

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19780224

研究課題名（和文） ウエストナイルウイルスの中樞神経系侵入メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism of neuroinvasion of West Nile virus

研究代表者 長谷部 理絵 (HASEBE RIE)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：70431335

研究成果の概要：

北アメリカで流行しているウエストナイルウイルス (WNV) NY 株は患者の 30～40% に脳炎を引き起こす。WNV は蚊の吸血により感染し、血行性に中枢神経系 (CNS) に伝播されるが、WNV が血管内皮細胞を通過し、CNS に侵入するメカニズムは明らかにされていない。本研究の目的はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の単層培養系を用いて、WNV が血管内皮細胞を通過するメカニズムを明らかにし、WNV の CNS への侵入メカニズムを考察することである。

19 年度は、WNV ウイルス様粒子 (VLPs) が血管内皮細胞を通過するメカニズムに焦点を当てた。HUVEC をトランスウエルに単層培養し、WNV 6LP 株の構造タンパク質を持つ VLPs (6-LP VLPs) と Eg 株の構造タンパク質を持つ VLPs (Eg VLPs) の透過性を評価した。その結果、6-LP VLPs は HUVEC を通過するが、Eg 株は通過しないことが示された。また、6-LP VLPs は lipid raft 関連小胞により HUVEC を通過することが示唆された。

20 年度は小胞輸送に関与するウイルス側因子に焦点を当てた。6LP 株と Eg 株のエンベロープ (E) タンパク質を入れ替えたキメラ VLPs を作出し、HUVEC の透過性を評価したところ、HUVEC における WNV の小胞輸送には E タンパク質に依存することが示された。また、6LP 株と Eg 株で異なる 4 ヶ所のアミノ酸を 1 ヶ所 (single mutant) または 2 ヶ所 (double mutant) 入れ替えた変異 VLPs を作出し、HUVEC の小胞輸送に重要なアミノ酸を決定した。その結果、WNV の小胞輸送には E タンパク質の複数のアミノ酸が関与し、特に 156 番目のアミノ酸がセリン、159 番目がバリンという組み合わせが重要であることが示唆された。

以上の結果より、WNV の CNS への侵入経路の一つとして、血管内皮細胞の小胞輸送を利用している可能性が考えられた。また、血管内皮細胞におけるウイルスの輸送は E タンパク質のアミノ酸配列により決定されることが示唆された。

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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：ウエストナイルウイルス、血管内皮細胞、小胞輸送、E タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ウエストナイルウイルス(WNV)は1994年以前からアフリカ、ヨーロッパ、西アジアに分布し、人や馬などに発熱や脳炎を引き起こすことが知られていたが、脳炎・髄膜炎による重篤な症状が見られるのは患者の約1%といわれ、大きな流行もみられなかった。

しかし、1994年以降、ルーマニア、ロシア、イスラエルなど各地で比較的大きな流行が起こり、数百人規模のウエストナイル熱、脳炎患者が発生した。WNVは1999年北アメリカに侵入し、米国のニューヨーク市で初めて患者が報告されて以来、年々感染地域は拡大し、毎年患者は数千人、死者は数百人規模の大流行となっている。

北米で流行しているNY株は、従来の株よりも神経病原性が強く、患者の30~40%が脳炎を発病する。また、北アメリカでは鳥、馬、その他の哺乳動物でも感染、脳炎発症、死亡が報告されている。

WNVは蚊の吸血により感染し、血行性に中枢神経系(CNS)に伝播される。脳血管内皮細胞は末梢の血管内皮細胞とは異なり、タイトジャンクションを有し、物質の透過を制限している。ウイルスがCNSに侵入するためには、脳血管内皮細胞を通過しなければならないが、WNVが血管内皮細胞を通過し、CNSに侵入するメカニズムは明らかにされていない。また、CNS侵入に関与するウイルス側因子は同定されていない。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究の目的は、WNVが血管内皮細胞を通過するメカニズムを解析し、それに関与するウイルス側因子を同定することである。得られた結果より、WNVのCNSへの侵入メカニズムを考察する。

