

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19780222
研究課題名(和文) 新しい小脳形成不全疾患モデルであるヘルペスウイルス遺伝子導入マウスの分子基盤
研究課題名(英文) Molecular basis of herpesvirus transgenic mice as a new cerebellar hypoplasia model
研究代表者 富岡 幸子 (TOMIOKA YUKIKO) 北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教 研究者番号：50374674

## 研究成果の概要：

仮性狂犬病ウイルス(PRV)は動物に重篤な神経症状を引き起こすため、獣医学領域で極めて重要なヘルペスウイルスである。PRV の転写調節因子 IE180 を発現するトランスジェニックマウス (TgIE180)は小脳形成不全を呈し、IE180 が小脳の発生に影響を与えることが示唆されている。本研究では、TgIE180 の解析から、ウイルスの感染という現象を伴わず IE180 が単独で神経細胞やグリア細胞に変性・細胞死を誘発することを明らかにし、IE180 の発現によりヘルペスウイルス感染の病態が一部再現されることを示唆した。また、IE180 が細胞の恒常性維持に重要な蛋白質分解経路に関連する宿主分子に作用し、異常蛋白質の蓄積を促進する可能性を示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：トランスジェニックマウス、ヘルペスウイルス、神経病理

## 1. 研究開始当初の背景

神経向性ウイルスによる病原性の分子機構に関する研究の多くはウイルスの直接的な神経侵襲に関与するものである。これに対し、申請者は神経向性ウイルスの遺伝子発現

調節因子が宿主の遺伝子発現を攪乱し病原性が発揮される分子機構を解明するため発生活工学手法を用いて解析している。PRV は家畜に激しい神経症状を起こすことから、獣医学領域で重要な神経向性ウイルスである。ま

た、医学領域においても同じ $\alpha$ -ヘルペスウイルスに属する単純ヘルペスウイルスとの比較解析や、その明確な神経伝達性を利用した神経科学研究のツールとして知られている。PRVの前初期蛋白IE180は他のヘルペスウイルスと同様に感染後最初に転写・翻訳され、ウイルスの複製を制御する。前初期蛋白は自己のみならず、宿主細胞や異種ウイルスの遺伝子発現にも影響を及ぼすことが報告されていることから、生体におけるIE180の発現により何らかの病原性が発揮される可能性が予想された。そこで以前に申請者らの研究グループは、ヘルペスウイルス蛋白質が単独で病原性を有するかを調べるために、全身でIE180を発現するトランスジェニックマウス(TgIE180)を作製・解析した。このマウスは小脳形成不全を呈し、IE180の発現が小脳の発生に影響を与えることが示唆された。しかしながら、IE180が宿主の遺伝子発現に影響を及ぼし小脳形成異常を起こすメカニズムは未だ不明である。

ヘルペスウイルスの遺伝子は多種多様でその機能解析に関する研究は膨大に行われており、ウイルス遺伝子産物と相互作用する細胞側因子の研究は近年著しく進んでいるにもかかわらず、 $\alpha$ -ヘルペスウイルスの遺伝子発現調節因子が、ウイルス感染・複製という現象を伴わず単独で病原性を発揮するということを*in vivo*で立証した疾患モデル動物は他に例を見ない。また、近年になって、獣医学領域や医学領域で新しい病原性ヘルペスウイルスが分離されたり、既知のヘルペスウイルスがアルツハイマー病等の様々な神経疾患のリスクファクターになる可能性が報告されたりしていることから、ヘルペスウイルスの病態発現メカニズムにはまだ知られていない側面が多くあると考えられる。このような背景から、本研究では、TgIE180の分子基盤を明らかにし、新規の小脳形成不全疾患モデルとして確立するとともに、ヘルペスウイルスの新しい病態発現メカニズムを提唱することを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、TgIE180の分子基盤を明らかにし、新規の小脳形成不全疾患モデルとして確立するとともに、ヘルペスウイルスの新しい病態発現メカニズムを提唱するために、「IE180は小脳形成期において、いつ、どのような種類の細胞で発現し、細胞単位ではどのような障害を誘発するのか」「IE180はどのような宿主因子に干渉しているのか」を明らかにしたいと考えた。具体的には、(1)小脳形成期におけるIE180の発現と病態発現、細胞増殖活性、アポトーシス、細胞周期調節因子発現との関連の形態学的検索、(2)IE180による細胞移動阻害の検証、(3)IE180と相互作用する宿主分子の探索、(4)IE180により間接的・直接的に発現が制御される宿主分子の探索、の4項目を実施することとした。

## 3. 研究の方法

(1) IE180による小脳発生異常に関わる分子を絞り込むために、小脳原基の発生が始まる胎生10日から外顆粒層の移動が終了する生後20日まで経時的に小脳を採取し、病理組織学的ならびに免疫組織化学的にIE180発現時期と病態発現時期を明らかにする。また、各種細胞マーカーとIE180の蛍光多重免疫染色を実施し小脳形成期のIE180発現部位を特定する。同様の方法でIE180と各種細胞増殖マーカー、アポトーシスマーカー、細胞周期調節因子の局在を調べる。

(2) IE180が神経系で特異的に病原性を発揮する第一の理由として、中枢神経系で特異的に発現あるいは機能する蛋白質と相互作用する可能性が考えられる。これらIE180と相互作用する蛋白質を免疫組織化学および免疫沈降実験等で探索する。特に、IE180と共局在する可能性がこれまでに示唆された細胞周期調節因子Cyclin D1について、まずIE180との免疫沈降実験を行い、相互作用するかを検証する。また、トランスフェクションによって星状膠細胞あるいは神経芽細胞由来の株化培養細胞にIE180を一過性に発現

させた場合、Cyclin D1 の発現量や局在に変化が見られるか蛍光多重免疫染色によって検証する。

(3) IE180 と相互作用する可能性が疑われた宿主分子について、IE180 によってその発現が制御されるか、免疫染色・ウェスタンブロット法にて検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

①小脳形成不全の本態と発症メカニズムを解明するため詳細な病理組織学的解析を行ったところ、免疫組織化学的に、IE180 は主に小脳形成期のダイナミックな細胞移動を司るグリア細胞（星状膠細胞）で多く発現していることが明らかになった（図1）。

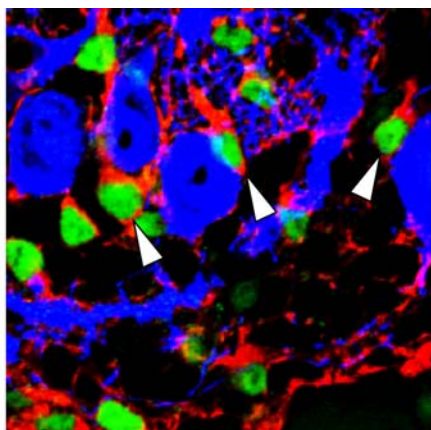


図1. 小脳の細胞移動を司るグリア細胞の核におけるIE180の発現（矢頭）。緑：IE180、赤：グリア細胞（星状膠細胞）、青：神経細胞（プルキンエ細胞）。

また、それより少数ではあるが神経細胞の核においてもIE180が発現していることが明らかになった。さらに、TgIE180の小脳ではプルキンエ細胞および顆粒細胞の変性・減数・異所性配列（図2）、バーグマングリアの発達異常、抑制性介在ニューロンの消失、シナプスの減数・変性・配置異常（図3）が確認された。

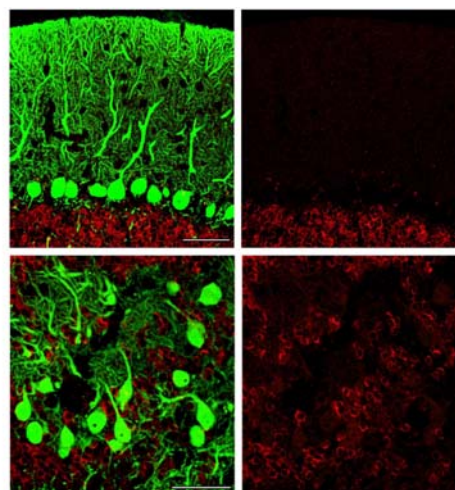


図2. プルキンエ細胞（緑）および顆粒細胞（赤）の異所性配列。上段：野生型、下段：TgIE180。

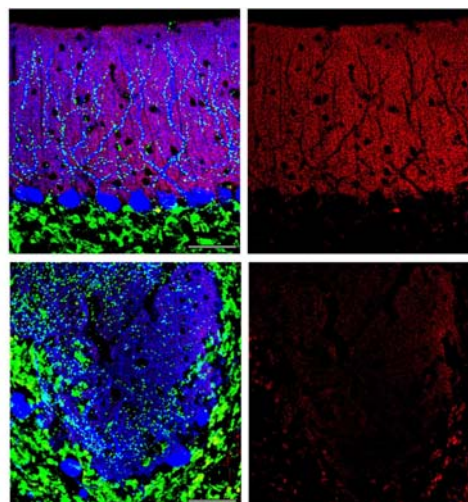


図3. 抑制性シナプス（赤）の減数と配置異常。上段：野生型、下段：TgIE180。

②若齢個体では星状膠細胞だけでなく神経細胞でもIE180が強く発現しており（図4）、これら発現細胞は変性ないし細胞死していることが明らかになった。これらの細胞の一部はアポトーシス染色で陽性だった（図5）。IE180陽性細胞数は発達と共に減少することから、IE180を強発現した細胞が細胞死に陥り脱落していると推察された。神経細胞の変性・細胞死が認められる点においてTgIE180マウスとPRV感染動物の病態は類似してお

り、IE180 の発現によりウイルス感染の病態が一部再現されることが示唆された。さらに詳細な病理組織学的解析を行ったところ、IE180 は胎児の器官形成期から発現し、発現細胞は変性・細胞死に陥ることが明らかになった。

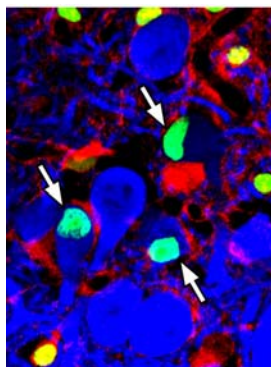


図4. TgIE180若齢個体の小脳の神経細胞におけるIE180の発現(矢印)。緑: IE180、赤: グリア細胞(星状膠細胞)、青: 神経細胞(プルキンエ細胞)。

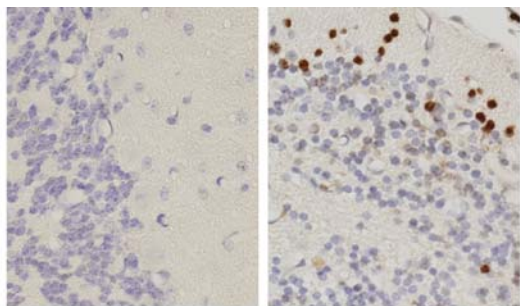


図5. TgIE180マウス小脳におけるアポトーシスシグナル(茶褐色)の増加。左: 野生型、右: TgIE180。

③当初、IE180 と相互作用する可能性があるとして推測していた細胞周期調節因子 Cyclin D1 について、TgIE180 マウスの組織およびIE180 を強制発現させた細胞を用いて免疫沈降実験や蛍光多重免疫染色を実施したが、明らかな相互作用を示す結果は得られなかった。

一方で、野生型マウスでは蛋白質分解経路で選択的に分解される p62 蛋白質が、TgIE180 マウスの神経細胞では異常凝集していること、超微形態学的解析では異常なリソソームの集積が認められることが明らかになった。これらの成績から、1) TgIE180 マウスの病態発現においてグリアの傷害による細胞移動異常に加えて、蛋白分解の異常を伴う神経細胞の変性・細胞死が重要な意義を持つこと、2) IE180 が細胞の恒常性維持に重要な蛋白質分解経路に関連する何らかの宿主分子に作

用し、異常蛋白質の蓄積を促進することが推察された。

## (2) 得られた成果の意義と今後の展望

ウイルスの感染現象を伴わず単独のヘルペスウイルス蛋白質が神経細胞およびグリアに変性・細胞死をもたらし、神経病態を一部再現できることを示した点で本研究のインパクトは大きい。また、IE180 による病態発現において、グリア細胞の傷害に起因する小脳形成期の細胞移動障害だけでなく、神経細胞やシナプスへの直接的な傷害が重要な要素となることを示すことができた。特に、IE180 発現細胞において、蛋白質分解異常を強く示唆する所見が得られたことは、ヘルペスウイルスの新しい病態発生メカニズムを提唱する重要な糸口となった。したがって、今後は、異常蛋白質の分解に機能して細胞の恒常性維持に働く宿主分子とIE180 の相互作用に焦点を絞って解析を進め、ヘルペスウイルス蛋白質が異常蛋白質の分解という生体の自浄機構を妨げることで、アルツハイマー病などの神経変性疾患発症の一因となりえることを検証する予定である。

## 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 4 件)

1. Tomioka, Y., Morimatsu, M., Amagai, K., Kuramochi, M., Watanabe, Y., Kouda, S., Wada, T., Kuboki, N., Ono, E. Fusion protein consisting of the first immunoglobulin-like domain of porcine nectin-1 and Fc portion of human IgG1 provides a marked resistance against pseudorabies virus infection to transgenic mice. *Microbiol. Immunol.* 53 (2009) 8-15. 査読有
2. Tomioka, Y., Miyazaki, T., Taharaguchi, S., Yoshino, S., Morimatsu, M., Uede, T., Ono, E., Watanabe, M. Cerebellar pathology in

transgenic mice expressing the pseudorabies virus immediate-early protein IE180. Eur. J. Neurosci. 27 (2008) 2115-2132. 査読有

3. Yoshida, K., Tomioka, Y., Kase, S., Morimatsu, M., Shinya, K., Ohno, S., Ono, E. Microphthalmia and lack of vitreous body in transgenic mice expressing the first immunoglobulin-like domain of nectin-1. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 246 (2008) 543-549. 査読有

4. Ono, E., Tomioka, Y., Taharaguchi, S. Possible roles of transcription factors of pseudorabies virus in neuropathogenicity. Fukuoka Igaku Zasshi. 98 (2007) 364-372. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 富岡幸子、仮性狂犬病ウイルス前初期蛋白 IE180 発現マウスにおける小脳形成不全の病理組織学的解析、第 145 回日本獣医学会学術集会、2008.3.28、麻布大学

2. 富岡幸子、仮性狂犬病ウイルスの転写調節因子 IE180 の発現による神経病理発生メカニズムの解析、第 30 回日本分子生物学会年会、2007.12.14、パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富岡 幸子 (TOMIOKA YUKIKO)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：50374674

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし