

研究種目：基盤研究 (A)
研究期間：2005～2008
課題番号：17209016
研究課題名（和文） 受容体 SLAM 発現マウスと組換え麻疹ウイルスを用いた麻疹の病態解明
研究課題名（英文） Analysis of measles pathogenesis using the mouse model expressing measles virus receptor SLAM and recombinant viruses
研究代表者
柳 雄介 (YANAGI YUSUKE)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：40182365

研究成果の概要：

麻疹（ましん、はしか）は発熱、発疹、免疫抑制、時に脳炎を起こす小児の重要なウイルス感染症である。麻疹ウイルスが病気を起こすメカニズムを明らかにするために、ウイルスの受容体であるヒト SLAM 分子を発現する遺伝子改変マウスを作製した。このマウスは、ヒトで見られる麻疹ウイルスの感染、免疫抑制作用、毒力を非常によく再現し、優れた動物モデルとなることが示された。様々な組換えウイルスを感染させることにより、病態の解析が容易となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2006年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2007年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2008年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
年度			
総計	39,000,000	11,700,000	50,700,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス、受容体、SLAM、動物モデル、組換えウイルス

1. 研究開始当初の背景

麻疹は小児の代表的なウイルス感染症で、今なお発展途上国を中心に毎年 3000 万人の患者と 100 万人の死者を出している。発熱、皮疹などの症状に加え、リンパ球の減少と免疫抑制を起こすことが麻疹の特徴である。また、感染後脳炎や持続感染による亜急性硬化性全脳炎を起こすことが知られている。しか

し、麻疹に伴う病態発生のメカニズムは十分理解されていない。病態の解明を妨げている大きな要因は、使い易い小動物モデルが存在しないことである。

2. 研究の目的

われわれは先に、麻疹ウイルスが免疫系細胞に発現しているヒト SLAM (CD150) を受容体として細胞に感染することを明らかにし

た。マウス SLAM は受容体として機能しないが、マウスの培養細胞にヒト SLAM を発現させると麻疹ウイルスはマウス細胞に感染できるようになる。SLAM は免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する分子であり、その V ドメインが受容体機能に重要である。この結果に基づき、麻疹の小動物モデルとして、マウス SLAM 遺伝子をヒト SLAM 遺伝子で置き換えた SLAM ノックインマウスを作製し、麻疹ウイルスの感染と増殖、免疫抑制、宿主応答などの病態のメカニズムを細胞および分子レベルで解明することを目的とする。さらに、種々の組換え麻疹ウイルスを作製し、培養細胞および上記の動物モデルに感染させることにより、病原性の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 麻疹ウイルス感染の動物モデルとして、麻疹ウイルス受容体機能を担うヒト SLAM の V ドメインをノックインした C57BL/6 マウスを作製する。このマウスに、正常マウスと比べて免疫機能に違いがないか確認する。

(2) 各ウイルス蛋白質に様々な変異を導入した組換え麻疹ウイルスを作製し、それらの変異ウイルスの性質（複製、細胞変性効果、粒子形成）を、培養細胞を用いて解析する。これらのウイルスはマウスでの実験にも用いる。

(3) SLAM ノックインマウスにおける麻疹ウイルス感染を免疫染色、緑色蛍光色素発光、ウイルス感染価、PCR 等を用いて評価する。

(4) I 型インターフェロン (IFN) は、宿主の抗ウイルス応答に重要な役割を果たしている。IFN 受容体ノックアウトマウスと交配した SLAM ノックインマウスで上記の麻疹ウイルス感染実験を行い、SLAM ノックインマウスでの結果と比較することにより、麻疹ウイルスのコントロールや病原性における IFN の

役割を明らかにする。

(5) ノックインマウスを作製する実験と並行して SLAM ノックアウトマウスを作製し、SLAM シグナル、サイトカインの産生（特に Th1/Th2 応答と関連が深い IL-4、IFN- γ ）、抗体産生などについて解析し、正常マウスと比較する。

4. 研究成果

(1) SLAM ノックインマウスは免疫細胞（胸腺細胞、T および B 細胞、樹状細胞）にヒト型 SLAM を発現していた。野生型マウスの脾臓細胞に麻疹ウイルスは全く感染しなかったが、SLAM ノックインマウス由来の脾臓細胞には感染し、ウイルス増殖を認めた。in vivo では、腹腔内、経鼻、静脈内のいずれの経路からの接種でも感染が成立しなかった。そこで、ウイルス抵抗性に重要な役割をしている IFN 系に欠陥のある I 型 IFN 受容体欠損マウスと交配し、麻疹ウイルスを感染させた。その結果、胸腺を除く全身の免疫組織でウイルスが増殖した。麻疹ウイルス感染マウスの脾臓細胞の絶対数に大きな変化は見られなかったが、T 細胞数は有意に減少していた。また、マイトジェンに対する T 細胞増殖能は低下していた。さらに、CD4+T 細胞で TH2 タイプのサイトカインの産生が上昇していた。感染マウスでは遅延型過敏反応が減弱しており、リンパ球の浸潤がほとんど起こらなかった。T 細胞減少の原因を明らかにするために、全身の免疫臓器における T 細胞、B 細胞の絶対数を測定したが、脾臓以外で大きな変化は認められなかった。また、免疫細胞におけるアポトーシスの亢進は認められなかった。制御性 T 細胞数の増加は認められなかった。本マウスで観察される免疫抑制には IL-10 のような抑制性サイトカインが関与していることが考えられた。本マウスに麻疹ウイルス野生株とワクチン株を感染させると、野生株の

みが増殖することができた。すなわち、本マウスはウイルスのビルレンスを調べるためのモデルとしても有用である。野生株とワクチン株の組換えウイルスを作製し、感染実験を行ったところ、ワクチン株の RNA ポリメラーゼをコードしている遺伝子（P 遺伝子および L 遺伝子）を持つ組換えウイルスは、培養細胞でもマウスモデルにおいても増殖が著しく減弱することがわかった。SLAM ノックインマウスは、I 型 IFN 受容体欠損マウスと交配させることにより、ヒトの感染における麻疹ウイルスの免疫細胞へのトロピズム、免疫抑制作用、ビルレンスを非常によく再現し、麻疹の病態を解析するための優れた小動物モデルになることが分かった。

(2) ヒトに近い動物モデルとしてサルを使った感染実験を行った。緑色蛍光色素を発現する組換え麻疹ウイルスを接種することにより、サル体内における主要なウイルス感染細胞は SLAM 陽性のリンパ球および樹状細胞であることが明らかになった。感染後期には SLAM を発現していない上皮細胞でもウイルス感染が認められた。

(3) 高率かつ安全に組換え麻疹ウイルスを回収する方法を確立し、それを応用して分節ゲノムをもつ組換え麻疹ウイルスを作製することに成功した。また、麻疹ウイルスの M 蛋白質、F 蛋白質の非翻訳領域がそれぞれの蛋白質量を調節し、ウイルスの複製や細胞傷害性に寄与することを明らかにした。様々な組換え麻疹ウイルスを作製することにより、極性上皮細胞上の受容体と結合している麻疹ウイルス H 蛋白質のアミノ酸残基、麻疹ウイルス M 蛋白質の粒子形成や膜融合に及ぼす影響、麻疹ウイルス受容体 SLAM の糖鎖が感染に及ぼす影響、ワクチン株の弱毒化のメカニズムなどを明らかにした。

(4) SLAM ノックアウトマウスを用いた実験

により、SLAM-SAP-Fyn を介したシグナルは CD4+T 細胞の TH2 タイプのサイトカイン産生には不可欠であるが、胚中心形成や抗体産生には関与していないことが明らかになった。したがって、SAP 欠損によって起こる免疫異常には SLAM が関与するものとしなないものがあることが分かった。

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 24 件)

- ① Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Hashiguchi T. Measles virus receptors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 329:13-30, 2009
- ② Takeda M, Ohno S, Tahara M, Takeuchi H, Shirogane Y, Ohmura H, Nakamura T, Yanagi Y. Measles viruses possessing the polymerase protein genes of the Edmonston vaccine strain exhibit attenuated gene expression and growth in cultured cells and SLAM knock-in mice. *J Virol*. 82:11979-11984, 2008
- ③ de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, McQuaid S, Yuksel S, Geijtenbeek TB, Duprex WP, Osterhaus AD. Predominant Infection of CD150(+) Lymphocytes and Dendritic Cells during Measles Virus Infection of Macaques. *PLoS Pathog*. 3:e178, 2007
- ④ Ohno S, Ono N, Seki F, Takeda M, Kura S, Tsuzuki T, Yanagi Y. Measles virus infection of SLAM (CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol*. 81:1650-1659, 2007
- ⑤ McCausland MM, Yusuf I, Tran H, Ono N, Yanagi Y, Crotty S. SAP Regulation of Follicular Helper CD4 T Cell

- Development and Humoral Immunity Is Independent of SLAM and Fyn Kinase. *J Immunol.* 178:817-828, 2007
- ⑥ Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol.* 87:2767-2779, 2006
- ⑦ Seki F, Takeda M, Minagawa H, Yanagi Y. Recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its haemagglutinin cannot use receptor CD46 as efficiently as that having the haemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. *J Gen Virol.* 87:1643-1648, 2006
- ⑧ Nakatsu Y, Takeda M, Kidokoro M, Kohara M, Yanagi Y. Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. *J Virol Methods.* 137:152-155, 2006
- ⑨ Takeda M, Nakatsu Y, Ohno S, Seki F, Tahara M, Hashiguchi T, Yanagi Y. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. *J Virol.* 80:4242-4248, 2006
- ⑩ Tahara M, Takeda M, Yanagi Y. Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus Edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol.* 79:15218-15225, 2005
- ⑪ Takeda M, Ohno S, Seki F, Nakatsu Y, Tahara M, Yanagi Y. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol.* 79:14346-14354, 2005
- ⑫ Takeda M, Ohno S, Seki F, Hashimoto K, Miyajima N, Takeuchi K, Yanagi Y. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res.* 108:161-165, 2005
- [学会発表] (計20件)
- ① 竹田誠、大野真治、田原舞乃、白銀勇太、柳雄介、ポリメラーゼ遺伝子は麻疹ウイルスEdmonston株の弱毒化を担っている、第56回日本ウイルス学会、2008年10月26日、岡山
- ② 大野真治、小野伸之、関文緒、竹田誠、柳雄介、ヒトSLAMノックインマウスの麻疹ウイルス感染の解析、第54回日本ウイルス学会、2006年11月21日、名古屋
- ③ Ohno S, Ono N, Seki F, Takeda M, Yanagi Y. Analysis of measles virus infection using human SLAM knock-in mice. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2006年9月6日. Awaji Island, Hyogo
- [その他]
ホームページ等
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/virus/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
柳 雄介 (YANAGI YUSUKE)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：40182365
- (2) 研究分担者
竹田 誠 (TAKEDA MAKOTO)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：40311401
- (3) 連携研究者
大野 真治 (OHNO SHINJI)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50419529