

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19041076

研究課題名（和文）

ウイルス性脳炎発症機構に関する新しい概念-宿主の防御戦略とウイルスの生存戦略-

研究課題名（英文）

A new concept on mechanism of viral encephalitis

研究代表者

小池智 (KOIKE SATOSHI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：30195630

研究成果の概要：

ウイルスの増殖する場やその効率はウイルス自身の増殖能力と宿主の防御能力とのバランスで決定され、その結果そのウイルス特有の病態が決定されると考えられる。ポリオウイルスのように中枢神経系で効率よく増殖するがその他の組織ではよく増殖できないウイルスのトロピズムを決定する要因について研究を行なった。宿主はウイルス感染を様々なセンサーで検知し自然免疫系による防御を行なう。ウイルス RNA のセンサーとして RIG-I, MDA5, TLR3, TLR7 が知られているのでどの経路が重要であるかを調べた。個体レベルの感染においてポリオウイルスは種々のセンサーのうち、TRIF によってシグナルが伝達される経路 (TLR3 と考えられる) によって効率よく検知されるが、MyD88 を介する経路や RIG-I, MDA5 による経路では効率よく検知されないことが判明した。ポリオウイルスの検知を担っている組織は主に脾臓であり、脾臓に存在する細胞で TRIF を介する経路でポリオウイルスが検知されていると考えられた。ウイルスは他のセンサーシステムを回避する機構をもっていることが予想され、そのことが組織による IFN 応答の偏りを生みポリオウイルスに特有の病態を生ずる原因であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,400,000	0	7,400,000
2008 年度	7,600,000	0	7,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,000,000	0	15,000,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ウイルス、感染症、脳神経疾患、微生物、病理学

1. 研究開始当初の背景

ウイルスのトロピズムは種々の要因によって規定されていると考えられている。その中でもウイルスのレセプターやウイルスの

複製に必要とされる宿主因子は最も重要であると考えられていた。ポリオウイルスはピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類され、急性灰白髄炎を引き起こす。その特

徴として中枢神経系では効率よく増殖するが、その他の組織では重篤な病変を引き起こすほど効率よくは増殖できない。

我々はポリオウイルスレセプター (PVR) 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (tg) モデルを用いて、上記特異性に関するウイルスレセプターやその他の宿主因子の重要性を調べてきた。その結果、PVR やピコルナウイルスに特有の **internal ribosome entry** に必要な宿主因子群は、ウイルスの複製が効率よく起こる部位に限局して発現している訳ではなく、より広範囲の組織で発現していることが判明した。したがって、別の要因によってウイルス増殖がコントロールされると考える必要があった。我々は I 型 IFN 応答がない *Ifnar1* ノックアウトマウスを PVR-tg マウスと交配し、そのマウスに於ける病態を調べた。マウスは全身で効率よく増殖し、神経組織特異性が低くなっていたことから IFN 応答はポリオウイルスの感染組織特異性の大きな決定要因であることが予想された。

2. 研究の目的

上記のような特異性はウイルスを検知する宿主応答とそれを回避するウイルスの生存戦略の間で生ずるバランスを反映していると考えた。宿主のウイルス RNA 検知のメカニズムに関する研究は近年飛躍的に進み、**RIG-I, MDA5** などの細胞内センサー、**TLR3, TLR7** などの膜貫通型センサーの存在が明らかになった。我々はこれらのセンサーを介するウイルスの検知システムとポリオウイルスのトロピズムの関連を調べることを計画した。

3. 研究の方法

- (1) PVR-tg マウスと **RIG-I, MDA5**, ならびに **TLR3, TLR7** のアダプターである **TRIF, MyD88** のノックアウトマウスを交配し、これらの経路が遮断されたマウスシステムを作成した。
- (2) 初代培養細胞などでウイルス感染時の IFN 応答を調べた。
- (3) またポリオウイルスを静脈内接種し、マウスの IFN 応答、マウスの生死、マウス組織に置けるウイルス増殖の程度を調べ、これらの経路の個体レベルでの重要性を調べた。

4. 研究成果

- (1) 初代培養腎臓細胞を作成し、ポリオウイルスによる IFN 応答を調べた。あらかじめ何も処理をしない細胞においては野生型、**RIG-I** ノックアウト、**MDA5** ノックアウトマ

ウスに由来する細胞も IFN の誘導はほとんど検知されなかった。細胞を低レベルの IFN で処理 (プライミング) した後にポリオウイルスを感染させると、野生型、**RIG-I** ノックアウトマウスに由来する細胞では IFN 応答が観察され、**MDA5** ノックアウトマウス由来の細胞では観察されなかった。このことからポリオウイルスは基本的に **MDA5** によって検知されているが、通常はポリオウイルスはこの経路の発動を阻むシステムを有していることが推測された。

(2) 次にマウス個体内での **RIG-I, MDA5** の重要性を調べた。野生型マウスに 10^7 PFU のポリオウイルスを静脈内接種すると 12 時間後には血中 IFN が検知され、脾臓をはじめとする非神経系の組織においては **IFN-stimulated genes (ISGs)** が上昇した。**RIG-I, MDA5** ノックアウトマウスにおいても同様の結果が得られた。また様々な組織でのウイルス増殖量を測定し、ノックアウト系統においても野生型と大きな差がないことを確認した。さらに、 $10^{3.5}$ PFU のウイルスでチャレンジし、マウスのウイルス抵抗性を調べたが、ノックアウトマウスは野生型マウスと比較しても抵抗性に大きな差は見られなかった。これらのことから個体内においては **RIG-I** や **MDA5** によって検出される経路は最も重要な経路でないことが判明した。

