

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2005～2008（2007 を除く）  
 課題番号：17580272  
 研究課題名（和文） ボルナ病における中枢神経障害機構の解明  
 研究課題名（英文） Role of the neurological damages in the central nervous system on the Borna disease  
 研究代表者  
 西野 佳以（NISHINO YOSHII）  
 麻布大学・獣医学部・講師  
 研究者番号：00271544

## 研究成果の概要：

- (1) 成ならびに新生仔 F344 ラットにおける BDV 感染病態の解析を行い、BDV-CRNP5 株が CRP3 株に比べて病原性が高いことが示された。成 F344 ラット脳内の TGF- $\beta$ ファミリーの遺伝子発現を調べたところ、TGF- $\beta$  1 およびインヒビン/アクチビン $\beta$ E の発現がウイルス株に関わらず有意に増加し、インヒビン/アクチビン $\beta$  C が重篤な発症をした感染群においてのみ増加する傾向が認められた。また、TGF- $\beta$  1 受容体である ALK5 と T $\beta$ RII 遺伝子もウイルス株に関わらず発現増加していた。
- (2) 宿主に馴化することによる BDV ゲノムの変化を調べた。その結果、遺伝子の変化には 3 パターンが認められた。すなわち 1) ラットにおける継代では変化が認められなかったがマウスにおける継代では 100% 変化した（エンベロップ遺伝子における 2 遺伝子）、2) ラットにおける継代では 10% 前後のマイナー集団として変化した遺伝子が維持されるが、マウスにおける継代では 100% 変化した（L-ポリメラーゼ遺伝子における 1 遺伝子）、および 3) ラットにおける継代では継代数に従い変化した遺伝子がメジャー集団へと置き換わったが、マウスにおける継代では変化は認められなかった（L-ポリメラーゼ遺伝子における 1 遺伝子）。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	1,500,000	0	1,500,000
2006 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：獣医学・ウイルス学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学；応用獣医学

キーワード：ボルナ病、ボルナ病ウイルス、中枢神経疾患、遺伝子変異、行動異常、運動機能障害、実験感染

## 1. 研究開始当初の背景

ボルナ病ウイルス (BDV) は、ウマやヒツジに髄膜脳脊髄炎をおこし、神経疾患や時に

致死的な経過を引き起こすボルナ病の原因ウイルスである。ボルナ病は宿主動物の様々な要因が発症を規定していることが知られ

ていたが、ウイルス側要因についての研究は始まったばかりであり、ウイルス外被糖蛋白質 (GP) と L-ポリメラーゼが病原性に関与している可能性が挙げられていた (J. Virol., 76:8650, 2002)。また、本病は免疫応答依存性疾患と考えられていたが、免疫応答が未熟な新生仔ラットも感染後発症するウイルス株が報告されたところであり (上記論文)、ボルナ病における発症要因が何か再検討が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

研究全体では、BDV 感染における中枢神経障害機構の解明を目的とした。そのため、以下の2点について明らかにすることを目的とした。

(1) BDV 外被糖蛋白質と L-ポリメラーゼのアミノ酸配列の違いが、培養細胞におけるウイルス生活環、および感染動物における病態に影響を与えるか。

(2) BDV 感染の直接的な中枢神経障害と免疫応答による障害の相違点。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1) 実験動物における感染実験による感染病態の解析と脳内遺伝子の変動、(2) 動物における継代感染によるウイルス遺伝子の変化について、および (3) BDV 感染培養細胞におけるウイルス抗原の局在について解析を行った。

(1) ラットにおいて病原性が異なることが知られている 2 株の BDV (CRP3 株および CRNP5 株) を用いた。これらのウイルス株を、各種系統のラットに実験感染し、感染病態を比較解析した。

(2) Lewis ラットおよび SJL マウスにおいて CRP3 株および CRNP5 株の共通の親株である He80 (MDCK/He80 細胞由来) 株を継代し、CRNP5 株と CRP3 株において違いが認められた 4 遺伝子の出現頻度について解析した。

