corticosterone upregulates transmission efficiency of BDV in neurons and that kainic acid exposure enhances neuronal excitotoxicity induced by BDV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス ボルナ病ウイルス ストレス TGF-β 神経疾患 神経細胞 コルチコステロン グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性神経疾患は、治療が難しく予後が悪い。その原因として、感染した神経細胞がマイクログリアや免疫担当細胞により除去されると、その神経細胞が担っていた機能が失われ、神経障害という後遺症となって残ること、さらに血液脳関門が通過できる化学療法剤を制限していることが挙げられる。

(1) ボルナ病は、ボルナ病ウイルス(Borna disease virus : BDV)が中枢神経系に持続感染することにより起こる免疫応答依存性の神経ウイルス感染症である。感染動物は、時に致死的な神経疾患を引き起こすが、不顕性感染も多く存在する。現在、世界各地域で、鳥類やヒトを含む極めて幅広い動物種(約20種類)へ自然感染していることが知られている。

日本では家畜の致死的なボルナ病発症例はまだ報告されていない。しかし、ウマ、ウシ、ネコ、イヌ、さらに野生動物であるアライグマとニホンザルにおいて感染例が報告されている。特にネコとイヌでは、運動障害を伴ったボルナ病発症例が報告されており(1, 2)、一方、原因不明の繁殖障害を示す日本の乳牛で抗BDV抗体陽性率が高いことが今年報告されている(3)。また、近年、鳥ボルナウイルス(Avian bornavirus : ABV)が新たに同定され、ウイルス性神経節炎である腺胃拡張症の病因の一つであることが示された(4)。これらの知見より、家畜、伴侶動物、そして野生動物における原因不明の疾患のなかには「知られざるBDVあるいはABV感染症」が含まれている可能性があるかと予想されるが、ボルナ病発症機構といった本質的な点の多くが不明である。

(2) 実験感染すると、マウスでは不顕性感染が成立しやすいのに対し、ラットでは顕性感染し発症しやすいため、病態解析を目的とする場合はラットでの解析が適している。研究代表者らは、ボルナ病の多様な症状と発症の強弱の原因を明らかにするために、発症要因をウイルス要因、宿主要因、および環境要因の3つに分けて考えてきた。ウイルス要因に関する研究では、高病原性BDV株は免疫応答非依存性に中枢神経系を傷害する可能性を提唱した(5)。実際、BDV強毒株をT細胞性免疫不全であるヌードラットに感染したところ、脳炎は認められないにも

かわらず、致死的な発症をした。以上の結果から、ボルナ病には免疫応答に依存しない未知の発症機序があることを明らかにした。

(3) また、複数の系統の新生仔ラットへBDV強毒株を感染したところ、感染が成立したにもかかわらず、ラットの系統により病原性に違いが認められた。この結果は、免疫応答非依存的に発症させる能力のある強毒株ウイルスであっても、宿主要因によって病原性が決定されることを意味している。

(4) 一方、多機能分子であるTGF-βファミリーは脳で高発現するとアルツハイマー病等の神経疾患の発症に関与することが報告されているが(6)、研究代表者らはこれまでに、BDV感染成ラットでは複数のTGF-βファミリー遺伝子の発現が脳内で上がることを報告した(7)。また、副腎皮質ホルモンはストレス存在下で分泌が上昇し、過剰分泌により海馬の神経細胞死を起こすことが報告されている(8)。本研究は、ボルナ病の発症を規定する環境要因や宿主因子を明らかにしようとするものであり、ボルナ病の重要な特徴である「動物種・系統により多様な発症形態を示す」原因を掴む上で極めて重要と考えられる。また、持続感染症であるボルナ病の発症予防法の開発や、解決が望まれている他のウイルス性神経疾患における関連宿主要因の探索、あるいは治療法の開発に将来的に役立つ知見になると期待する。

2. 研究の目的

本研究では、ボルナ病における増悪因子となる環境・宿主要因を探り、その作用機序を明らかにするために、以下の2つの目的を達成することを目指した。

- (1) 既にボルナ病に影響を与える可能性がある環境ならびに宿主要因(副腎皮質ホルモン、およびTGF-βファミリー等)の影響、および作用機序について明らかにする。
- (2) ボルナ病の増悪因子となる宿主要因を網羅的に探索し、候補となる宿主要因を同定する。