(3) (2)と同様な実験を **TRIF** ノックアウトマウスならびに **MyD88** ノックアウトマウスに対して行なった。**TRIF** ノックアウトマウスにおいて、血中 IFN は検出できないほどに低下し、非神経組織における ISG の発現も低下した。これらの組織におけるウイルスの増殖は増大した。野生型マウスが死亡することがほとんどない $10^{3.4}$ PFU のウイルスに対してすべてのマウスが死亡し、ウイルス抵抗性が顕著に低下していることが判明した。

これらの結果を総合すると、ポリオウイルスの宿主による検知は主に脾臓で行なわれ、それを担っているのは **TRIF** を介する経路である。おそらく **TLR3** が重要であろうと推測される。IFN を誘導している細胞は特定できていないので特定する必要がある。

ポリオウイルスはピコルナウイルスに分類されるが、同一科に属する **EMCV** と同様に **MDA5** によって検知され得るものの、個体レベルにおいてはその影響は少ない。ポリオウイルスは **TRIF** を介する経路以外の経路は何らかの方法で回避することができる可能性が示唆された。回避のメカニズムの解明は今後の課題である。

ウイルス RNA を検知し、大量の IFN を産生する細胞として **plasmacytoid dendritic**

cell が知られ、その検知には TLR7 が関与していることが知られている。他方では TLR3 は必ずしもウイルス感染を阻止する作用をしないことが知られているが、ポリオウイルスの感染防御では TRIF 経路(おそらく TLR3 経路) が最も重要であることを見出した。ウイルスの検知システムはウイルスの多様性に対応して多様なシステムを有していると考えられる。

ポリオウイルス感染時の IFN 応答が組織によって異なるのは特定のセンサーのみで検知されていることと深く関係があると予想される。神経組織においてはポリオウイルスを有効に検知できていないと考えられるが、これは TLR3 を発現している細胞には PVR が発現していないために、感染が成立せず、その結果有効な IFN が起こらないなどの理由による可能性が考えられる。脾臓で産生された IFN は血液を介してさまざまな組織に到達するが、神経系実質までは血液脳関門を越えて到達しにくいことが知られている。そのため ISG の誘導の不均一性が生ずると考えられる。

今後、ポリオウイルスの複製様式がセンサーの特異性と関係していると考えられるので、IFN 誘導に関わっている細胞種を同定し、その細胞内におけるウイルス複製とセンサーによる検知の関係を調べる必要がある。

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 1 件)

- ① Ohka S, Igarashi H, Nagata N, Sakai M, Koike S, Nochi T, Kiyono H, & Nomoto A: Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. J. Virol. 81:7902-7912. 2007.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 小池智、安部優子、永田典代、佐多徹太郎、竹内理、審良静男: ポリオウイルス感染による IFN 応答発動経路の同定 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (岡山、2008 年 10 月 28 日)
- ② 山吉誠也、山下康子、花方信孝、箕輪貴司、竹村太郎、清水博之、小池智: エンテロウ

イルス 71 の感染性決定分子の同定 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (岡山、2008 年 10 月 28 日)

- ③ 早坂大輔、永田典代、藤井克樹、長谷川秀樹、佐多徹太郎、鈴木隆二、小池智: ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) の皮下接種マウスモデルにみられる早い時期と遅い時期の致死性、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、(岡山、2008 年 10 月 26 日)
- ④ 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、小池智: マウスモデルにおいてダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 皮下接種後にみられる早い時期と遅い時期の致死性、第 146 回日本獣医学会学術集会、(宮崎、2008 年 9 月 24 日)
- ⑤ Koike S: Interferon induction in response to poliovirus infection in the poliovirus receptor transgenic mice. 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム (兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 2008 年 9 月 11 日)
- ⑥ Koike S., Abe Y., Studies on poliovirus RNA sensors, XVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Barcelona, Spain, (2008 年 5 月 29 日)
- ⑦ Hayasaka D., Nagata N., Hasegawa H, Sata T., Koike S.: Mortality determinants of subcutaneous infection with Tick-borne encephalitis virus in mice model, 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, (Nagasaki, 2008 年 5 月 28 日)
- ⑧ 早坂大輔、小池智: ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) をマウスに皮下感染させた際の接種量の違いによる病原性発現機序の解析 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌

コンベンションセンター 2007年10月23日)

- ⑨ 安部優子、小池智：ポリオウイルス感染によるIFN応答発動に関するレセプターの検索 第55回日本ウイルス学会学術集会 (札幌コンベンションセンター 2007年10月22日)
- ⑩ 山下康子、清水博之、小池智：エンテロウイルス71感受性マウスL929細胞の樹立 第55回日本ウイルス学会学術集会 (札幌コンベンションセンター 2007年10月22日)
- ⑪ Koike, S.:Role of IFN response in the pathogenicity of neurotropic picornaviruses. 第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム (兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 2007年9月3日)
- ⑫ 小池智：ポリオの病態発現—遺伝子改変動物モデルを用いたアプローチ 第143回日本獣医学会学術集会 (つくば国際会議場 2007年4月3日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 智 (KOIKE SATOSHI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
研究者番号：30195630

(2) 研究分担者 (2007年度)

早坂大輔 (HAYASAKA DAISUKE)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：10346926

岩崎琢也 (IWASAKI TAKUYA)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：90146027

山下康子(YAMASHITA YASUKO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：80446559

安部優子(ABE YUKO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：80398156

永田典代(NAGATA NORIYO)
国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官
研究者番号：30270648

(3) 連携研究者(2008年度)

安部優子(ABE YUKO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：80398156

山吉誠也(YAMAYOSHI SEIYA)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：50525934

岩崎琢也 (IWASAKI TAKUYA)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：90146027

永田典代(NAGATA NORIYO)
国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官
研究者番号：30270648

早坂大輔 (HAYASAKA DAISUKE)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：10346926