

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K09994

研究課題名(和文)麻疹ウイルス感染実験系をモデルとした神経系ウイルス感染症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for neuroviral infections using an experimental measles virus infection system as a model

研究代表者

綾田 稔 (AYATA, Minoru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90222702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルス感染実験系をモデルとした神経系ウイルス感染症の特異的治療法の開発を目指して、麻疹ウイルスの脳内感染拡大のメカニズム、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)株に生じた変異の影響を明らかにしようと試みた。2分節型の組換えウイルスを作製して検討したところ、SSPE株のF遺伝子の変異を有すれば通常の非分節型のウイルスと同様にハムスターに感染しうるが、病原性の低下を示唆する結果が得られた。また、P遺伝子にコードされたP、V、C蛋白に生じた変異は脳内での感染拡大に大きな影響は生じておらず、自然免疫に対する抵抗性を維持していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の根治的治療法は無く、また神経系のウイルス感染症の治療も限られている。麻疹ウイルスが原因であるSSPEの治療法を開発することは、類似の神経系のウイルス感染症の治療につながる。麻疹ウイルスの変異とその機能の変化を明らかにすることは、新規治療法の開発に貢献すると考えられ、また、麻疹ウイルスをベクターとして用いる際の有益な情報を提供し、遺伝子治療やワクチン開発の進展と安全性の担保に寄与すると思われる。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a specific treatment for neuroviral infections using the experimental measles virus infection system as a model, we attempted to clarify the mechanism of spread of measles virus in the brain and the effects of mutations in the subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) strain. We have produced two-segmented recombinant viruses and found if the F gene has the mutations appeared in the SSPE strain, they can infect hamsters as well as the normal non-segmented viruses, but may be slightly less virulent. In addition, mutations in the P, V, and C proteins encoded by the P gene, which had not been previously analyzed, did not have a significant effect on the spread of infection in the brain, indicating that resistance to innate immunity was maintained.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 麻疹ウイルス 亜急性硬化性全脳炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は、麻疹ウイルスの脳内持続感染によっておこる、極めてまれな小児の予後不良の疾患である。SSPE に対する特異的、根治的な治療法は開発されておらず、同様に、神経系のウイルス感染症に対する新規治療法の開発が求められている。通常麻疹ウイルスとの比較研究から、SSPE 患者より分離された麻疹ウイルスには、ハムスターなどの実験動物を死滅させる変異が生じていることが脳内への感染実験により明らかにされた。組換え麻疹ウイルスを用いた研究により、脳内での感染拡大、神経病原性に関与する変異を特定することができるようになった。これまで解析されていない変異と機能との関連を明らかにし、得られた知見を応用することで新規治療法の開発につながるのではないかと期待された。

2. 研究の目的

組換え麻疹ウイルスを用いて、亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の脳内感染拡大のメカニズムを明らかにし、SSPE 株に生じた特徴を利用した組換えウイルスを重感染させることによって、実験動物感染実験モデルで SSPE を治療することを最終的な目的とした。具体的には、(1) ゲノムの一部を欠損させたウイルスを作製し、増殖させる系の確立、(2) 分節型のウイルスを作製して、通常ウイルスと同様の性質を持つかどうか、特に神経病原性の有無についての解析、(3) SSPE 株に特徴的な変異の中で、これまで明らかにされていない変異の影響に関する解析、を目指した。

3. 研究の方法

(1) ゲノムの一部を欠損させた組換え麻疹ウイルスの作製

遺伝子を欠損させたウイルスを作製するため、プラスミドのトランスフェクション、もしくはレンチウイルスベクターのシステムを用いて各種遺伝子発現系を作製し、それぞれの蛋白発現細胞の作製を行った。これらの細胞を用いて欠損型ウイルスの作製を試みた。

(2) 2本のゲノムからなる組換え麻疹ウイルスの作製

欠損型ウイルスを作製する代わりに、2本のゲノムからなるウイルスの作製を試みた。N, P, M, L 遺伝子からなるゲノムと、F, H, および蛍光蛋白 (hrGFP) 遺伝子からなるゲノムよりウイルスを作製した。F 遺伝子に関しては、SSPE 大阪 1 株、SSPE 大阪 2 株、あるいは野生型の IC323 株の 461 番目のアミノ酸をイソロイシンに変化させた F 蛋白を発現するよう改変したものも作製した。既報に従いプラスミドを BSRT7/5 細胞へトランスフェクションした後、B95a 細胞との共培養により、組換えウイルスの回収を行った。

(3) P 遺伝子の変異と V, C 蛋白発現欠損ウイルスの作製

P 遺伝子をクローン化した後、合成オリゴヌクレオチドを用いて V 蛋白もしくは C 蛋白の発現を欠損させる変異を導入し、それぞれの P 遺伝子をもつウイルスを作製した。P 遺伝子は、IC323 株、Edmonston-tag 株、SSPE 大阪 1 株、SSPE 大阪 2 株を用い、P 遺伝子以外については、IC323 株を基本として、SSPE 大阪 1 株、SSPE 大阪 2 株の F 蛋白の細胞外ドメインを発現する F 遺伝子を用いた。既報に従いプラスミドを BSRT7/5 細胞へトランスフェクションした後、B95a 細胞との共培養により、組換えウイルスの回収を行った。

(4) V 蛋白の機能解析

SSPE 由来の麻疹ウイルスの機能を解析するため、IC323 株、SSPE 大阪 1 株、SSPE 大阪 2 株、および Edmonston-tag 株について、レンチウイルスを用いてそれぞれの V 蛋白を発現する細胞を作製し、I 型インターフェロンに対する応答性を野生型の IC323 株と比較解析した。すなわち、STAT1/STAT2/IRF9 複合体領域を含むレポーター遺伝子 (ISRE-Luc) ならびに Renilla luciferase をトランスフェクトし、Dual luciferase assay により I 型インターフェロン応答性を調べ、樹立した細胞株を IFN- γ で 16 時間刺激後、STAT1/STAT2/IRF9 複合体の標的遺伝子である 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2 mRNA の発現量の相対変化を qRT-PCR により調べた。

(5) ハムスター・マウスへの感染実験

3 週齢メスのゴールデンハムスターの脳内に組換え麻疹ウイルスを接種し、体重の変化、神経学的徴候を観察し、発症率、死亡率を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子欠損型組換え麻疹ウイルスの作製

感染後に増殖する能力を失ったウイルスを作製するため、いずれかの遺伝子を欠く遺伝子欠

損型組換え麻疹ウイルスの作製を試みた。プラスミドのトランスフェクションと薬剤の選択による方法により H 蛋白発現細胞を、レンチウイルスベクターを用いる方法により N 蛋白発現細胞を作製することができた。これらの細胞とそれぞれの遺伝子を欠損させたウイルスゲノムをもつプラスミドを用いて欠損型のウイルスの作製を試みている。

(2) 2本のゲノムからナウ分節型組換え麻疹ウイルスの作製とその性状

本来麻疹ウイルスは、N、P、M、F、H、Lの6つの遺伝子からなる1本鎖、非分節型のゲノムを有するウイルスであるが、人為的に分節型の組換え麻疹ウイルスを作製することができると報告されている。N、P、M、L遺伝子からなるプラスミドと、F、H遺伝子、およびマーカ-としての緑色蛍光蛋白をコードするhrGFP遺伝子からなるプラスミドより、2分節からなるウイルスの作製を試みた。その結果、これまでに作製された全て野生型のIC323株に相当する2分節型のウイルス(IC/NPML+FHhrGFP)、F遺伝子のみがSSPE大阪1株に相当する2分節型のウイルス(IC/NPML+F[OSA1]HhrGFP)に加えて、F遺伝子のみがSSPE大阪2株に相当する2分節型のウイルス(IC/NPML+F[OSA2]HhrGFP)を作製することに成功した。ウイルスを作製する際に、細胞融合の出現がより早く観察されたことから、ウイルスの複製が1本鎖のゲノムの場合よりも速いことが示唆された。作製された2種類のウイルスについて、in vitroの感染実験で比較したところ、IC/NPML+F[OSA1]HhrGFPと同様、IC/NPML+F[OSA2]HhrGFPはVero細胞に感染して細胞融合を引き起こすことが示された。

分節型組換えウイルス IC/NPML+F[OSA1]HhrGFP をハムスターの脳内に接種し病原性の有無を検討した以前の結果では、感染3日後にハムスターは過敏、けいれん等の神経徴候を呈して発症し、3-5日後に死亡した。一方、IC/NPML+F[OSA2]HhrGFP をハムスターの脳内に接種したところ、感染3-4日後に発症したが、その後回復傾向を示し、1匹を除いて後遺症を残しながらも生残した。

さらに、IC323株のF遺伝子のアミノ酸の一部を置換したウイルス(IC/NPML+F[T4611]HhrGFP)を作製したところ、Vero細胞に感染して細胞融合を引き起こすことが確認された。このことから分節型のウイルスは、細胞指向性については非分節型のウイルスと同じ性質を有することが確認された。また、IC/NPML+F[T4611]HhrGFPは、今回接種したウイルス量では発症が見られなかった。ウイルス産生量が低いことが原因である可能性もあるが、分節型のウイルスの場合には非分節型のウイルスよりも病原性が低下している可能性が示唆された。

(3) SSPE由来麻疹ウイルスのP遺伝子の変異と機能との関連

P遺伝子の変異とインターフェロン応答への影響を検討するため、麻疹ウイルスIC323株、ワクチン由来でインターフェロン応答の欠損が報告されているEdmonston-tag株、SSPE大阪1株、およびSSPE大阪2株よりP遺伝子を分離して、プラスミドへのクローン化を行った。P遺伝子には、P、V、Cの3種類の蛋白がコードされているが、これらのプラスミドよりP蛋白のみを発現するプラスミド、一部の株についてはV蛋白のみを発現するプラスミドを作製した。

また、SSPE大阪1株またはSSPE大阪2株のF蛋白をもち、P遺伝子をSSPE株に置き換えた組換えウイルスを作製して、ハムスターにおける神経病原性を検討した。SSPE株のF蛋白の細胞外ドメインを持つウイルスは、以前の実験結果と同様、脳内接種3-4日後に過敏・けいれん等の徴候を呈して発症し、数日以内に死亡した。同様に、SSPE株由来のF蛋白をもちP遺伝子をIC323株からSSPE大阪1株もしくはSSPE大阪2株に置換したウイルスを脳内接種した場合も、脳内接種3-4日後に過敏・けいれん等の徴候を呈して発症し、数日以内に死亡した。このことから、SPE株のP遺伝子には多くの変異が生じているものの、その機能は維持されていることが示された。

SSPE株のP遺伝子に重複してコードされるV蛋白やC蛋白の機能について更に検討した。SSPE大阪1株またはSSPE大阪2株のF遺伝子をもち、V蛋白を発現しないSSPE株のP遺伝子に置換した組換えウイルスを作製してハムスターに脳内接種したところ、IC323株のP遺伝子のV蛋白発現欠損ウイルスやEdmonston-tag株のP遺伝子をもつウイルスと同様、脳内接種3-4日後に神経学的徴候を呈して発症したが、その後急速に回復して生残した。このことから、V蛋白が有するインターフェロンの誘導抑制や宿主の抗ウイルス応答に対抗する機能がハムスター脳内においても機能していることが示唆された。また、SSPE株のP遺伝子のC蛋白発現を欠損させたウイルスを作製してハムスターに脳内接種した場合、脳内接種3-4日後に神経学的徴候を呈して発症し、V蛋白欠損の場合と同様に回復傾向が認められた。生残確定までに神経徴候の遷延が生じたり、最終的に死滅したりするハムスターも観察されたが、SSPE株のC蛋白の機能も保持されていると考えられた。

SSPE株のV遺伝子の機能について、in vitroにおけるI型インターフェロンに対する応答性を野生株のIC323株と比較解析した。Dual luciferase assayによりI型インターフェロン応答性を調べたところ、野生株のIC323株と比べて30%程度活性が低かったものの、SSPE大阪1株、SSPE大阪2株共に応答が見られた。また、IFN- γ で16時間刺激後の2'-5'-oligoadenylate synthetase 2 mRNAの発現量の相対変化をqRT-PCR法により調べた結果についても同様であった。これらの結果はin vivoのハムスターの感染実験結果と一致すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島裕正、綾田稔
2. 発表標題 Regulation of interferon signaling by the V proteins from the Osaka-1 and Osaka-2 SSPE strains of measles virus
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小島 裕正 (KOJIMA Hirotada) (40336772)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	
研究分担者	瀬戸 俊之 (SETO Toshiyuki) (60423878)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	桑村 充 (KUWAMURA Mitsuru) (20244668)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------