

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06009

研究課題名(和文) TGF-ファミリーならびに副腎皮質ホルモンはいかにボルナウイルスを制御するのか

研究課題名(英文) Effects of TGF-beta family and adrenal cortical hormone on borna disease virus infection.

研究代表者

西野 佳以 (NISHINO, Yoshii)

京都産業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：00271544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染の発病メカニズムにはウイルス要因、宿主要因、および環境要因が考えられる。本研究では、環境要因がストレスとなり体内のストレスホルモン(副腎皮質ホルモン、コルチコステロン)量が増加すると発病を悪化させる可能性について動物モデルと培養細胞系により検討した。その結果、ボルナ病ウイルスに感染したマウスにおいて、コルチコステロンの投与は病態を悪化させた。また、同ホルモンは初代培養神経細胞におけるウイルス感染率を上昇させた。以上の結果から、コルチコステロンはボルナ病ウイルス感染における発病のリスク因子となることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ストレス負荷により分泌されるストレスホルモン(副腎皮質ホルモン、コルチコステロン)量の増加がボルナ病ウイルス感染における発病のリスク因子となることを示した。ボルナ病ウイルスは持続感染ウイルスであることから、感染前後のストレスを軽減することが発病を防ぐ一つの方法であることが示唆される。また、ストレスホルモンが軽減するような処置はウイルス感染症における新たな治療・予防法の可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Viral, host, and environmental factors are possible mechanisms of pathogenesis of viral infections. In this study, we investigated the possibility that environmental factors may exacerbate the disease when the body's stress hormone (corticosterone, an adrenal cortical hormone) levels increase due to stress, using animal models and cultured cell systems. Results showed that corticosterone administration aggravated the disease in mice infected with Borna disease virus. The hormone also increased the rate of viral infection in primary cultured neurons. These results indicate that corticosterone is a risk factor for pathogenesis during infection with Borna disease virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス ボルナウイルス 神経疾患 副腎皮質ホルモン TGF-

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルスは目に見えない最強の感染体であり、いったん感染すると様々な病態を引き起こすことは周知の事実であるが、ウイルスがどのようにして増えるのか、増えたウイルスがどのようにして病気を引き起こすのか、といった基本原理に関して不明な点は未だに多い。

私達は、ボルナ病ウイルスを題材にして、この基本原理の解明に取り組んでいる。ボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) は、哺乳類の中枢神経系に感染し、ボルナ病 (運動機能障害、行動学的異常、感覚異常など) を発症し、重篤な場合は死に至る場合もあるウイルスである。約 200 年前に、ヨーロッパの馬と羊で発見された病気で当初は風土病と理解されていたが、その後の血清疫学調査により日本を含む様々な地域の温血動物への幅広い感染が明らかになっている (1)。近年、リスからリスブリーダーへ哺乳類ボルナ病ウイルスが感染し、重篤な神経疾患を引き起こしている (2)。このことから、ボルナ病ウイルスは、単なる動物の感染症の病因だけでなく、人獣共通感染症の病因としても対応が必要と考えられる。

動物における BoDV-1 感染は不顕性である場合が多いが、他のウイルス感染の知見から ウイルス量の多寡が疾病発症とリンクすることが予測される。したがって、BoDV-1 量の制御機構の解明は、病態の顕在化を防ぐ上で有用であるが、BoDV-1 複製に及ぼす要因に関して不明な点は多い。

(2) 私達は、ボルナ病発症は、宿主の副腎皮質ホルモン軸による制御も受けることを見出している (投稿準備中)。また、BoDV-1 複製ならびにボルナ病発症は宿主細胞の TGF- $\beta$  ファミリーの活性によって制御されることを報告している (1, 3, 4)。BoDV-1 感染によって TGF- $\beta$  ファミリーの一グループである BMP シグナルが亢進していること、この BMP シグナルの亢進が BoDV-1 量と関連する可能性を見出している (3)。しかしながら、現状は、BoDV-1 の複製と発症における TGF- $\beta$  ファミリー、副腎皮質ホルモンの関係は解明からは程遠い。

## 2. 研究の目的

(1) 副腎皮質ホルモン (内分泌因子) と TGF- $\beta$  (傍分泌因子) によるボルナ病ウイルス量の制御機構、ならびに発症への影響解明が本研究課題の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) BoDV-1 感染培養細胞における副腎皮質ホルモンの影響

C57BL/6 マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞に BoDV-1 を感染し、ウイルス感染性における合成副腎皮質ホルモン (デキサメタゾン) 添加の影響を解析した。

### (2) BoDV-1 感染動物における副腎皮質ホルモンの影響

BoDV-1 感染 C57BL/6 マウス (5 週齢オス) に対し、副腎皮質ホルモン (コルチコステロン 5mg) を 3 週間かけて放出する錠剤を感染前あるいは感染後に埋め込み、感染病態への影響を解析した。具体的には、臨床症状、体重、胸腺重量、行動学的試験、脳内のウイルス力価および脳組織標本の病理組織学的解析を行った。

### (3) BoDV-1 感染初代培養神経細胞あるいはグリア細胞における TGF- $\beta$ ファミリー関連遺伝子

を含む網羅的な遺伝子発現の解析

BoDV-1 感染による神経細胞およびグリア細胞における遺伝子発現の変動について TGF- $\beta$  ファミリー関連遺伝子を含めて網羅的に解析するために、マウス初代培養神経細胞およびグリア細胞に BoDV-1 を感染し、その細胞由来総 RNA をマイクロアレイ解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) BoDV-1 感染培養細胞における副腎皮質ホルモンの影響

BoDV-1 感染 C57BL/6 マウス由来初代神経細胞に合成副腎皮質ホルモン (デキサメタゾン: Dex) を添加したところ、細胞の表現型は大きく変化しなかったが、ウイルス感染率が上昇した。この現象は、初代培養神経細胞の培養時に Ara-C を添加しグリア細胞等の増殖を抑えた培養条件においても認められた。ウイルス感染率の上昇は、グルココルチコイドレセプター (GR) への阻害薬により抑制されたことから、ウイルス感染率の上昇は Dex による GR を介した反応であることが示された。また、Dex 処置により、核内で複製する BoDV-1 の P 蛋白質が細胞質にも局在する割合が増加した。この結果から、Dex 処置された細胞では BoDV 粒子あるいは vRNP が細胞質に多く局在するようになり、cell to cell 伝播しやすい状況になることが示唆された。

##### (2) BoDV-1 感染動物における副腎皮質ホルモンの影響

###### ① BoDV-1 急性感染期のマウスへの副腎皮質ホルモン (コルチコステロン; CORT) 処置

ウイルス感染 8 日後に CORT 処置 (背部皮下に埋め込み) をした結果、胸腺重量の低下、ボルナ病臨床症状の悪化、体重減少、行動学的異常の亢進、脳内ウイルス量の増加が認められた。しかし、脳炎の程度は軽減していたことから、CORT 処置における病態悪化の原因は炎症性細胞の浸潤による脳の損傷以外のメカニズムによる可能性が示唆された。

本試験で用いた CORT 錠剤を皮下に埋め込むことにより作成したストレス負荷マウスでは、処置 8~24 日目まで胸腺重量の低下、末梢血リンパ球の減少が認められたことから、免疫抑制状態になっていることが示された。

###### ② BoDV-1 感染前のマウスへの CORT 処置

CORT 処置 24 日目の解析では、行動学的異常は認められなかったが、CORT 処置 40 日目の解析では、CORT 処置による行動学的異常が重度化した。脳内のウイルス量およびウイルス抗原の分布は、CORT 処置による差が認められなかったが、脳炎の程度は、CORT 処置により大脳皮質において重度化する傾向が認められた。以上の結果から、重度のストレス負荷あるいは治療等により、CORT の体内濃度が上昇した後に感染すると、CORT の体内濃度が低下した後に病態が悪化することが示された。

###### ③ BoDV-1 感染後期のマウスへの CORT 処置

ウイルス感染後期 (感染 3 週間後) のマウスに CORT を埋め込み、影響を解析した。その結果、CORT 投与による体重、脳内ウイルス量の相違は認められなかった。また、CORT が放出されていると予測される期間は脳炎の程度は軽減し行動学的異常も抑制されるが、効果が消失された時期では急激な脳炎の悪化と行動学的異常の亢進が認められた。以上の結果から、感染後期に重度のストレス負荷等により、CORT の体内濃度が上昇した

場合、CORT の体内濃度が低下した後に病態が悪化することが示された。この原因として、CORT の免疫抑制効果により脳炎は一時的に軽減されるが、脳内にウイルスは存在しているので CORT の体内濃度が正常化するとより強い免疫応答が誘導され、脳炎の重度化や神経症状の悪化が引き起こされることが予測される。

脳炎を起こすボルナ病ウイルス感染症の場合、治療のために副腎皮質ホルモンを使用することも考えられるが、本研究結果からホルモンの効果がある期間はボルナ病の発病は抑制されるが、効果が消失するとむしろ病気を悪化させる危険性も示唆され、注意が必要と考えられる。

#### ④BoDV-1 感染後期のマウスへの CORT 処置と長期的な経過観察

CORT 処置による感染病態への影響が、CORT の体内濃度が高い時期ではなく低下してから起きていることがこれまでの研究で示された。その現象を確認するために、上記②の条件と同様にウイルス感染と CORT 処置を行い、長期間（感染 68 日間）病態を観察し、臨床症状の推移を解析した。

その結果、CORT 処置した感染マウスは CORT 放出期間である 3 週間を過ぎてから感染 68 日目にかけて著しい体重減少が認められた。感染 68 日目において、非感染群では CORT 処置による胸腺重量の差は認められなかったが、感染群間では CORT 処置による胸腺重量の減少傾向がいまだ認められた。行動学的試験においては、感染により異常が認められた項目は 12 項目中 7 項目あったが、そのうち CORT 処置により異常が増大したものは 1 項目、異常が軽減した項目は 2 項目であり、CORT 処置による明らかな傾向は認められなかったが、脳内ウイルス力価は CORT 処置により有意に増加した。CORT 処置により小脳で炎症が重度化し、小脳に存在するプルキンエ細胞にウイルス抗原が検出されたマウスの頭数は、CORT 未処置のマウスの 2 倍であった。

以上の結果から、BoDV 感染後期のマウスへの CORT 処置は、長期的には体重減少を伴う全身状態の悪化を引き起こした。その原因として、脳内のウイルス量の増加、ならびに小脳の機能障害による運動調節、および嚥下・呼吸などの調節異常の関与が示唆された。

#### (3) BoDV-1 感染初代培養神経細胞あるいはグリア細胞における TGF- $\beta$ ファミリー関連遺伝子を含む網羅的な遺伝子発現の解析

神経細胞についてはウイルス感染により発現量に有意な差が認められる遺伝子は検出されなかったが、グリア細胞では有意な発現の差が認められる遺伝子が検出された。今後、遺伝子発現量の変動が認められた遺伝子産物について、リアルタイム PCR 法等による定量的な発現解析をする必要がある。

#### <引用文献>

- (1) 西野佳以・村上 賢・舟場正幸. ボルナ病ウイルスの病原性発現メカニズム解明の研究動向: TGF- $\beta$  ファミリー経路の関与. *日獣会誌* 69:517-523. 2016.
- (2) Hoffmann B, Tappe D, Höper D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, Niederstraße O, Müller T, Jenckel M, Grinten E, Lutter C, Abendroth B, Teifke JP, Cadar D, Schmidt-Chanasit J, Ulrich RG, Beer M. A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *N Engl J Med*, 373: 154-162. 2015.

- (3) Nishino Y, Murakami M, Funaba M. Expression and role of the TGF- $\beta$  family in glial cells infected with Borna disease virus. *Microbes Infect* 18:128-136. 2016.
- (4) Nishino Y, Ooishi R, Kurokawa S, Fujino K, Murakami M, Madarame H, Hashimoto O, Sugiyama K, Funaba M. Gene expression of the TGF- $\beta$  family in rat brain infected with Borna disease virus. *Microbes Infect* 11:737-743. 2009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshii NISHINO	4. 巻 37
2. 論文標題 Effects of Stress on Viral Neurological and Neurobehavioral Disease and Social Issues in the COVID-19 Pandemic	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 THE BULLETIN OF THE INSTITUTE FOR WORLD AFFAIRS	6. 最初と最後の頁 121-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西野佳以
2. 発表標題 ボルナウイルス感染症におけるストレスの影響
3. 学会等名 鳥取大学農学部 令和2年度新興再興感染症学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西野佳以
2. 発表標題 ボルナウイルス感染におけるストレスの影響
3. 学会等名 第4回小動物ウイルス病研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立花蓮、深田彩人、窪田裕樹、木村享史、西野佳以
2. 発表標題 Effects of pre-administration of corticosterone on Borna disease virus infection.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深田彩人、河北尚輝、北村真穂、木戸脇恵理、山田泰唯、立花蓮、窪田裕樹、齋藤敏之、西野佳以
2. 発表標題 Corticosterone induces behavioral abnormality in the mice acute infected with mammalian 1 borna virus.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田裕樹、本田知之、齋藤敏之、西野佳以
2. 発表標題 Dexamethasone enhances infection of Borna disease virus type 1 in mouse primary culture neurons.
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立花蓮、山田泰唯、深田彩人、窪田裕樹、木村享史、齋藤敏之、西野佳以
2. 発表標題 Effect of corticosterone in the mice persistently infected with mammalian 1 bornavirus.
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深田彩人、山田泰唯、立花蓮、窪田裕樹、齋藤敏之、西野佳以
2. 発表標題 Corticosterone induces neurological disorder in the mice persistently infected with mammalian-1 borna virus.
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西野佳以、深田彩人、立花蓮、木村享史
2. 発表標題 コルチコステロン前処置によるボルナ病ウイルス 1感染マウスの病態の悪化
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥西慧菜、秋山総一朗、深田彩人、立花蓮、木村享史、西野佳以
2. 発表標題 ボルナ病ウイルス 1 感染マウスにおけるコルチコステロンの長期的影響
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西野佳以
2. 発表標題 ウイルス性神経疾患におけるストレスの影響
3. 学会等名 京都産業大学世界問題研究所第2回定例研究会（招待講演）
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	舟場 正幸  (Funaba Masayuki)  (40238655)	京都大学・農学研究科・准教授    (14301)	

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