

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08145

研究課題名(和文) 血漿漏出と骨髄抑制を伴うデングウイルス感染マウスモデルを用いた重症機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of severe disease mechanism using mouse model infected with dengue virus, developing the symptoms of vascular leakage and bone marrow suppression.

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では独自に開発したデングウイルス感染新規マウスモデルを用いて重症化機序を明らかにすることを目的とした。本研により感染によりIL-17A産生V_{4,6}型のTCRを持つガンマ・デルタT細胞が選択的に増殖し、産生されたIL-17AがTNF- α と共同してサイトカイン過剰産生に働き、その結果好中球増殖とエフェクター分子の産生に作用することが判明した。細胞の選択的な増殖の原因は明らかではないが、今後IL-17A産生型のガンマ・デルタT細胞増殖をトリガーする機序が解明されれば、サイトカインストームによる病態機序を理解するための重要な知見が得られる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デング熱は世界中の熱帯・亜熱帯地域に蔓延し、しばしば重症のデング出血熱を引き起こす。特異的な治療薬、普通の人に適応できるワクチンは開発されていない。重症化の原因は宿主の過剰な免疫反応によると考えられているが、その実態はあきらかではない。本研究では、独自に開発したマウスモデルを用いて、免疫反応が過剰に至るには液性因子であるIL-17Aを産生する特殊なガンマ・デルタT細胞が感染により選択的に活性化、増殖することによることを明らかにした。特定のガンマ・デルタT細胞が活性化される機序はまだ不明であるが、重症化機序解明、予防法開発につながる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanism of severe disease using a novel mouse model of dengue virus infection developed independently. The study revealed that infection selectively proliferates gamma-delta T cells with IL-17A-producing V_{4,6}-type TCRs, and that the IL-17A produced acts in collaboration with TNF- α to overproduce cytokines, resulting in neutrophil proliferation and the production of effector molecules. The cause of the selective cell proliferation is not clear, but future elucidation of the mechanisms triggering IL-17A-producing gamma-delta T-cell proliferation will provide important insights into understanding the pathomechanisms of cytokine storm-induced pathology.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：ウイルス学

キーワード：デング熱 ガンマ・デルタT細胞 サイトカインストーム マウスモデル IL-17 ウイルス性出血熱
RNAウイルス デング出血熱

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。その病原機序は明らかではなく、効果的な治療法・予防法はない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに血漿漏出と血小板減少症、骨髓抑制(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る。またこの系を用いてトランスクリプトーム解析を行い、すでに重症化に関連する候補因子群を得ていた。本研究では、これら結果を網羅的かつ実験的に解析し、デングウイルス感染重症化の病態機序を明らかにすることを目的とした。本実験に使用したマウスモデルでは、TNF- α 阻害により生存できるようになる。この観察を利用し、TNF- α 阻害がどの経路を阻害することでマウスを防御するか明らかにし、病原機序解明につなげる。

3. 研究の方法

デングウイルス感染インターフェロン(IFN)系 KO マウスに、抗 TNF- α 中和抗体を腹腔内投与し、経時的に血清、各種臓器を採取する。採材サンプルのマイクロアレイ解析、血清サイトカインレベル測定、Luminex 解析及び定量 RT-PCR 解析、臓器浸潤細胞のフローサイトメトリー解析、病理解析を行い、コントロール群と比較解析した。

4. 研究成果

経時的な観察により 3 型デングウイルス P12/08 株感染後 4 日から 5 日にかけて死亡することがわかった。感染後 3 日目では、まだ肝臓と小腸(血漿漏出が激しい臓器)で血漿漏出が観察しなかったが、4 日目に急激に漏出することがわかった。

