

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790332

研究課題名(和文) ポリオウイルス経口感染機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of poliovirus oral infection

研究代表者

大岡 静衣 (OHKA SEI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80313097

研究成果の概要：

我々は胃酸によりポリオウイルス(PV)が失活することを見出したため、胃酸の影響を受けずに直接小腸へウイルスを導入できる腸溶性カプセルを用いた経口投与法を確立した。カニクイザルに PV 液含有腸溶性カプセルを経口投与したところ、小腸からの感染は成立することが示唆された。サル小腸へ効率的に PV を導入したにも関わらず、ヒトと比較して圧倒的に感染効率が低いことから、自然免疫の種差により扁桃や小腸組織内での PV 増殖効率が変化するためである可能性が考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

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：病原性

1. 研究開始当初の背景

ポリオウイルス(PV)は急性灰白髄炎(小児まひ)の原因ウイルスである。PV 根絶に向けて PV 生ワクチンが主に用いられているが、近年 PV 生ワクチン由来変異ウイルス自体が流行を引き起こすことが明らかになった。これを受け世界保健機関(WHO)は、次世代ワクチンを開発する必要性を認めた(Heymann D.L., *et al.*, 2005)。また、次世代ワクチン、予防・治療薬が開発されるま

では、現在のワクチンを使い続ける必要性が世界的に認められている(Ago I V. I., *et al.*, 2005)。

ヒトが PV を経口摂取すると、容易に腸管感染が成立する。ヒトにおいて PV は経口で侵入し、消化管などで増殖後血中に入りウイルス血症となり、その後中枢神経系内へ侵入し運動神経で増殖し四肢に麻痺を引き起こすと考えられている。この経口感染経路は、ヒトにおいて最も主要かつ重要な経路であ

るにも関わらず、これまで全く未解明だった。その主な原因は、ウイルス血症以降の伝播経路について PV 感染モデル動物として用いられている、ヒト PV 受容体 (hPVR/CD155) 発現トランスジェニックマウス (Tg) およびサルにおいて、経口感染がこれまで成立しなかったためである。したがって、まず経口感染が成立する感染モデル動物系を確立することが重要と考えられた。

上述の通り、経口感染モデル動物が存在しなかったため、PV 経口感染系の研究は世界的にほとんど行われてきていない。hPVR は PV 感染初期段階に重要な役割を果たすことが知られている。ところが、数少ない報告例では、hPVR-Tg 腸管に hPVR が発現しているにも関わらず、PV 経口感染が成立しなかったという報告がある (Zhang S., *et al.*, 1997)。血液脳関門の PV 透過に関して我々がこれまでに得た結果より、トランスフェリン受容体が PV に結合し、PV のトランスサイトシスに参与する可能性が考えられ (論文準備中)、小腸においてもこういった hPVR 以外の受容体が関与している可能性も考えられる。したがって、小腸上皮における hPVR の発現分布のみでは PV 感染モデル動物における経口感染に対する感受性の低さを説明できない可能性もある。

我々は、これまで hPVR-Tg において PV 経口感染が成立しなかった原因のいくつかを明らかにすることにより、マウスにおける PV 経口感染系を確立することに世界に先駆けて成功した (Ohka S., *et al.*, 2007.)。まず、i) マウス胃内の低 pH により、PV が感染性を失うことを明らかにした。また、ii) 1 型インターフェロン受容体欠損 hPVR-Tg における経口感染系を確立した。これにより、1 型インターフェロンがマウスにおける PV 経口感染防御に寄与していることが明らかになった。さらに一段階進め、1 型インターフェロン受容体を欠損しておらず正常な先天性免疫システムを持つ hPVR-Tg においても腸管で増殖し経口感染が成立する、腸管適応 PV 変異株を分離することに我々は成功している。これにより、正常な先天性免疫システムを持つ hPVR-Tg において、上記腸管適応 PV 変異株を用い、経口感染メカニズムを解析することが可能になった。

参考文献

Heymann D.L., Sutter R.W., and Aylward R.B. (2005) A global call for new polio vaccines. *Nature*. 434:699-700.

Agol V.I., Chumakov K., Ehrenfeld E., and Wimmer E. (2005) Don't drop current vaccine until we have new ones. *Nature*. 435:881.

Zhang S., and Racaniello V.R. (1997)

Expression of the poliovirus receptor in intestinal epithelial cells is not sufficient to permit poliovirus replication in the mouse gut. *J. Virol.* 71:4915-4920.

Ohka S., Igarashi H., Nagata N., Sakai M., Koike S., Nochi T., Kiyono H., and Nomoto A. (2007) Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor (hPVR/CD155)-expressing transgenic mice which are deficient in interferon- α/β receptor. *J. Virol.* 81:7902-7912.