3. 研究の方法

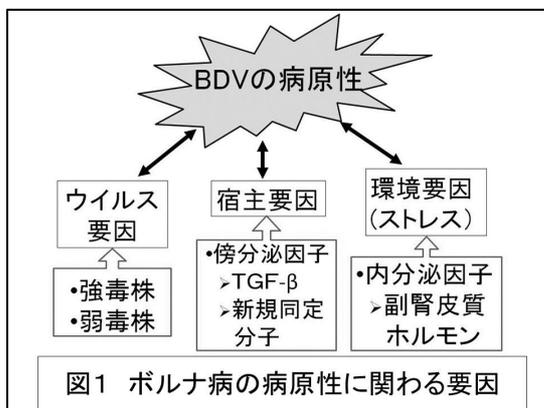
(1) 「東京近郊のイエネコにおけるBDV感染疫学調査」

BDVはネコに感染すると神経症状(よろよろ病)を引き起こす。私達は、東京近郊地域の複数の動物病院に来院した199匹のイエネコの抗BDV血清疫学調査を行った。

ネコの血漿を、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)で吸収処理後、GST-BDVp24あるいはp40抗原を用いたイムノブロット法により、特異抗体を検出した。抗体が検出された場合、BDVに感染した(履歴がある)と判定した。

(2) 「BDV感染グリア細胞におけるTGF-βファミリー関連遺伝子の発現とその影響」

BDVは感染動物に運動障害、行動学的異常



あるいは感覚異常といった多様な神経疾患を引き起こすが、その発症メカニズムは明らかにされていない。グリア細胞でBDV-Pタンパク質を強制発現するマウスは行動学的異常を示すことが報告されていることから、BDV感染グリア細胞には発症に関わるような異常が起こっている可能性がある。また、私達はこれまでにBDV感染したラットの脳でTGF-βファミリー関連遺伝子の発現レベルが変化することを報告している。本研究では、BDVが持続感染したグリオーマ由来株化細胞(C6BV細胞)におけるTGF-βファミリー関連遺伝子の発現レベルとシグナル伝達経路の阻害効果について解析し、BDV感染による細胞内情報伝達経路の変化について解析した。

(3)「BDV感染細胞における副腎皮質ホルモンならびにカニン酸の影響」

BDVはウマ、ヒツジなどの多くの温血動物の中樞神経系に持続感染することが報告されている。感染した動物は行動学的異常や運動機能障害、感覚異常などの神経症状を呈し、重篤な場合は致死的な神経疾患を引き起こすことが知られている。しかし多くの動物種で不顕性感染することも報告されており、ボルナ病の発症に至る詳しいメカニズムはまだ明らかにされていない。一方で、副腎皮質ホルモンのひとつであるコルチコステロン(CORT)はストレスによって長期にわたり過剰に分泌されると、脳内の神経細胞を障害することが報告されている。本研究では、CORTがBDV感染の発症を誘導する環境要因になる可能性を調べることを目的として、BDVに感染したマウスの神経初代培養細胞におけるCORT添加の影響を解析した。また、感染神経細胞のカニン酸感受性についても確認した。

妊娠14日齢のC57BL/6Nマウス(SLC)の胎仔から大脳皮質を取り出し、初代神経培養細胞を作製した。培養4日目にBDV-CRNP5株を感染し、培養8日目にCORT(10μM)を添加した。CORT添加後、神経細胞は継続的に4%パラフォルムアルデヒドあるいは10%中性ホルマリンにより固定し、それぞれ蛍光抗体染色あるいはFluoro-Jade C染色を行ない、神経細胞のBDV感染率と障害率を測定した。神経細胞のカニン酸感受性を調べるためには、同様に感染した細胞へ培養7日目にカニン酸(200μM)を添加し45分間培養後、新鮮な培地に置き換え24時間後に定法で固定しFluoro-Jade C染色を行ない、神経細胞の障害率について解析した。