そこで図 1 に示すように感染後の処理と臓器回収時期を A から E まで感染後の 5 つのグループ(3 匹ずつ)に分けた。5 つのグループのマウスの肝臓と小腸を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現変動解析を行った。全遺伝子変動の PCA 解析の結果、肝臓では抗 TNF 阻害の影響がなく、感染後の日によってグループ化されていた。一方、小腸では TNF 阻害効果が顕著であり、阻害により感染 3 日と同じグループに属していた。このことから TNF 阻害による防御は小腸を保護していることが判明した。マイクロアレイによる解析から感染マウスでは特に小腸では IL-17A 産生が高く、他のサイトカイン産生も高いことが判明した。特に IL-6 の産生がより高かった。

図 1. 実験条件 (グループ分け)

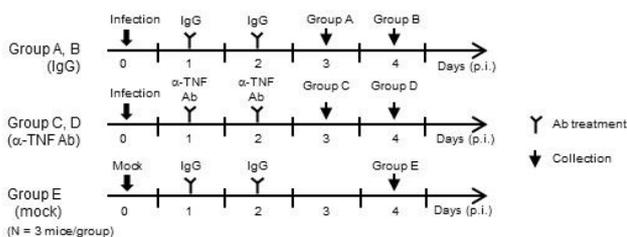
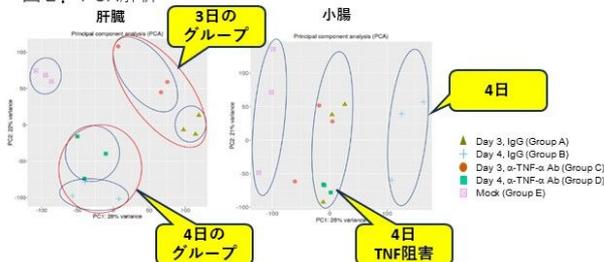
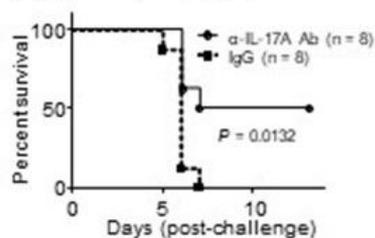


図 2. PCA 解析



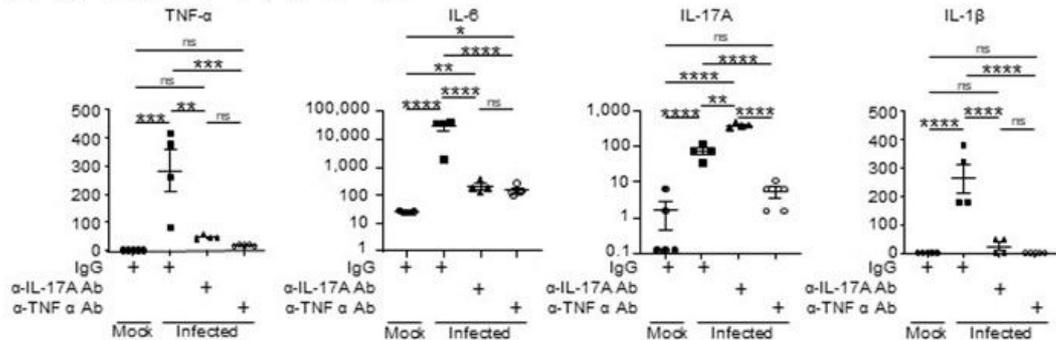
血漿漏出を伴う重症化は、以下のように大きく 2 つのステップに分けて考えられる。(1) サイトカイン過剰産生のステップ(2) 産生されたサイトカインにより、エフェクター分子が産生され血漿漏出を起こすステップ。詳細なマイクロアレイ解析により肝臓、小腸ともにサイトカイン関連因子の発現変動が最も顕著であった。具体的には TNF- α 、IL-1、IL-6 などの産生が感染により上昇し、TNF 阻害により産生抑制されていた。この中で小腸では IL-6 産生が肝臓よりも非常に高かった。また小腸では IL-17A が産生され、IL-6 高産生と関連していた。抗体による IL-6 シグナル阻害では生存率に影響はな