3. 研究の方法

血管内皮細胞培養

本研究では、脳血管内皮細胞と同様に極性とタイトジャンクションを有するヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を脳血管内皮細胞のモデルとして用いた(図1)。HUVECをトランスウエル(孔径0.4 μ m)に単層培養し、タイトジャンクションを形成させ、

Transendothelial electronic resistance (TEER)を測定した。TEERが600 Ω /cm²のものを実験に用いた。

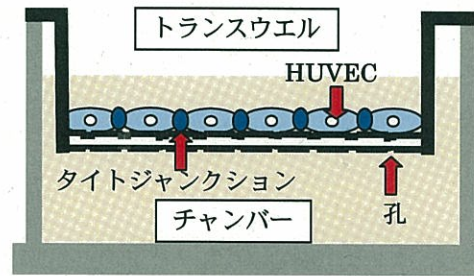


図1. 本研究で用いた脳血管内皮細胞モデル。径0.4 μ mの孔を持つトランスウエルにHUVECを単層培養し、タイトジャンクションを形成させた。

Virus like particles の作出

P. Mason 博士(University of Texas Medical Branch)より分与された WNV replicon と WNV の構造遺伝子の配列を含むプラスミドを BHK 細胞に予トランスフェクションすることにより、VLPs を作出した。VLPs はウイルス粒子と同様の構造を持つため、感染性を有するが、VLPs に含まれる replicon は構造遺伝子の配列を含まないため、子孫ウイルスが複製されない(図2)。NY99 由来 6-LP 株の構造タンパク質を持つ VLPs (6-LP)、Eg 株 VLPs (Eg VLPs)、6-LP 株と Eg 株のキメラ VLPs、変異 VLPs を作出し、実験に用いた。

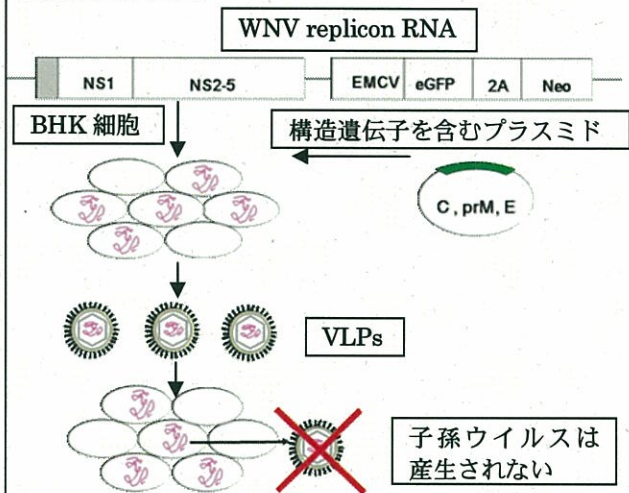


図2. 本研究で用いた VLPs システム。

VLPs の血管内皮細胞通過メカニズムの解析

トランスウエルに単層培養した HUVEC に 6-LP VLPs、Eg VLPs を感染させ、下のチャンバーに通過した VLPs 量を測定した。タイトジャンクションマーカーである ZO-1 の免疫染色を行い、VLPs がタイトジャンクションの構造に及ぼす影響を評価した。

HUVEC を Chlorpromazine (クラスリン小胞形成阻害剤)、または Filipin (lipid raft 関連小胞形成阻害剤) で前処理し、VLPs の透過実験を行った。

VLPs の血管内皮細胞通過に関与するウイルス側因子の解析

キメラ VLPs、変異 VLPs の透過実験を行い、血管内皮細胞の通過に関与するエンベロープ(E)タンパク質のアミノ酸配列を決定した。

4. 研究成果

(1) VLPs の血管内皮細胞通過メカニズムの解析

①6-LP VLPs は血管内皮細胞を通過する

トランスウエルに培養した HUVEC に 6-LP VLPs, Eg VLPs を感染させ、0、8、24 時間後に通過した VLPs 量を測定した。6-LP VLPs は 8 時間後から下のチャンパーに VLPs が検出され、24 時間後にはトランスウエルに接種した 1/10 の VLPs が通過した。しかし、Eg VLPs はほとんど通過しなかった。