(3) CRP3 株および CRNP5 株感染ラット脳由来ウイルスを C6 細胞 (ラットグリオーマ細胞) に感染し、ウイルス抗原の局在を核主体、核と細胞質、細胞質主体に分類し解析した。その結果、両ウイルス株感染群において、核主体に分類される細胞の割合が一番多く、細胞質主体に分類される細胞は認められなかった。ただし、CRP3 株接種群のウイルスは、接種後の日齢にが大きくなるにつれて核主体が減少し核と細胞質に分類される細胞増加する傾向があった。

(3)については解析の途中であるため、4 の研究成果では割愛する。

## 4. 研究成果

### ・主な成果

(2) ラットにおける BDV 感染病態の解析

BDV 感受性系統である F344 ラットにおける感染病態の比較を行った。感染時の週齢を比較するために、新生仔と成ラット (3 週齢) に  $2 \times 10^3$  FFU の BDV-CRP3 株あるいは CRNP5 株を脳内接種し、8 週間の経過観察を行った。

その結果、CRNP5 感染新生仔では、震顫、四肢の麻痺、自発運動の低下などの症状を示した後に感染 20 日目までに致死的な病態になった。中枢神経系には脳炎は認められなかったが、脳内各領域には神経細胞変性が認められ、感染 12 日目までに大脳外套、海馬、および小脳で病変が認められ、感染 20 日目まで病変は進行した。大脳外套は有意な薄化が認められた。一方、CRP3 株感染新生仔では、観察期間中、明白な神経症状は認められず、グリオーシスおよび海馬歯状回顆粒神経細胞の脱落は認められたが、それ以外の中枢神経病変は認められなかった。3 週齢のラットへの感染では、CRNP5 株感染ラットのうち 8/9 匹が感染 26 あるいは 28 日目までに致死的な病態となったのに対し、CRP3 株感染ラットにおける経過はより遅く軽度であり、観察期間中致死的な発症をしたものは 9 匹中 1 匹もいなかった。病理学的には両ウイルスに感染したラットにおいて非化膿性髄膜脳炎が認められたが、その程度は CRP3 株感染ラットの方が軽度であった。脳内の炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ 、IL6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、および iNOS の遺伝子発現は BDV 感染により有意に増加し、IL-1 $\beta$ 、IL6、および iNOS はより重篤な発症をした CRNP5 株感染ラット群のほうが軽微な発症であった CRP3 株感染群よりも有意に高かった。次に主な TGF- $\beta$  ファミリーの遺伝子発現を調べたところ、TGF- $\beta$  1 およびインヒビン/アクチビン $\beta$ E の発現がウイルス株に関わらず増加しており、インヒビン/アクチビン $\beta$  C が重篤な発症をした感染群においてのみ増加する傾向が認められた。受容体としては、TGF- $\beta$  1 受容体である ALK5 と T $\beta$ RII 遺伝子発現がウイルス株に関わらず増加していた。細胞内メディエーターである Smad1~8 の遺伝子発現は、いずれも感染群において有意に上昇していた。

・ 国内外における位置づけとインパクト  
BDV 感染仔ラットにおいて脳内のサイトカインの発現量は報告されていたが、成ラット感染においては我々の報告がはじめてであった。また、TGF- $\beta$  ファミリーに焦点を絞り、そのレセプター、細胞内メディエーターまで発現を調べたのは我々が先駆けであった。

### ・今後の展望

成ラット感染では脳炎が起きているので、

今回発現が上昇していた遺伝子が脳内細胞由来であるのかあるいは炎症性細胞由来であるのかが不明であった。しかし、これまでに脳炎が起きない新生仔ラットにおける感染でも TGF- $\beta$  1 は増加しているの、おそらく、脳内細胞においても遺伝子発現が増加しているものと推測される。今後は、感染脳において、今回増加が認められたリガンド、レセプターを発現している細胞の同定が重要である。インヒビリン/アクチビン $\beta$  C と E はまだその機能やレセプターが不明である。特に、重篤な発症をした場合においてインヒビリン/アクチビン $\beta$  C の発現が上昇していたので、病態との関連を探求したい。

### (3) 宿主に馴化することによる BDV ゲノムの変化

BDV-CRNP5 株はマウス継代株であり、ラット継代株である CRP3 株とは同一の He80 株由来であるが、ラットにおける病原性は著しく高い。ところが、両ウイルス株間のゲノムの違いは、エンベロップ遺伝子内の 2 個所および L-ポリメラーゼ内の 2 個所、すなわち計アミノ酸変異を伴う 4 塩基のみであった。そこで、ウイルスの病原性に関わる可能性が高いこれらの 4 遺伝子変異がラットおよびマウスにおける継代の過程での出現頻度について解析した。ラットでの継代は 7 代 (CRP7 株) まで、マウスにおける継代はラットで 2 代した後に 5 代 (CRNP5 株) まで行い、共通の親株である He80 株からの継代数を 7 代に統一した。遺伝子の解析は、He80 株、ラット継代数 1,2,3,7 代 (CRP1, 2, 3, 7 株) およびマウス継代数 3, 5 代 (CRNP3, 5 株) について行った。

その結果、遺伝子の変化には以下の 3 パターンが認められた。すなわち 1) ラットにおける継代では変化が認められなかったがマウスにおける継代では 3 代目から 100% 変化した遺伝子 (エンベロップ遺伝子における nt3608 および nt3673 の変化)、2) ラットにおける継代では He80 株の遺伝子配列に共存して 10% 前後のマイナー集団として 1 代目から 7 代目まで変化が認められるが、マウスにおける継代では 3 代目から 100% 変化した遺伝子 (L-ポリメラーゼ遺伝子における nt7936)、および 3) ラットにおける継代では継代数が増加するに従い変化した遺伝子がメジャー集団へと置き換わったが、マウスにおける継代では 5 代継代しても変化は認められなかった遺伝子 (L-ポリメラーゼ遺伝子における nt8742)。今回遺伝子の比較を行った各継代株のうち、仔ラットへの致死的な病原性が認められたのは CRNP5 株のみであった (CRP3 株はウイルス力価が検出感度以下だったので解析せず)。

・ 国内外における位置づけとインパクト  
BDV のゲノムは非常に変異が少なく、各分離株において 5% 以下という報告がある。このようなウイルスにおいて、病原性に関わる遺伝子がどこかという情報は乏しく、これまでに我々が報告したラットにおいてはエンベロップと L-ポリメラーゼの各 2 個所 (2002 年) と他のグループが報告したマウスにおける p 蛋白質と L-ポリメラーゼ (2007 年) の各 1 ヶ所のみである。本研究は、BDV のラットにおける病原性に関与する可能性が高い遺伝子変異が、動物に馴化する際にどのようにして出現するのかを示す初めての報告であり、遺伝子変異の少ない BDV における変異の出現パターンを示す貴重な知見になると考える。

### ・ 今後の展望

本研究により、病原性に関わる可能性が高い遺伝子変異個所はエンベロップ遺伝子の 2 個所と L-ポリメラーゼ遺伝子の 1 ヶ所の計 3 個所であると推測された。今後は、これらの組換えウイルスを作製し、病原性に関与する遺伝子変異個所を同定すべきであろう。

### 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)

① Nishino, Y., Ooishi, R., Kurokawa, S., Fujino, K., Murakami, M., Madarame, H., Hashimoto, O., Sugiyama, K. and Funaba, M. Gene expression of the TGF- $\beta$  family in rat brain infected with Borna disease virus. *Microbes Infection*, in press. 査読有

② Okayama, S., Miura, N., Murakami, M., Funaba, M. and Nishino, Y. Changes in Borna disease virus genome with adaptation to host. *Microbes Infection*, in press. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

(1) 栗原磨美、西野佳以、黒河佐知子、斑目広郎：ボルナ病ウイルス CRNP5 株の感染は新生仔 F344 ラットに致死的な神経症状を引き起こす、第 141 回日本獣

- 医学会学術集会、2006.3.20（つくば市）
- (2) 春田みち子、斑目広郎、西野佳以：ボルナ病ウイルス (BDV) 感染新生仔ラットを保育していた母ラットへの BDV 二次感染、第 141 回日本獣医学会学術集会、2006.3.20（つくば市）
- (3) 西野佳以、斑目広郎：新生仔ラットに致死的な神経症状を引き起こすボルナ病ウイルスの解析、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006.11.20（名古屋市）
- (4) 斑目広郎、西野佳以：ボルナ病ウイルス (BDV) 感染新生仔ラットを保育していた母ラットへの BDV 二次感染、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006.11.20（名古屋市）
- (5) Madarame, H., and Nishino, Y.: Borna disease virus transmission: From the virus-inoculated rat pups to the nursing mother. European Society of Veterinary Pathology 25<sup>th</sup> Annual Meeting, 2007. 8. 31, Munich-Germany.
- (6) 西野佳以、斑目広郎、江永真哉、黒河佐知子、酒井大史、鏑木誠、亀岡章一郎、藤野寛、福原裕司、小島さや、Kathryn M. Carbone：ボルナ病の発症要因の解析、第 1 回ボルナウイルス研究会、2008.2.29（東京都）
- (7) 岡山智史、三浦菜々子、村上賢、Kathryn M. Carbone、西野佳以：宿主馴化に伴い変化するボルナ病ウイルス遺伝子の解析、第 1 回ボルナウイルス研究会、2008.2.29（東京都）
- (8) 西野佳以、黒河佐知子、栗原磨美、亀岡章一郎、斑目広郎、Kathryn M. Carbone：F344 ラットにおけるボルナ病ウイルス株の比較検討、第 145 回日本獣医学会、2008.3.29（相模原市）
- (9) 西野佳以、斑目広郎、酒井大史、小島さや、藤野寛、福原裕司、亀岡章一郎、鏑木誠、Kathryn M. Carbone.：ヌードラットにおけるボルナ病ウイルス感染病態の解析、第 56 回日本ウイルス学会 2008.10.28（岡山市）
- (9) 斑目広郎、江永真哉、鏑木誠、Kathryn M. Carbone、西野佳以：ボルナ病ウイルス (BDV) 新生仔感染におけるラットの感受性の系統差、第 56 回日本ウイルス学会、2008.10.26（岡山市）
- (10) 藤野寛、井上真紀、福原裕司、小島さや、斑目広郎、Kathryn M. Carbone、西野佳以：ボルナ病ウイルス感染ヌードラットの音驚愕試験における行動異常の解析、第 56 回日本ウイルス学会、2008.10.26（岡山市）
- (11) 藤野寛、井上真紀、福原裕司、小島さや、斑目広郎、Kathryn M. Carbone、西野佳以：ボルナ病ウイルス感染ヌードラットの音驚愕試験における行動異常の解析、第 56 回日本ウイルス学会、2008.10.26（岡山市）
- (12) 岡山智史、三浦菜々子、村上賢、舟場正幸、Kathryn M. Carbone、西野佳以：ボルナ病ウイルスの馴化：宿主動物への適応に伴うウイルス遺伝子の変化、第 56 回日本ウイルス学会、2008.10.26（岡山市）
- (13) Nishino, Y., Okayama, S., Miura, N., Murakami, M., Carbone, K.M., Funaba, M. (December 13-17, 2008): Changes in Borna disease virus genome with adaptation to host. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, CA, USA.
- (14) 飯塚春彦、鏑木誠、亀岡章一郎、江永真哉、斑目広郎、井上真紀、西野佳以：ボ

ルナ病ウイルス感染 Donryu ラットのオープンフィールド試験による行動解析、  
第2回日本ボルナウイルス研究会、  
2009.1.30 (相模原市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西野 佳以 (NISHINO YOSHII)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：00271544

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

斑目 広郎 (MADARAME HIROO)

麻布大学・動物病院・准教授

研究者番号：20173768

舟場 正幸 (FUNABA MASAYUKI)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40238655