図 3. マウス生存率



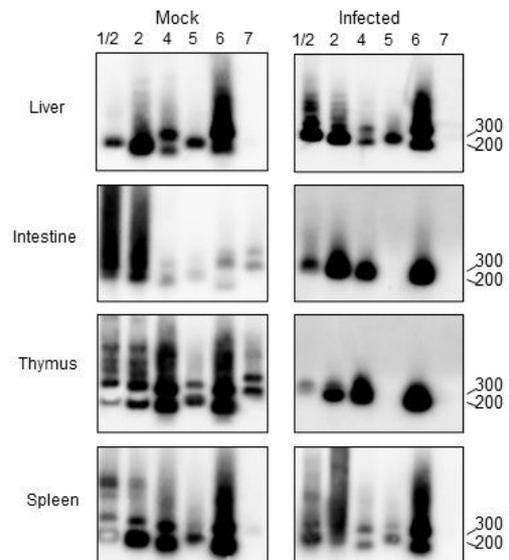
かったら、IL-17A シグナルの阻害により生存率が 50%まで回復した(図3)。一方、TNF-シグナル阻害では 100%マウスを生存する。TNF-シグナル阻害、IL-17A シグナル阻害による血清サイトカイン産生への影響を調べたところ、感染により上昇する TNF-、IL-6、IL-1 産生が、どちらの処置によっても抑制された(図4)。TNF-シグナル阻害は IL-17A 産生を下げ、一方 IL-17A シグナル阻害は TNF-産生を阻害する。またそれぞれのシグナルの阻害は IL-6 産生を同レベルまで低下させる。このことから TNF-と IL-17A がお互いに産生に相互に作用し、IL-6 産生を相乗的に働き、非常に高い産生を誘導したと結論した。

図4. 血清中サイトカイン量



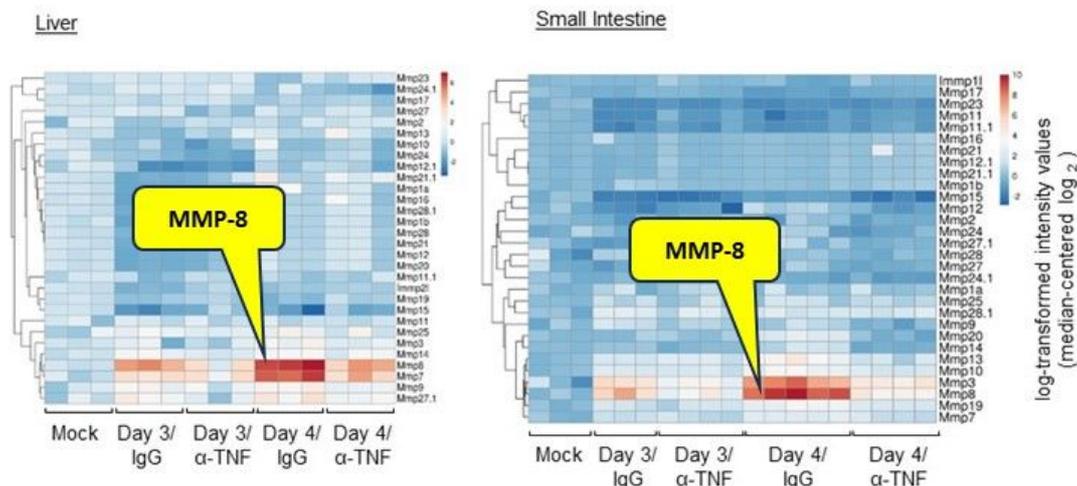
フローサイトメトリー解析により、小腸で IL-17A 産生している細胞はガンマ・デルタ T 細胞であることが判明した。ガンマ・デルタ T 細胞は、インターフェロン産生性の細胞と IL-17A 産生性の細胞に分けられると考えられている。また T 細胞受容体(TCR) V 鎖の違いにより 6 つの型に分類でき、局在する臓器、産生される液性因子に一定のパターンがあると考えられている。そこで各種臓器から精製したガンマ・デルタ T 細胞の RNA を用いて増幅した RT-PCR の産物をサザンブロット解析することにより、TCRV ガンマ鎖の型別を行った。非感染マウスでは、V_{1,2} を持つガンマ・デルタ T 細胞が最も多いが、感染により小腸では V_{2,4} TCR を持つガンマ・デルタ T 細胞が選択的に増殖していることが判明した(図5)。同様なパターンは胸腺のガンマ・デルタ T 細胞で観察されたが、肝臓および脾臓のガンマ・デルタ T 細胞では観察されなかった。V_{2,4} TCR を持つガンマ・デルタ T 細胞は、IL-17A 産生性であることが知られており、胸腺及び小腸では感染によるなんらかの刺激によりこれら細胞が選択的に増殖していると考えられた。以上の結果はサイトカインレベルでの重要な観察である。