②6-LP VLPs は血管内皮細胞のタイトジャンクションの構造を変化させない

6-LP VLPs 感染 24 時間後にタイトジャンクションマーカー(ZO-1)の免疫染色を行った。その結果、タイトジャンクションの構造には変化がなく、VLPs は細胞間を通過するのではないことが示唆された。

③VLPs は小胞輸送により血管内皮細胞を通過する

クラスリン小胞形成阻害剤である Chlorpromazine、または Lipid raft 関連小胞阻害剤である Filipin で HUVEC を前処理したのち、VLPs の透過実験を行った。VLPs の通過は Filipin により阻害されたことから、VLPs は Lipid raft 関連小胞により血管内皮細胞内を輸送されることが示唆された。

(2) VLPs の血管内皮細胞通過に関与するウイルス側因子の解析

①VLPs の小胞輸送は E タンパク質に依存する

6-LP VLPs と Eg VLPs の E タンパク質を入れ替えたキメラ VLPs を作出し、透過実験を行った。その結果、6-LP の E タンパク質を持つ VLPs が血管内皮細胞を通過することが示された。

②VLPs の小胞輸送には E タンパク質の複数のアミノ酸が関与する

6-LP 株と Eg 株では、E タンパク質の 4 か所 (aa.93, 126, 156, 159) のアミノ酸が異なる。それぞれのアミノ酸を入れ替えた変異

VLPs を作出し、透過実験を行った。6-LP の aa.156, aa.159 を Eg の配列に置き換えた VLPs では透過性が減少したが、Wild type の Eg VLP より透過性が高かった。また、Eg の aa.159 を 6-LP の配列に置き換えた VLPs では透過性が上昇したが、Wild type の 6-LP VLPs より透過性が低かった。Eg の aa.156 を 6-LP の配列に置き換えたものでは、透過性が上昇することが予想されたが、逆に Wild type の Eg よりも透過性が有意に減少した。以上の結果より、VLPs の小胞輸送には E タンパク質の複数のアミノ酸が関与することが示唆された。

③VLPs の血管内皮細胞の通過には E タンパク質の aa.156S と aa.159V の組み合わせが重要である

aa.156 と aa.159 の両方を入れ換えた変異 VLPs を作出し、透過実験を行ったところ、6-LP の配列をもつ VLPs は Wild type 6LP VLPs と同程度に HUVEC を通過し、Eg の配列をもつ VLPs は Wild type と同様に透過性が低かった。

これらの結果から、VLPs の血管内皮細胞の通過には aa156 と 159 の組み合わせが重要であることが示唆された。

考察

以上の結果より、WNV が血管内皮細胞を通過し、CNS に侵入する過程には血管内皮細胞の小胞輸送が関与する可能性が示唆された(図 3)。WNV 感染では、末梢組織でのウイルスの増殖に伴い、TNF- α の産生が上昇し、ウイルスの CNS 侵入に関与することが報告されている。一般的に血管内皮細胞の小胞輸送は TNF- α などのサイトカインにより促進されることが知られており、WNV の CNS への小胞輸送も TNF- α により制御されている可能性も考えられた。また、ウイルスの小胞輸送には E タンパク質の aa.156 と aa.159 が関与することが示された。

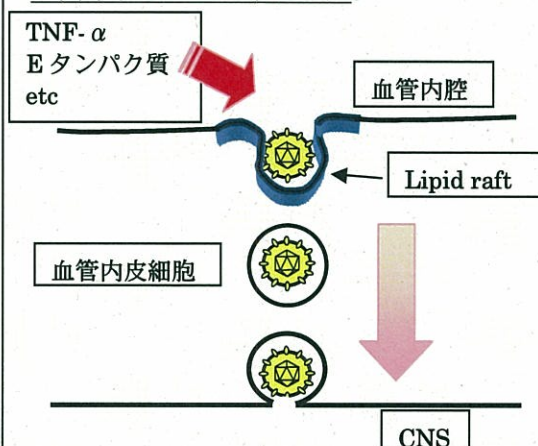


図 3. WNV の CNS 侵入メカニズムの仮説。WNV は血管内皮細胞の小胞輸送により CNS

に侵入する。小胞輸送は TNF- α などのサイトカインやウイルスの E タンパク質により制御される。

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) (全て査読有り)

1. Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M, 2009. The effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prion. *J. Virol.* Epub ahead of print.

2. Shindoh R, Kim CL, Song CH, Hasebe R, Horiuchi M, 2009. The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J. Virol.* Epub ahead of print.

3. 長谷部理絵, 2008. プリオン病の ABC. *SAC.* 152, 4-9.

4. Song CH, Furuoka H, Kim CL, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M, 2008. Effect of intraventricular infusion of anti-prion monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice. *J. Gen. Virol.* 89, 1533-1544.

[学会発表] (計 10 件)

1. 宋昌鉉, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン感染マウスにおける骨髄由来間葉系幹細胞の動態. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 28 日. 岡山県岡山市, 岡山コンベンションセンター.

2. 堀内基広, 長谷部理絵. PrP^{Sc} の aa81-aa137 の領域はプリオンの感染性に必須である. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 28 日. 岡山県岡山市, 岡山コンベンションセンター.

3. 牧野吉倫, 鈴木忠樹, 長谷部理絵, 前田秋彦, 高橋秀宗, 木村享史, 澤洋文. 蛍光ウイルス粒子を用いたウエストナイルウイルス侵入過程の可視化. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26 日. 岡山県岡山市, 岡山コンベンションセンター.

4. Song C, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. 2008. Migration of mesenchymal stem cells to brain lesion of prion disease. *Prion* 2008. Oct 8, 2008.

Auditorium Hotel, Madrid, Spain.

5. Shindo R, Kim C, Song C, Hasebe R, Horiuchi M. Conformational stability and infectivity of protease-resistant prion protein derived from the Chandler strain. *Prion* 2008. Oct 8, 2008. Auditorium Hotel, Madrid, Spain.

6. 堀内基広, 瓜生匡秀, 山崎剛士, 中満智史, 長谷部理絵. マウス神経芽腫細胞 Neuro2a におけるプリオンの細胞伝播にはエクソソーム以外の因子が関与する. 第 146 回日本獣医学会学術集会. 2008 年 9 月 24 日. 宮崎県宮崎市, ワールドコンベンションセンター・サミット

7. 長谷部理絵, 牧野吉倫, 鈴木忠樹, 前田秋彦, 堀内基広, 澤洋文, 木村享史. ウエストナイルウイルスの血液脳関門の通過には E タンパク質の複数のアミノ酸が関与する. 日本ウイルス学会北海道支部会, 第 42 回夏季シンポジウム. 2008 年 7 月 26 日. 北海道ニセコ町, ホテルニセコいこいの村.

8. 長谷部理絵, 木村享史, 梅村孝司. 馬ヘルペスウイルス 1 型神経病原性の in vivo, in vitro 解析. 第 145 回日本獣医学会学術集会. 2008 年 3 月 28 日. 神奈川県, 麻布大学.

9. Makino Y, Suzuki T, Hasebe R, Maeda A, Takahashi H, Kimura T, Sawa H. Visualization of West Nile virus particles for examination on the cellular entry mechanism. 8th International Symposium on NeuroVirology, Oct 30, 2007. San Diego, USA.

10. Hasebe R, Kimura T, Sawa H, Wada R, Umemura T. Infectious entry of equine herpesvirus-1 into host cells through different endocytic pathway. American Society for Virology, 26th Annual Meeting. July 15, 2007. Oregon State University, Oregon, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷部理絵 (HASEBE RIE)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号: 70431335

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし