

機関番号：72801

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18109004

研究課題名 (和文) ポリオウイルスの体内動態と宿主機能

研究課題名 (英文) Dissemination mechanism of poliovirus

研究代表者

野本 明男 (NOMOTO AKIO)

財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・所長

研究者番号：70112670

研究成果の概要 (和文)：ポリオウイルス (PV) 感受性トランスジェニック (Tg) マウスを用い、PV の体内動態を解析した。主な研究項目は、Tg マウスへの経口感染について、PV の血液脳関門 (BBB) 透過機構について、骨格筋から中枢に至る逆行性軸索輸送機構について、神経細胞の PV 抵抗性についてなどである。その結果、BBB 透過には、宿主のトランスフェリン受容体を利用していること、逆行性軸索輸送には、PV 受容体依存的な機構と非依存的な機構があることなどを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：Poliovirus (PV) dissemination routes were investigated by using transgenic mice susceptible to PV and rodent cells. Main interests were i) low efficiency of oral infection, ii) PV permeation mechanism through blood brain barrier, iii) PV transportation mechanism of retrograde axonal pathway, and iv) PV resistance character of neural cells. Our data indicate that PV utilizes transferrin receptor to invade the central nervous system (CNS), and that PV is retrogradely transported both by PV receptor dependent and independent pathways through the axon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	31,800,000	9,540,000	41,340,000
2007年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2008年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	87,200,000	26,160,000	113,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、感染症、生体分子、脳神経疾患、病理学

1. 研究開始当初の背景

ヒトの PV 受容体 (hPVR) を持つトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、サルに替わる PV の感染モデル動物として利用出来るようになっていた。事実、体内伝播経路もヒトの場合と同様であった。しかし、この Tg マウスは、サル同様に経口感染に対しては、非常に抵抗性であった。

2. 研究の目的

Tg マウスで経口感染が成立しない理由を明らかにし、血液脳関門 (BBB) 透過機構や逆行性軸索輸送の分子機構を解明すること、さらに、神経細胞が持つ PV 抵抗性のメカニズムも合わせて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1型インターフェロン受容体のKOマウスと上記Tgマウスから、PV感受性マウスを作製する。BBB透過に必要な分子を同定するためにマウス脳血管内皮細胞の表面物質とPVの相互作用を調べる。逆行性軸索輸送に関与するメカニズムおよび輸送終了前と輸送後のPVの動態を初代培養の運動神経を使い検討する。神経細胞のPV抵抗性については、各種の変異ウイルスを作製し、神経細胞変性に関与するPVの遺伝子を同定する。

4. 研究成果

hPVRを持つTgマウスは、PVの感染モデルとして有用である。しかしながら、経口感染の効率が非常に低く、真にヒト型マウスとは言えない。そこで、Tgマウスの消化管に適応したPV変異株を得た。しかし、この変異株は安定性が悪く、維持することは困難であった。そこで、血流中から中枢神経系に移行しやすい変異株を得る方針を立て、ある程度移行しやすい変異株を得た。そのゲノム構造を解析した結果、キャプシド蛋白質VP1のウイルス粒子表面に位置するペプチドの一部が変異していることを見出した。この変異がBBB透過に関与しているかを、以下に示すように解析中である。

BBB透過機構には、hPVRは関与していないことが明らかとなっている。そこで、hPVRを持たないマウス脳血管内皮細胞(MBEC4細胞)をトランスウェル上で培養し、*in vitro* BBBモデルを作製して、PVの透過実験を行った。その結果、作製した*in vitro* BBBモデルは、*in vivo*の透過性を反映していることが、明らかとなった。

次に、PVとMBEC4細胞を混合し、界面活性剤で処理した後、PVが結合している細胞表面分子を、PVに対する抗体を使用した免疫沈降法により得た。この分画をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、各分画に含まれる細胞側分子を質量分析法により解析した。その結果、トランスフェリン受容体分子が唯一の細胞表面分子として同定出来た。