4. 研究成果

(1)「東京近郊のイエネコにおけるBDV感染疫学調査」

199匹中53匹(27.1%)のイエネコにおいて、BDVp24あるいはp40抗原特異抗体が検出された。抗体陽性と診断されたイエネコの割合は、健康群(29.8%)、神経症状を伴わない疾患群(22.2%)、神経疾患群(33.3%)の3群間で有意差が認められなかった。また、年齢を4群に分けて比較したところ、抗体陽性率は1歳未満

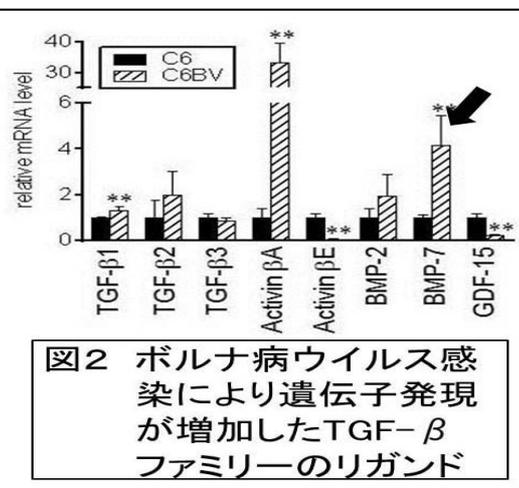


図2 ボルナ病ウイルス感染により遺伝子発現が増加したTGF-βファミリーのリガンド

(26.5%)、1歳以上4歳以下(25.0%)、5歳以上8歳以下(32.3%)、9歳以上(27.8%)となり有意差が認められなかった。興味深いことに、今回調査した1歳未満のイエネコは6か月齢~11か月齢であることから、抗BDV抗体は母猫からの移行抗体ではなく自らが感染し産生した抗体であることが示唆された。抗体陽性率は、性別、採材した季節間でも有意差は認められなかった。また、抗体陽性のネコは調査時から5年間ボルナ病を発症しなかった。

以上の結果から、関東地方のイエネコでは健康状態に関わらず約1/4が抗BDV抗体陽性だったが、5年間不顕性感染していたことから、発症するには、さらに何らかの要因(きっかけ)が必要であろうことが示唆された。また、1歳未満の抗体陽性率が年齢に関わらず維持されていたことから、ネコでは垂直伝播あるいは生後初期に感染している可能性が示唆された。

(2)「BDV感染グリア細胞におけるTGF-βファミリー関連遺伝子の発現とその影響」

BDV感染C6グリオーマ細胞(C6BV)と対照となるC6細胞におけるTGF-βファミリーの遺伝子発現を検討した。12種類のTGF-βファミリーの発現を検討したところ、TGF-β1、inhibin/activin βAおよびBMP7の発現がBDV感染により有意に上昇し、inhibin/activin βE発現は有意に減少した(図2)。特に、inhibin/activin βAの上昇(33倍)とBMP7の上昇(17倍)は顕著であった。内因性TGF-βファミリー活性を反映していると考えられるSmad7の遺伝子発現量は、BDV感染によって上昇し、その発現上昇はTGF-β/activinあるいはBMP経路の阻害剤によりそれぞれ抑制された。したがって、C6グリオーマ細胞ではBDV感染によって確かにTGF-βファミリー活性は変動すること、内因性のactivin/TGF-β活性を引き起こす因子としてactivin Aが、BMP活性としてBMP7が考えられた。

BDV感染によって上昇したTGF-βファミリー活性が何をしているのかを探るために、BDV感染によって発現上昇することが知られているIGFBP-3(成長因子であるIGF-1の結合蛋白質の一つ)の発現は、BMP経路の阻害剤によって抑制された。したがって、BDV感染によってグリア細胞に誘導されたBMP7発現は自身に作用

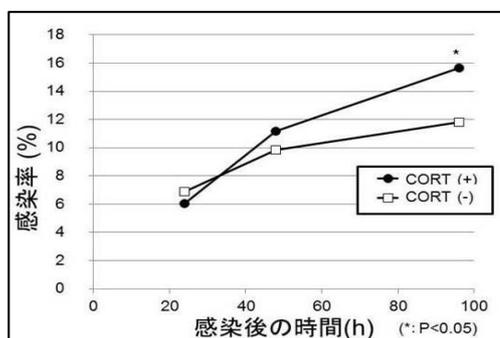


図3 副腎皮質ホルモン (CORT)添加による初代神経細胞でのボルナ病ウイルス感染率の上昇

して IGFBP-3 発現を誘導する可能性が示された。

TGF-β ファミリーが多様な生理学的・病理学的反応に関与していることは、よく知られている一方、病原微生物感染時の TGF-β ファミリーの動態ならびに関与については、多くが不明である。今後は、BDV 感染の何が TGF-β ファミリーの活性変化をどのように引き起こすのか、BDV 感染によって惹起された BMP 活性が IGFBP-3 遺伝子発現をどのように亢進するのか、検討が必要である。

(3) 「BDV 感染細胞における副腎皮質ホルモンならびにカイニン酸の影響」

BDV 感染大脳皮質神経初代培養細胞に CORT を添加すると、神経細胞におけるウイルス感染率が有意に上昇した (図3)。神経細胞は CORT 添加により有意に障害率が上昇したが、BDV 感染細胞ではさらに障害率が上昇した。また、カイニン酸の添加は神経細胞にアポトーシス等による障害を起こすことが知られているが、BDV 感染により有意に障害が増大した。BDV 感染初代神経培養細胞にグルココルチコイドレセプター (GR) 阻害剤であるミフェプリストンを前処置すると、CORT によるウイルス伝播促進効果が一時的に阻害された。

これらの結果から、CORT は BDV の神経初代培養細胞におけるウイルス伝播性を亢進し、BDV 感染神経細胞の障害性を高めることが示された。CORT のこれらの影響は、グルココルチコイドレセプターを介すると考えられる。また、カイニン酸は BDV 感染神経細胞に対しより強く興奮刺激を与える可能性が示された。

BDV が持続感染している動物において過剰なストレスが与えられると、脳内のウイルス感染が広がること、ウイルス感染細胞では GR、カイニン酸受容体あるいは AMPA 型グルタミン酸受容体を介するシグナル伝達が増強される可能性が示唆された。

<引用文献>

- (1) Nakamura, Y., Watanabe, M., Kamitani, W., Taniyama, H., Nakaya, T., Nishimura, Y., Tsujimoto, H., Machida, S., and Ikuta, K. High prevalence of Borna disease virus in

domestic cats with neurological disorders in Japan. *Vet. Microbiol.* 70: 153-169, 1999.

- (2) Okamoto, M., Kagawa, Y., Kamitani, W., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Iwai, H., Ikuta, K., and Taniyama, H. Borna disease in a dog in Japan. *J Comp Pathol.* 126: 312-317, 2002.
- (3) Hagiwara, K., Ando, T., and Koiwa, M. The influence of Borna disease viral infection on dairy cow reproduction. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 419-421, 2012.
- (4) Honkavuori, K. S., Shivaprasad, H. L., Williams, B. L., Quan, P. L., Hornig, M., Street, C., Palacios, G., Hutchison, S. K., Franca, M., Egholm, M., Briese, T. and Lipkin, W. I. Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis.* 14: 1883-1886. 2008
- (5) Nishino, Y., Kobasa, D., Rubin, S. A., Pletnikov, M. V., and Carbone, K. M. Enhanced neurovirulence of Borna Disease virus variants associated with nucleotide changes in the glycoprotein and L-polymerase genes. *J. Virol.* 76: 8650-8658, 2002.
- (6) Tesseur, I. and Wyss-Coray, T. A role for TGF-β signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models. *Curr. Alzheimer Res.* 3, 505-513, 2006.
- (7) Nishino, Y., Ooishi, R., Kurokawa, S., Fujino, K., Murakami, M., Madarame, H., Hashimoto, O., Sugiyama, K. and Funaba, M*. Gene expression of the TGF- family in rat brain infected with Borna disease virus. *Microbes and Infection.* 11:737-743. 2009.
- (8) Sapolsky, R. M. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp. Gerontol.* 34:721-732, 1999.