2. 研究の目的

正常な先天性免疫システムを持つ hPVR-Tg において、腸管適応 PV 変異株がどういったバリアーを超えることにより経口感染できるようになったのかを解明する。この知見は、ヒトにおいて PV 経口感染が成立しやすい原因を解明する手がかりとなる。また、上記腸管適応 PV 変異株を、胃で失活しない方法でサルに経口投与することにより、サルにおける経口感染系を確立できる可能性も高い。これらの系を駆使し、これまで解析不可能だった PV 経口感染後の PV 体内伝播経路・感染機構を、経口感染モデルマウスおよびサルにおいて解明する。以上から得られる知見は、PV の体内伝播・感染機構解明に繋がるのみならず、PV 感染予防・治療薬、次世代ワクチンの開発に貢献できる可能性が非常に高い。

3. 研究の方法

(1) 正常な先天性免疫システムを持つ PV 感受性モデルマウス (hPVR-Tg) において経口感染が成立する腸管適応 PV 変異株のクローニングと腸管適応原因変異の同定

上記腸管適応 PV 変異株のクローニングを行い、腸管適応原因変異を同定する。腸管適応 PV 変異株のクローニングは難しいが、その原因をこれまでに明らかにした。まず、i) 変異株は特定の培養細胞内では、増えにくいため変異株のポピュレーションが下がりやすい。また、ii) 現有の変異株は小腸組織で部分的に増殖していると考えられるうえ、iii) 小腸上皮組織は短期間でターンオーバーするため、サンプル採取のタイミングによりウイルスの回収効率が悪いことがわかった。これらの点を改良しクローニングを成功させるために、以下のように行う。

上記変異株の性質を維持しつつ、変異株の高いポピュレーションを維持したままで、より安定的に増殖可能な培養細胞系および培養条件の検討を続ける。

同時に、これまでに得られている変異株よりもさらに腸管適応性の高い変異株を、高いポピュレーションで得る。具体的には、hPVR-Tg に変異株を経口投与し、小腸および糞便からウイルスを回収する。回収したウイルスを、増殖に適した培養細胞に高い m.o.i. で感染させて増やし、できるだけ継代の少ないウイルスストックを再度 hPVR-Tg に経口投与することを繰り返し、腸管での複製能または病原性が圧倒的に高い変異株を得る。

変異株の増殖に適した培養細胞において変異株の単一プラークを単離する。変異株の増殖に適した培養細胞に、単離したウイルスを高い m.o.i. で感染させることにより全体としての変異株ポピュレーションを維持するように、変異株を複数単離・増幅する。それらの単離した変異株の経口感染能を hPVR-Tg において確認する。PV cDNA の簡便なクローニング系（全長約 7.5 kb の一本鎖プラス鎖 RNA ウイルスである PV から、RNA 抽出、cDNA 合成後、high fidelity PCR により PV 全長のゲノムを増幅し、ベクターにクローニング）を既に確立しているので、この系を用いて経口感染能が高い変異株をクローニングする。クローニングされた変異株 cDNA から変異株 RNA を合成し、変異株の増殖に適した細胞にトランスフェクションし、変異株を回収する。得られた変異株クローンの経口感染能を hPVR-Tg を用いて確認し、経口感染能が高いものについて、全塩基配列を決定する。または、

小腸組織あるいは糞便から得られた変異株ウイルス液の力価が十分に高い場合には、得られたウイルス液から直接クローニングを行うとともに、ダイレクトシーケンスも行う。得られたクローンについて、経口感染能を hPVR-Tg において確認する。経口感染能が高い変異株クローンについて、全塩基配列を決定する。また、上記ダイレクトシーケンスの結果、変異が見つかった場合、それらの変異を導入した感染性 cDNA を人為的に作製することも可能である。そこから変異株 RNA を合成し細胞にトランスフェクションすることにより得られた変異株クローンについて hPVR-Tg を用いて経口感染能を確認する。

変異塩基のうち腸管増殖能または経口感染後の病原性発現の原因となる変異塩基を解明するため、親株と変異株を組換えた、組換え感染性 cDNA を作製し、それをもとに組換えウイルスを得る。その経口感染能を hPVR-Tg で確認することにより腸管適応原因変異を同定する。

(2)hPVR-Tg における PV 経口感染後の伝

播・感染機構の解析

(1)を終了後、(2)に着手する。hPVR-Tg に腸管適応 PV 変異株を経口投与後の PV 伝播・感染機構を検討する。

hPVR-Tg に親株と腸管適応 PV 変異株を経口投与し、臨床症状の経時変化、および投与 PV 力価に対する発症確率を観察する。また、腸管および脳、脊髄、血液を経時的に採取し、PV 力価を測定し、どの組織でどのタイミングで変異株が増えやすくなるかが hPVR-Tg における経口感染成立に寄与しているのか等を明らかにする。