図5. ガンマ・デルタ T 細胞の TCRV_γ 鎖型別



エフェクターレベルでは、マイクロアレイに結果から感染により増加するトップ 10 の遺伝子の中にマトリックスメタロプロテアーゼ 8 (MMP-8) が見つかり、血漿漏出が酷い肝臓と小腸に共通に認められた(図6)。TNF-または IL-17A シグナル阻害により肝臓、および小腸での

図6. 肝臓と小腸におけるMMP発現レベルのマイクロアレイ解析



MMP-8 発現量が抑えられることから、これらサイトカインの下流にある因子であると考えられ、血漿漏出のエフェクターとして働くと考えられた。MMP-8 についても肝臓より小腸の方が感染による発現上昇し、TNF- α または IL-17A シグナル阻害により抑制されることから（図 6 参照）小腸での中心的な因子であることが判明した。

MMP-8 は好中球コラゲナーゼという別名の通り、多くは好中球から産生される。そこで小腸に浸潤しているか、小腸から抽出した細胞についてフォローサイトメトリーを用いて解析した。その結果 CD11b⁺/Ly6G^{high} のマーカーを発現する好中球が感染により 100 倍以上浸潤していることが明らかになった。このことから血漿漏出を起こしている末梢組織に浸潤した好中球が血漿漏出のエフェクター細胞となっていると結論した。一方、CD11b⁺/Ly6G^{int}/Ly6C^{high} の活性化したマクロファージも浸潤しており、小腸が感染の中心になっていることが明らかになった。そこで TNF-

または IL-17A シグナル阻害により好中球浸潤が抑制されるか調べたところ、浸潤抑制の効果は低く、非感染より 50 倍以上の高い値を示していた。このことから TNF- α または IL-17A シグナル阻害による防御効果は、好中球浸潤阻止によるのではなく、その下流経路への効果によると考えられた。TNF- α と IL-17A は、共同して NF- κ B を活性化し、IL-6 産生を増進することが知られている。そこで小腸につて NF- κ B の転写因子である p65 の局在を調べたところ、上皮細胞、血管内皮細胞を含む間質細胞では感染により核内に移行しており、TNF- α または IL-17A シグナル阻害によって完全に核内移行を阻害していることがわかった。さらに IL-6 レセプター下流に位置する STAT-3 のリン酸化について調べたところ、予想通り感染によってリン酸化が亢進し、TNF- α または IL-17A シグナル阻害によってリン酸化が抑制されていた。

以上をまとめると TNF- α シグナル阻害による防御効果は、腸管への免疫細胞のリクルートを阻害することではなく、腸管に集合した免疫細胞と腸管の細胞との相互作用による炎症性シグナル伝達を阻害することにより障害を抑制したためであった。これらの観察は、腸管を保護することが生存率の上昇につながる可能性を示唆している。本研究によりサイトカインストームから血漿漏出に至る多くの現象を解明したが、何が特定の IL-17A 産生ガンマ・デルタ T 細胞の選択的増殖を促したか明らかにしていない。サイトカインストームをトリガーするこの初めの機序と因子が明らかになれば、今後同様な疾患の治療につながる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurosu T, Hanabara K, Asai A, Pambudi A, Phanthanawiboon A, Omokoko MD, Ono K, Saijo M, Ramasoota P, Ikuta K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Chimeric flavivirus enables evaluation of antibodies against dengue virus envelope protein in vitro and in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 21561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78639-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Phanthanawiboon S, Pambudi S, Omokoko MD, Hanabara K, A-Nuegoonpipat A, Kamitani W, Ikuta K, Kurosu T	4. 巻 495
2. 論文標題 Construction of a high-yield dengue virus by replacing nonstructural proteins 3-4B without increasing virulence	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1221-1226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Phanthanawiboon Supranee, Pambudi Sabar, Omokoko Magot Diata, Hanabara Keiko, A-nuegoonpipat Atchareeya, Kamitani Wataru, Ikuta Kazuyoshi, Kurosu Takeshi	4. 巻 495
2. 論文標題 Construction of a high-yield dengue virus by replacing nonstructural proteins 3?4B without increasing virulence	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.11.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeshi Kurosu , Keiko Hanabara , Azusa Asai , Sabar Pambudi , Supranee Phanthanawiboon , Magot Diata Omokoko , Yusuke Sakai , Tadaki Suzuki , Kazuyoshi Ikuta	4. 巻 659
2. 論文標題 Chimeric flavivirus causes vascular leakage and bone marrow suppression in a mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 54-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kurosu T, Okuzaki D, Shimojima M, Yoshikawa T, Phanthanawiboon S, Kamimura D, Murakami M, Saijo M
2. 発表標題 Inflammation amplifier plays a critical role in severe dengue hemorrhagic fever
3. 学会等名 Keystone Symposia Positive-strand RNA Viruses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurosu T, Phanathanawiboon S, Okuzaki D, Shimojima M, Yoshikawa T, Saijo M.
2. 発表標題 IL-17A produced from gamma/delta T cells plays a critical role in vascular leakage of severe dengue hemorrhagic fever in mice.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒須剛、奥崎大介、Phanathanawiboon S、吉河智城、下島昌幸、村上正晃、上村大、永田典代、岩田奈織子、西條政幸
2. 発表標題 Dengue熱重症化マウスモデルでは、 T細胞から産生されたIL-17AがIL-6産生を増強し、血漿漏出を伴う致死の感染を引き起こしている。
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurosu T, Okuzaki D, Shimojima M, Yoshikawa T, Phanathanawiboon S, Kamimura D, Murakami M, Saijo M
2. 発表標題 IL-17A produced from gamma/delta T cells plays a critical role in vascular leakage of severe dengue hemorrhagic fever in mice
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒須剛、奥崎大介、Supanee Phanthanawiboon、吉河智城、下島昌幸、西條政幸
2. 発表標題 マウスモデルを用いたデング出血熱重症化機序の解明
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Kurosu, Daisuke Okuzaki, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Kamimura, Murakami, Tomoki Yoshikawa, Shunpei Watanabe, Supanee Phanathanawiboon, Masayuki Saijo
2. 発表標題 Inflammation amplifier plays a critical role in severe dengue hemorrhagic fever
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Supanee Phanthanawiboon, Takeshi Kurosu, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Shumpei Watanabe, Tadaki Suzuki, Naoko Iwata-Yoshikawa, Noriyo Nagata, Masayuki Saijo
2. 発表標題 Hematopathogenesis of chimeric dengue mouse model
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Kurosu, Daisuke Okuzaki, Kriengsak Limkittikul, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Shumpei Watanabe, Masayuki Saijo.
2. 発表標題 The dynamics of disease progression in severe dengue.
3. 学会等名 第58回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Kurosu, Daisuke Okuzaki, Kriengsak Limkittikul, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Shumpei Watanabe, Masayuki Saijo.
2. 発表標題 The dynamics of disease progression in severe dengue.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Kurosu
2. 発表標題 The dynamics of disease progression in severe dengue.
3. 学会等名 Joint International Tropical Medicine Meeting 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------