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)

Nishino, Y., Murakami, M and Funaba, M. Expression and role of the TGF-β family in glial cells infected with Borna disease virus. *Microbes Infect.* 18:128-136. 2016. (査読有)

Someya, A., Fukushima, R, Yoshida, M.,

Tanahashi, Y., Prapeuk, T., Iizuka, R., Hiram, H., Matsuda, A., Takahashi, S., Kurita, G., Kimura, T., Seo, M., Funaba, M. and Nishino, Y. A study on Borna disease virus infection in domestic cats in Japan. J.Vet.Med.Sci. 76:1157-1160, 2014. (査読有)

西野佳以、齋藤敏行「ストレス性脳機能障害におけるウイルス持続感染の影響」京都産業大学先端科学技術研究所所報、(2014.7.1) 第13号、69-80。(査読無)

齋藤敏行、西野佳以「ストレス性脳機能障害におけるウイルス持続感染の影響」京都産業大学先端科学技術研究所所報、(2013.7.1) 第12号、93-99。(査読無)

〔学会発表〕(計7件)

河北尚輝、大和慎治、藤田英里香、小野隆祐、宮脇勇作、齋藤敏之、本田知之、西野佳以：ボルナ病ウイルス感染初代神経培養細胞におけるコルチコステロンの影響。第63回日本ウイルス学会、2015.11.22-24「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」

Yoshii Nishino, Masaru Murakami, Masayuki Funaba: Expression and role of the TGF- family in glial cells infected with Borna disease virus. 第63回日本ウイルス学会、2015.11.22-24「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」

西野佳以：ウイルスの基礎と診断法、持続感染する神経ウイルスの紹介。第7回ELBION技術研究会、2015.11.13「(公財)京都高度技術研究所(京都府・京都市)」【招待講演】

西野佳以、河北尚輝、大和慎治、小野隆祐、宮脇勇作、本田知之、齋藤敏之：ボルナ病ウイルス感染初代神経培養細胞における副腎皮質ホルモンの影響。第158回日本獣医学会、2015.9.7-9「北里大学(青森県・十和田市)」

河北尚輝、大和慎治、小野隆祐、宮脇勇作、本田知之、齋藤敏之、西野佳以：ボルナ病ウイルス感染神経細胞初代培養における副腎皮質ホルモンの影響。第8回日本ボルナウイルス研究会、2015.3.24「京都産業大学(京都府・京都市)」

染谷梓、福島涼子、吉田倫子、棚橋靖行、Tangmunkhong Prapeuk、飯塚玲子、平見博、松田敦志、高橋俊一、栗田吾郎、木村享史、瀬尾美鈴、舟場正幸、西野佳以：東京近郊のイエネコにおけるボルナ病ウイルス感染疫学調査。第7回日本ボルナウイルス研究会、2014.3.26「京都大学(京

都府・京都市)」

齋藤敏之、市川みなみ、小野隆祐、西野佳以：脳におけるTimm染色法の再検討。第156回日本獣医学会 2013.9.20「岐阜大学(岐阜県・岐阜市)」

〔図書〕(計1件)

西野佳以、ボルナ病ウイルス感染症、感染症症候群(第2版)上 病原体別感染症編。IV.ウイルス感染症 RNAウイルス感染症。別冊日本臨床 pp.506-509 新領域別症候群シリーズ No.24. 2013.

〔その他〕

京都産業大学生命科学研究科 教員紹介 http://www.kyoto-su.ac.jp/graduate/g_ls/kyoin/nishino.html

京都産業大学総合生命科学部 教員一覧 <http://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/nls/nishino-yoshii.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野佳以 (NISHINO, Yoshii)
京都産業大学・総合生命科学部・准教授
研究者番号：00271544

(2) 研究分担者

齋藤敏之 (SAITO, Toshiyuki)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：10162215

(3) 連携研究者

舟場正幸 (FUNABA, Masayuki)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40238655