トランスフェリン受容体とPVの結合性を確認するため、PVとタグを付加したトランスフェリン受容体を混合し、タグの抗体を使用して免疫沈降法による解析を行った結果、トランスフェリン受容体とPVは結合することが証明された。さらに、両者の結合に関与するペプチドの同定に成功した。ペプチド同士も結合することを示すことが出来た。PV粒子上のペプチドにマーカ分子を結合させた分子も、MBEC4細胞に取り込まれることが明らかとなり、さらに、*in vitro* BBBモデルを効率よく透過することも明らかとなった。この研究は、中枢神経系をターゲットとしたDDSの新しい戦略として、特許出願

につながった。現在、血流中から中枢神経系に移行しやすい変異株の透過性も検討する準備を整えている。

PVの逆行性軸索輸送に関しては、細胞質ダイニンが関与する速い軸索輸送であることを明らかにした。しかし、その速度は、4 cm/day~32 cm/dayの幅があることが明らかとなった。32 cm/dayの輸送に関してのメカニズムは、hPVRに依存的であった。すなわち、骨格筋に接種したPVは、神経シナプスでhPVR依存的にエンドサイトーシスにより取り込まれる。PVを持つエンドソームの外側にはhPVRの細胞質ドメインがあり、その上には、ダイニン複合体サブユニットへの結合モチーフがある。そのモチーフを介してダイニン複合体に結合する。PVを持つエンドソームは、ダイニン複合体を介し、マイクロチューブルに沿って逆行性に神経細胞体まで運ばれる。このことは、*in vitro*での再構成系を使用して証明した。すなわち、ラットの初代運動神経細胞にGFPを付加したhPVRのcDNAをマイクロインジェクションし、8時間培養後、蛍光標識したPVを感染させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、hPVRとPVが共に移動するビデオを作成することによって、証明した。4 cm/dayの比較的遅い輸送系は、hPVR非依存的であることも証明した。

また、逆行性軸索輸送中のPVは、感染性粒子であること、神経細胞体に到達してからhPVR依存的なウイルス複製が開始される。どのようにウイルス複製が開始されるかは今後の問題である。本研究では、この問題を解明するために、神経の細胞体とシナプス側を分離して培養できる培養装置の開発を行った。Tgマウスからの運動神経細胞の初代培養細胞の分離培養に成功したが、この装置を使用しての研究は、これから開始するところである。

1型インターフェロン受容体のKOマウスとPV感受性Tgマウスから作製したマウスを使用して、PV感染実験を行った。PVは、マウスの胃の酸性条件下で失活することが明らかとなったので、炭酸水素ナトリウムと同時にPVを与えた。この自然免疫系が働かないマウスでの経口感染では、ある程度マウスが感受性となることが示された。このマウスへの経口感染系を使用し、最初に感染する細胞を検討したが、細胞の種類を同定することはできなかった。またマウス腸管のM細胞にはPV抗原を検出することはできなかった。

神経細胞にPVを感染させ、2時間後に感染防御抗体を添加すると、PVはクリアランスされ、24時間後には感染神経細胞は継代可能となる。抗体添加の時期を遅らせると、この現象は見られなくなる。このことから、添加抗体の働きは、複数回の感染を阻止したこ

とにあると考え、その可能性を検討した。

すなわち、1回感染のみ起こるPVの欠陥干渉(DI)粒子を使用した感染実験を行った。その結果、神経細胞は抵抗性を示したが、コントロールとして使用したHeLa細胞には激しい細胞変性効果が現れた。DI粒子感染によっても、細胞変性に関し中心的な役割を演じる、PVの2A蛋白質は発現する。したがって、神経細胞は、2A蛋白質に対し抵抗性があることが判明した。神経細胞が、PVの一回の感染に対し抵抗性を持つのは、このためではないかと考えられる。

そこで、神経細胞にDI粒子を複数回感染させ、細胞変性効果を観察した。予想に反し、細胞変性は生じなかった。そこで、DI粒子に欠けているキャプシド蛋白質領域を発現するワクシニアウイルスを使用し神経細胞への感染実験を行ったところ、コントロールの野生型ワクシニアウイルスに比べ、明らかに細胞変性効果が強く発現した。このことは、神経細胞は、2A蛋白質よりもキャプシド蛋白質に、強く損傷を受ける可能性を示している。

PVを使用した発現ベクターは、キャプシド蛋白質領域を外来mRNAと置換するので、神経細胞を標的とする場合、安全性の高いベクターとなると予想された。

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14件)

- ① 2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication. Hiroko Igarashi, Yasuko Yoshino, Miwako Miyazawa, Hitoshi Horie, Seii Ohka, & Akio Nomoto. *J. Virol.*, 査読有 84(12): 5947-5957, 2010.
 - ② Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. S. Ohka, M. Sakai, S. Bohnert, H. Igarashi, K. Deinhardt, G. Schiavo, & A. Nomoto. *J. Virol.*, 査読有 83(10): 4995-5004, 2009.
 - ③ Molecular aspect of poliovirus pathogenesis. Akio Nomoto. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 査読有 83: 266-275, 2007.
 - ④ Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. Seii Ohka, Hiroko Igarashi, Noriyo Nagata, Mai Sakai, Satoshi Koike, Tomonori Nochi, Hiroshi Kiyono, & Akio Nomoto. *J. Virol.*, 査読有 81(15): 7902-7912, 2007.
- [学会発表] (計32件)
- ① 運動神経初代培養細胞の分離培養系におけるポリオウイルス感染、大岡静衣、金田祥平、藤井輝夫、五十嵐博子、野本明男、第58回日本ウイルス学会、2010年11月8日、徳島あわぎんホール
 - ② ポリオウイルスの血液脳関門透過機構、二瓶浩一、野本明男、第58回日本ウイルス学会、2010年11月7日、徳島あわぎんホール
 - ③ カニクイザルを用いたポリオウイルス経口感染実験、大岡静衣、永田典代、小池智、野本明男、第57回日本ウイルス学会、2009年10月26日、東京都市センターホテル
 - ④ Poliovirus receptor (hPVR/CD155)-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. Seii Ohka, Mai Sakai, Stephanie Bohnert, Hiroko Igarashi, Katrin Deinhardt, Giampietro Schiavo, & Akio Nomoto. *Europic* 2008, May 27, 2008, Sitges, Barcelona, Spain.
 - ⑤ ポリオウイルスの運動神経軸索逆行性輸送機構、大岡静衣、坂井麻依、五十嵐博子、野本明男、第55回日本ウイルス学会、2007年10月23日、札幌コンベンションセンター
 - ⑥ ポリオウイルス感染による神経細胞変性効果(CPE)発現機構の研究、松田法恵、五十嵐博子、大岡静衣、柳谷朗子、堀江均、宮澤美和子、野本明男、第55回日本ウイルス学会、2007年10月23日、札幌コンベンションセンター
 - ⑦ 2A^{pro}を欠損した自己複製型ポリオウイルス変異株の解析、五十嵐博子、大岡静衣、野本明男、第54回日本ウイルス学会、2006年11月20日、名古屋国際会議場
 - ⑧ ポリオウイルス経口感染モデルマウスにおける経口感染伝播機構の解析、大岡静衣、五十嵐博子、永田典代、坂井麻依、小池智、野地智法、清野宏、野本明男、第54回日本ウイルス学会、2006年11月19日、名古屋国際会議場
 - ⑨ Mechanisms for neural dissemination of poliovirus. Seii Ohka, Mai Sakai, Norie Matsuda, Koujiro Tohyama, Hiroko Igarashi, Stephanie Bohnert, Giampietro Schiavo, & Akio Nomoto. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 19, 2006, Kyoto International Conference

Center.

〔図書〕（計1件）

- ① Polioomyelitis. Satoshi Koike, & Akio Nomoto. ASM Press, The Picornaviruses, Chapter 21: 339-351, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：血液脳関門を透過する薬物輸送体、ペプチド及びその用途

発明者：野本明男、二瓶浩一

権利者：（財）微生物化学研究会、（株）イムノフューチャー

種類：発明

番号：特願2011-021224

出願年月日：2011年2月2日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野本 明男 (NOMOTO AKIO)

財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・所長

研究者番号：70112670

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大岡 静衣 (OHKA SEII)

独立行政法人国立がん研究センター研究所・がん幹細胞研究分野・研究員

研究者番号：80313097