PV が経口感染後どのように中枢神経系内へ伝播していくかを調べるため、hPVR-Tg に腸管適応 PV 変異株を経口投与し、経時的に灌流固定し全身サンプルを採取し、組織の切片を凍結切片作製装置で作製し、免疫組織染色法により PV 存在部位を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。また同時に、病理組織学的解析も行い、PV の複製部位および伝播経路を詳細に解析する。必要に応じて、親株との比較を行う。

親株および腸管適応 PV を hPVR-Tg に経口感染後、腸管等におけるインターフェロン応答を確認し、変異株は腸管の細胞に適応したのか、インターフェロンのバリアーを超えられるようになったのか等の可能性を検討する。

(3) サルにおける PV 経口感染実験

サルの胃内低 pH で PV が失活しないように投与する方法を確立し、PV 経口感染後の伝播経路を解析する。

サルにおいて、胃内低 pH で PV が失活しないように投与する方法としては、i) 麻酔下胃ゾンデでウイルス液を胃内へ注入するか、ii) 腸溶性カプセルにウイルス液を充填し経口投与する方法がある。i) は投与時の操作によりできる傷口から血中へウイルスが侵入するアーティファクトが無視できないため、ii) の腸溶性カプセルによる経口投与系を確立する。腸溶性カプセルが腸に到達して始めて溶解できるようにするには、充填するウイルス液の pH や組成を検討する必要がある。そこでまず、マウスにおいてマウス用腸溶性カプセルによりウイルスが失活せずに腸内へ送達される条件を検討する。マウス用腸溶性カプセルに pH や組成の異なるウイルス液を充填し、一定時間後に小腸内容物を回収し、ウイルス力価を測定する。腸溶性でないカプセルにウイルス液を充填したものを投与した場合と比較、および投与量に対する小腸からの検出効率を検討し、充分量のウイルスが小腸へ送達されている条件を採用する。

同様な条件でサル用腸溶性カプセルにウイルス液を充填し、カニクイザルに経口投与し、麻痺等の臨床症状の観察、糞便からのウイルス・抗 PV IgA 抗体の検出、血中ウイルスおよび血中抗 PV 抗体の検出を4週間にわたり行う。まず、糞便中から充分量のウイルスが検出されれば、ウイルスが小腸まで送達されていたと考える。それでもなお臨床症状や抗 PV 抗体価の上昇が観られなかった場合、投与力価を増やすことを検討する。

経口感染後、ウイルス増殖、排泄、麻痺の発症を示した場合、小腸上皮細胞のどの細胞にウイルスが取り込まれどこで増殖するか、また中枢神経系への侵入部位を明らかにするため病理解剖を行い、解析する。

4. 研究成果

我々は胃酸により PV が失活することを見出したため、腸溶性カプセルを用いて PV 強毒株をカニクイザルに経口投与した。以前に報告されているサルへの経口感染実験では、胃ゾンデで胃内に直接ウイルスを注入していたが、ウイルスの付着したゾンデが咽頭を通るために咽頭からアーティファクトによる感染も成立している可能性が充分に考えられる。そこで、カニクイザルにおいてアーティファクトによる感染がなく安定して経口投与可能な PV 含有腸溶性カプセルの作製方法と経口投与方法を確立した。

この方法を用いて PV 強毒株をカニクイザルに経口投与した。小腸内へ PV 投与した個体において、髄膜炎および血中抗体価の上昇が観られたことから、PV 強毒株による腸からの感染がカニクイザルにおいて成立していることが示唆された。咽頭でカプセルが破壊され、咽頭からの感染が疑われる個体もあり、咽頭からの感染も否定できないことから、腸溶性カプセル投与方法の改善に加え、咽頭および小腸からの感染を区別して感染伝播機構を解析していく必要性が示された。

そこで、腸溶性カプセルを用いた経口投与方法を改良し、カニクイザルに PV 強毒株ウイルス液を扁桃に滴下、または PV 強毒株含有腸溶性カプセルを経口投与した。扁桃接種群3頭中1頭において、接種7~10日後まで軽度の麻痺が認められ、その個体において視床の下部にグリオーシス、血管周囲性細胞浸潤、髄膜炎が見られた。残りの2頭のうち1頭では、四肢の脱力が若干見られ、組織学的には視床部位に一カ所だけわずかな炎症性細胞浸潤が見られた。PV 抗原が確認されなかったため上記炎症性変化が PV 感染によるかは現段階では不明であるが、咽頭からも PV 感染が成立する可能性は考えられる。残る1頭では臨床経過、組織学的所見ともに著変が見

