

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14885

研究課題名(和文) デングウイルス感染マウスモデルを用いた血漿漏出機序と骨髄抑制機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of pathogenic mechanisms of vascular leakage and bone marrow suppression in dengue virus mouse model

研究代表者

黒須 剛 (KUROSU, TAKESHI)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：70432432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：デング出血熱は血小板減少症と血漿漏出を特徴とする。重症化機序の解明を目指し、独自に開発した数種類のデングウイルス感染重症化マウスモデルを用いて病原機序を解明した。その結果、重症化の過程では1)マクロファージ系の異常な活性化。2)TNF- α などの炎症性サイトカインの高産生。3)血管内皮細胞における保護因子と増悪因子の攻防。4)病態末期におけるサイトカインストームによる多臓器不全が起こっており、それぞれのステップに關与する因子群を同定した。また骨髄においては赤血球-巨核球系前駆細胞の障害が起こっていると結論した。さらにマウスモデルの応用のため、治療用抗体の防御能試験を行い、その有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：Dengue hemorrhagic fever is characterized by thrombocytopenia and plasma leakage. We tried to elucidate the mechanism of severity, and elucidated the mechanism of pathogenesis using several kinds of dengue virus infection mouse models. As a result, in the following process occurs during the process of severity 1) abnormal activation of the macrophage. 2) Excessive production of inflammatory cytokines such as TNF- α . 3) Battling protection factors and exacerbating factors in vascular endothelial cells. 4) Multiple organ failure due to cytokine storm occurred at the end of the disease state, and factors involved in each step were identified. In the bone marrow, it was concluded that the erythrocyte - megakaryocyte precursor cell disorder has occurred. Furthermore, for the application of mouse model, the protective ability test of the therapeutic antibody was carried out and its effectiveness was shown.

研究分野：ウイルス学

キーワード：デング出血熱 マウスモデル 出血熱 サイトカインストーム 血症漏出 フラビウイルス 重症感染症 デングウイルス

1. 研究開始当初の背景

デングウイルス感染症は世界中で毎年5千万人が感染し、25万人の重症化例をみる蚊媒介性の重要な疾患である。血管透過性の亢進と血小板減少症を特徴とし、重症化すると血漿漏出により出血を伴うショック症状に陥る。特徴的なのは、二回目感染以降により重症化することであり、中和能のない抗体による抗体依存性感染増強効果(ADE)が原因と考えられている。その病原機序は明らかではなく、効果的な治療法・予防法はなかった。デングウイルスの重症化には宿主因子が直接に関わると予想されているため、病原機序の解明は動物モデルなしには実現しない。これまで適切な動物感染モデルが無く、研究が遅れている原因となっていた。研究開始当初、血漿漏出と血小板減少症、骨髄抑制(巨核球と赤芽球島の消失)を観察できる新規マウスモデルの開発に成功していた。本研究は、これらの系を使用して、デングウイルス重症化の病態機序を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、上述の系を使用して、デングウイルス重症化の病態機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

血漿漏出機序解明

IFN- α / β / γ レセプターダブルノックアウトマウス(R dKO)にデングウイルスを接種し、抗サイトカイン抑制因子を導入し、その効果を判定する。またこれら宿主因子を阻害する条件で、宿主因子の反応を網羅的に解析する。

血小板減少機序解明のための研究

IFN- α / β / γ レセプターダブルノックアウトマウス(R dKO)にキメラデングウイルスを接種し、骨髄など各種臓器から得られたサンプルを用いて宿主因子の解析を行う。

4. 研究成果

血漿漏出機序の解明

血漿漏出は抗サイトカイン血症によって起こっていると予想から、機序を解明するため、抗 TNF- 中和抗体、抗 IL-6 抗体を3型デング

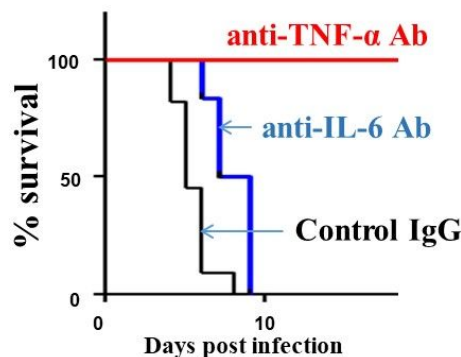


図1

グウイルス P12/08 株感染後に導入したところ、抗 TNF- 抗体によりマウスが生存した(図1)。

抗 TNF- 抗体の防御効果を調べるため、最も血漿漏出の激しかった肝臓と腸管での血漿漏出効果を調べた。その結果両臓器とも抗 TNF- 抗体により血漿漏出が抑えられることが明らかになった(図2)。このことからマウスの防御効果は、一つには血漿漏出を抑えたことによると結論された。

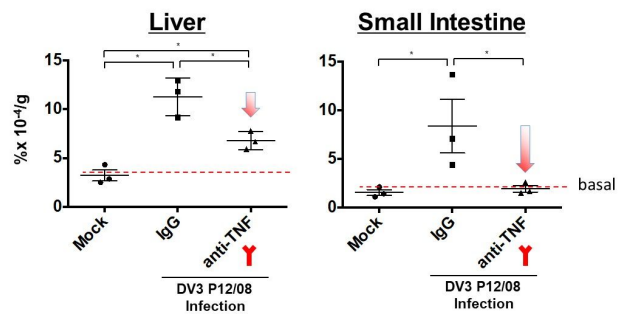


図2

血漿漏出と重症化に係る宿主因子を探索するために、感染後の宿主因子の遺伝子発現量をマイクロアレイにより解析した。その際感染後に抗 TNF- 抗体もしくは抗 IL-6 抗体

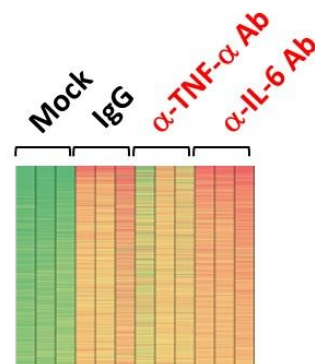


図3

を導入し、その影響を受ける遺伝子群を探索した。各群3匹のマウスを用いた結果、感染により変動する遺伝子、抗 TNF- 抗体により変動が抑えられ、抗 IL-6 抗体によ

ては変動抑制が認められない遺伝子群が明らかになった(図3)。これまでの解析から重症化のステップは以下の様に進むことが明らかになった。1) デングウイルス感染によるマクロファージ系細胞の異常な活性化。2) TNF- などの炎症性サイトカインの高産生。3) 血管内皮細胞における保護因子と増悪因子の攻防。4) 病態末期におけるサイトカインストームによる多臓器不全。4) の機序に関してはより詳細な機序が明らかになった。

病原機序に関する研究

重症化にいたるマウス体内でのウイルス動態について調べるため、脳に指向性があり致死感染を起こす2型デングウイルス P04/08 株を接種して、病態末期に脳で検出されたウイルスと接種したウイルスの遺伝子配列解

析を行った。このモデルでは感染初期-中期（感染6日目）には比較的全身の臓器からウイルスが検出される（図4a）。感染後期（14日目）ではほとんどの臓器でウイルス増殖が抑制される一方、脳と胸腺でウイルス増殖が認められる（図4b）。血清中のウイルスが一番多いのは感染6日目（図4c）である。ウイルスは一旦各種臓器で増殖した後、脳や胸腺以外の臓器ではウイルスがクリアランスされていると考えられ、血液中のウイルス量も低下する。このモデルでは死の原因は脳でのウイルス増殖と考えられ、体内増殖中にウイルスが脳で増えやすいように適応したと考えられた。しかし、脳と胸腺から得られたウイルスの遺伝子配列解析を行ったところ、脳から分離されたウイルスには脳に特徴的な配列が見つからなかった（表）。

Table Amino acid comparison among input DV2P04/08 and progeny viruses from mouse

Proteins	Amino acid position ^a	P04/08	B3 Brain	B6 brain	B6 thymus	16681
E	456	T	T	I*	T/I*	T
	643	S	S	N*	N*	S
	774	Q/E*	Q	Q	Q	Q
NS1	813	A	A	S*	S*	S*
	847	T	T	A*	T/A*	T
	932	D	D	D	D/N*	D
	949	K	K	R*	K/R*	K
NS3	1595	T	T	N*	T/N*	A*
	1723	R	R/K*	R	R/K*	R
	1730	E	E	E	E/K*	E
NS5	2494	G	G/D*	G	G/D*	G
	3125	H	H	H/R*	H/R*	H
	3135	Q	Q	Q/H*	Q/H*	Q
	3356	V	V	V/A*	V/A*	A*

^a: Amino acid position in polyprotein of DENV-2 16681 strain.

*: Minor amino acid variations different from those of the parental DV2P04/08 polyprotein.

以上のことから、ウイルスの体内進化によってウイルスが脳に侵入し、致死性を発揮したのではないことが明らかになった。体内からはウイルス排除に成功しつつあるが、おそらく免疫的な理由により脳への侵入を許し、一旦脳へ侵入したウイルスの排除に失敗したと考えられた。

血小板減少機序解明のための研究
感染マウス骨髄から得られた RNA を用いた RNAseq により、GATA-1 の発現低下など骨髄細胞の分化に関する転写因子の異常が見つかった。このことは骨髄による巨核球と赤芽

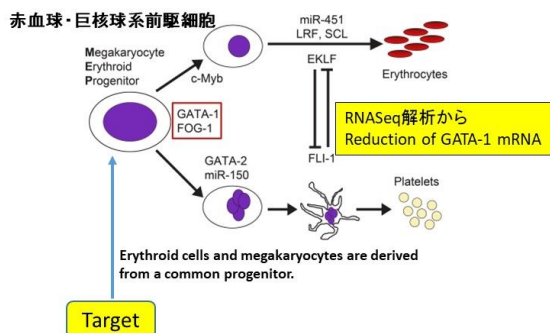


図5

球の減少は赤血球・巨核球系前駆細胞の減少が原因であることが予想された。この原因については以下の3つの可能性が考えられ、現在検討中である。

Q1. 感染による細胞死

Q2. 肝臓障害による TPO 産生低下

Q3. 活性化マクロファージによる血球貪食

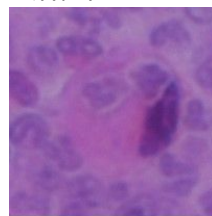
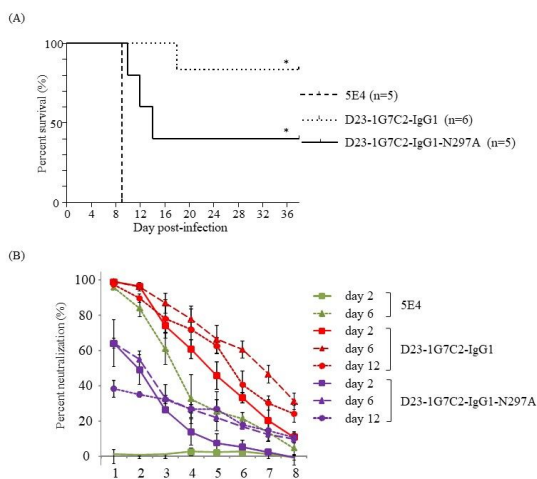


図6

図6のような血球貪食像も認められることから G3 の可能性など、マクロファージの活性化がなんらかの役割を果たしているのではないかと考えられた。

マウスモデルの応用

本マウスモデルは治療薬やワクチンの開発に応用可能であると考えられ、ヒト患者由来の抗 Dengue ウイルスモノクローナル抗体を用いて防御効果について試験を行った。中和能を示す抗体 D23-1G7C2-IgG1 とこの抗体に N293A の変異を導入した抗体 D23-1G7C2-IgG1-N297A の比較解析を行った。N297A 変異により Dengue ウイルス感染特的な現象である抗体依存性感染増強効果 (ADE) が防げる。N297A 抗体はマウスでの防御効果が減弱していた (図7A)。マウスの中和血清 (マウス由来のものとはヒト型抗体の総和) (図7B) とヒト型抗体の減少程度 (図7C) を調べることで、その原因を明らかにした。その結果 N297A 変異を持つ抗体はマウス個体では急速に分解されていることが明らかになった。また一方感染6日目では、むしろコントロール抗体 (5E4) を導入しているマウスより中和抗体価が上がっていないことが明らかになった。これまでの培養細胞で試験していただいただけでは判定できなかった治療薬としての抗体の性状を判定することができた。今後のこの分野の研究に役立つと考えられた。



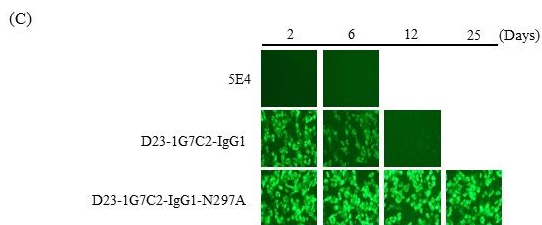


図7

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 3 件)

1. Ramadhany R, Hirai I, Sasaki T, Ono K, Ramasoota P, Ikuta K, *Kurosu T. Antibody with an engineered Fc region as a therapeutic agent against dengue virus infection. *Antiviral Res.* 124:61-68. 2015

2. Phanthanawiboon S, Limkittikul K, Sakai Y, Takakura N, Saijo M, Kurosu T*. Acute Systemic Infection with Dengue Virus Leads to Vascular Leakage and Death through Tumor Necrosis Factor- α and Tie2/Angiopoietin Signaling in Mice Lacking Type I and II Interferon Receptors. *PLoS One.* 11:e0148564. 2016

3. Phanthanawiboon S, Pambudi S, Omokoko MD, Hanabara K, A-Nuegoonpipat A, Kamitani W, Ikuta K, *Kurosu T. Construction of a high-yield dengue virus by replacing nonstructural proteins 3-4B without increasing virulence. *Biochem Biophys Res Commun.* 495(1):1221-1226. 2018

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Kurosu T, Phanthanawiboon S, Sakai Y, Limkittikul K, Saijo M. Acute systemic infection with dengue virus leads vascular leakage and death through TNF- α and Tie2/Angiopoietin signaling in mice. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡市, 2015

2. Priya Dhole, Emi E. Nakayama, Supranee Phanthanawiboon, Kriengsak Limkittikul, Kazuyoshi Ikuta, Tatsuo Shioda, Takeshi Kurosu Sequence analysis of Dengue Virus Type2 in Brain and Thymus of Infected Interferon Receptor KO mice: Implication for Neuroinvasiveness. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡市, 2015

3. 黒須 剛, Supranee Phanthanawiboon,

坂井祐介, Kriengsak Limkittikul デングウイルス感染マウスモデルを用いた重症化機序の解析 第 158 回日本獣医学会学術集会 十和田市, 2015

4. Kurosu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Saijo M. Transcriptome analysis using a fatal mouse model for severe dengue. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌市 2016

5. Kurosu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Saijo M. Transcriptome analysis using a fatal mouse model for severe dengue. 第 57 回日本熱帯医学会大会 東京 2016

6. Kurosu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Watanabe S, Saijo M. The dynamics of disease progression in severe dengue. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪 2017

7. Kurosu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Watanabe S, Saijo M. The dynamics of disease progression in severe dengue. 第 58 回日本熱帯医学会大会 東京 2017

8. Kurosu T The dynamics of disease progression in severe dengue, Joint International Tropical Medicine Meeting, タイ国バンコク 2017

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒須 剛 (KUROSU TAKESHI)
国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任
研究官
研究者番号：70432432

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

奥崎 大介 (OKUZAKI DAISUKE)
大阪大学微生物病研究所・助教
研究者番号：00346131