られなかった。

腸溶性カプセル投与群では、3頭中1頭において、進行性のポリオ様麻痺が発症し、その個体の視床部および脊髄の炎症部位には、血管周囲性細胞浸潤、神経細胞の変性、壊死が観られた。腰髄の脊髄前角では神経細胞の消失像が多くみられ、視床部の神経細胞に PV 抗原が検出された。したがって、小腸からの感染は成立することが示唆された。残りの2頭においても四肢の脱力が若干見られたものの、組織には著変が見られなかった。

以上の結果から、サルにおいて咽頭からではなく小腸からの感染が成立することが示唆された。サル小腸へ効率的に高力価の PV を導入したにも関わらず、ヒトと比較して圧倒的に感染効率が低いことから、胃酸の影響で小腸へ到達する PV 力価が低下するためにサルにおける PV 経口感染が成立しにくいのではないことが明らかとなった。扁桃接種によって中枢神経系内に炎症性変化が見られたことから、扁桃からも PV 感染が成立する可能性が考えられる。しかし、ヒトでの経口感染と比較すると圧倒的に効率が悪い。これは自然免疫の種差により扁桃や小腸組織内での PV 増殖効率が異なるためである可能性が考えられる。

hPVR-Tg マウス腸管における継代を繰り返して分離したマウス腸管適応 PV 変異株は、マウス腸管における増殖性が高い表現型を維持したクローンを得ることが困難であった。強力なマウス腸管適応変異株クローンを得るには、マウス適応と腸管 (*in vivo*) 適応の二段階を経る必要がある可能性を考えた。hPVR 発現マウス腸管上皮細胞において、より大きなプラークを形成できる変異株の hPVR-Tg マウス体内における表現型を確認したところ、有意な増殖効率の上昇は認められなかった。また、その変異株を hPVR-Tg マウス腸管において継代を繰り返したが、際だって増殖効率が上昇した変異株をクローン化することができなかった。増殖能が上昇した株をダイレクトシークエンスで塩基配列解析したが、有望な変異は見つけられなかった。増殖効率が充分上昇した変異株を安定して単離できないことから、変異の入ったウイルスポピュレーションが非常に低いか、増殖させる際に復帰変異が入りやすいか、マウス個体差が大きいのか、単離するにはもっと増殖効率を上昇させる必要がある、などが考えられる。

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)

Ohka S, Sakai M, Bohnert S, Igarashi H, Deinhardt K, Schiavo G, Nomoto A. Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *Journal of Virology*. 査読有 83:4995-5004, 2009.

大岡静衣、野本明男 ウイルス体内伝播のイメージング **ゲノム医学** 査読無 8:199-203, 2008.

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

大岡静衣 ポリオウイルス経口感染モデルマウスの確立 **臨床とウイルス** 査読無 35:137-145, 2007.

[学会発表](計9件)

千葉妃織、大岡静衣、五十嵐博子、大谷若菜、船越洋、中村敏一、野本明男 **ダイシストロニック型分泌蛋白質発現ポリオウイルスベクターの開発** 第7回感染症沖縄フォーラム 2009年2月12~14日 沖縄、沖縄県青年会館

千葉妃織、大岡静衣、五十嵐博子、大谷若菜、船越洋、中村敏一、野本明男 **ダイシストロニック型分泌蛋白質発現ポリオウイルスベクターの開発** 第31回日本分子生物学会年会 2008年12月12日 兵庫、神戸ポートアイランド

Ohka S, Sakai M, Bohnert S, Igarashi H, Deinhardt K, Schiavo G and Nomoto A. Receptor (hPVR/CD155)-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus. 国際ウイルス学会議 2008年8月13日トルコ、Istanbul Convention and Exhibition Centre.

Ohka S, Sakai M, Bohnert S, Igarashi H, Deinhardt K, Schiavo G and Nomoto A. Poliovirus receptor (hPVR/CD155)-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. EUROPIC2008 2008年5

月27日スペイン、Hotel Calipolis.

大岡静衣 人の感染症病因ウイルスと組換え生物を用いた感染実験 日本実験動物科学技術2008 2008年5月15日 宮城、仙台国際センター

大岡静衣 リアルタイムイメージングによるポリオウイルスの運動神経軸索輸送機構の解析 先端医療開発研究シンポジウム 2008年1月22日 東京、東京大学安田講堂

Ohka S. Real-time imaging of poliovirus in motor neurons. CNSI-CNBI Symposium 2007年11月1~2日 アメリカ、UCLA

大岡静衣、坂井麻依、五十嵐博子、野本明男 **ポリオウイルスの運動神経軸索逆行性輸送機構** 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月21~23日 北海道、札幌コンベンションセンター

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 **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** 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月21~23日 北海道、札幌コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大岡 静衣 (OHKA SEI I)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80313097

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし