

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00507

研究課題名（和文）中枢神経病原性ウイルスの新たな神経細胞伝播機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of measles virus spread in the brain

研究代表者

柳 雄介（YANAGI, Yusuke）

長崎大学・高度感染症研究センター・教授

研究者番号：40182365

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：麻疹ウイルスは一般に発熱、発疹を主症状とする一過性の急性感染症を起こすが、1万例に1例くらいの頻度で脳で持続感染し、感染から数年後に致死的な亜急性硬化性全脳炎(SSPE)を起こす。我々は、SSPEの発生には、ウイルスのF遺伝子に変異が起こり、ウイルスの膜融合能が亢進することが重要であること、そのような変異ウイルスは、神経細胞に発現しているCADM1あるいはCADM2とよばれる分子を受容体として、シナプスを介して神経細胞間を伝播すること、野生型を含む複数の変異ウイルス間の相互作用により、ウイルスの細胞間伝播能が決まることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻疹ウイルスは、免疫細胞に発現するSLAMF1、上皮細胞に発現するnectin-4を受容体として細胞に感染することが知られているが、脳にはこれらの分子は発現していない。我々の研究によって、脳ではCADM1、CADM2とよばれる分子が、膜融合能が亢進した変異麻疹ウイルスに対する受容体として機能していることが明らかになった。また、異なるウイルス間の相互作用が脳でのウイルス伝播に重要であることが示された。変異麻疹ウイルスとCADM1、CADM2の相互作用を阻害することが、SSPE治療法の開発に有用であることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although measles virus (MeV) generally causes an acute febrile illness, it may, albeit rarely, persist in the brain, causing subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) several years after acute infection. In our study, we have obtained the following findings to better understand the pathogenesis of SSPE. First, the hyperfusogenic mutations in the fusion (F) gene are essential for MeV spread in the brain. Second, the cell adhesion molecule (CADM)1 and CADM2 act as cis-acting receptors for hyperfusogenic mutant MeVs in the brain. Third, the interactions among different wild-type and mutant MeVs determine MeV fusogenicity and spread in the brain, possible explaining the long incubation period of SSPE.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス 亜急性硬化性全脳炎 膜融合 神経細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重要なヒト病原体である麻疹ウイルス（世界中で年間約 10 万人の死者を出している）は、一般には発熱、発疹などの全身性の急性感染症を起こす。しかし、時に中枢神経系に持続感染して致死的な脳炎を起こすことがある。そのような脳炎には、感染から数か月後に発症する麻疹封入体脳炎 measles inclusion body encephalitis (MIBE) と、数年後に発症する亜急性硬化性全脳炎 subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) の 2 つのタイプが知られている。MIBE は免疫不全が基礎にある患者に発生し、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染が蔓延している国々では最近問題になっている。一方、SSPE は明らかな免疫不全が認められない患者に起こる。脳での麻疹ウイルス持続感染が SSPE の原因であることが 1960 年代に明らかにされて以来多くの研究が行われてきたが、その発症機構はいまだ明らかではなく、有効な治療法もないため SSPE は難病に指定されている。

ウイルスは、一般に宿主細胞の受容体に結合し細胞内にウイルスゲノムが侵入することにより増殖を開始する。麻疹ウイルスは膜融合により細胞内に侵入する。麻疹ウイルスの膜（エンベロープ）上には hemagglutinin (H) 蛋白質（受容体と結合）と fusion (F) 蛋白質が存在する。H 蛋白質が標的細胞上の受容体に結合すると、隣の F 蛋白質に大きな構造変化が誘導され、ウイルス膜と細胞膜の間の融合が起こる。麻疹ウイルス受容体として、免疫細胞に発現する SLAMF1 (SLAM, CD150) と上皮細胞に発現する nectin 4 が知られている。しかし、SSPE や MIBE で主な標的となる神経細胞には SLAMF1 も nectin 4 も発現しておらず、麻疹ウイルスがどのようにして神経細胞に侵入し増殖・伝播して病気を起こすか不明である。SSPE 患者の脳から分離されたウイルスの多くは、matrix (M) 蛋白質の遺伝子に異常があり、そのためウイルス粒子は形成されない。したがって、ウイルスはシナプスを介して神経細胞から神経細胞へ伝播する（シナプス領域での細胞間膜融合によりウイルスゲノムが移動）と考えられている。

我々は、SSPE 患者由来ウイルスに多く認められる F 蛋白質細胞外領域の特定の変異が神経細胞における麻疹ウイルス感染に重要であることを明らかにした。そのような変異を持つ麻疹ウイルスでは、F 蛋白質の構造不安定化とそれともなう膜融合能亢進が起こっており、野生型麻疹ウイルスと違って SLAMF1 や nectin 4 を発現していない細胞に膜融合を起こすことができる。さらに、神経細胞初代培養や神経細胞に分化した培養細胞で感染・伝播することができ、また、乳のみハムスターや免疫不全マウスの脳で広汎に増殖する。最近、別のグループにより、南アフリカの MIBE や SSPE の症例から分離されたウイルスが、同様の性質（構造不安定化、膜融合能亢進）の F 蛋白質を持つことが報告された。

F 蛋白質の構造が不安定化することによって、構造変化に必要なエネルギー障壁が低下するので、H 蛋白質が受容体と結合した後、F 蛋白質はより容易に構造変化が誘導されるようになり膜融合能が亢進する。また、H 蛋白質が (SLAMF1 や nectin 4 以外の) 未知の神経細胞受容体と結合することによっても構造変化が誘導されると考えられる。実際、我々は、SLAMF1 や nectin 4 との結合能が低下した変異 H 蛋白質は（言い換えれば、H 蛋白質と受容体の弱い相互作用は）野生型 F 蛋白質との組み合わせでは膜融合を誘導できないが、構造が不安定化した F 蛋白質との組み合わせでは膜融合を誘導できることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、構造が不安定化し膜融合能が亢進した変異 F 蛋白質が麻疹ウイルスの神経病原

性に重要であるという知見に基づき、そのような変異 F 蛋白質の構造変化を誘導できる新規分子を同定し、SSPE において変異麻疹ウイルスが神経細胞に感染・伝播する分子機構を明らかにする。それによって、現在有効な治療法がない SSPE に対して、ウイルスと新規受容体の相互作用や膜融合過程を標的とする抗ウイルス薬開発のための基礎情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた膜融合アッセイ：培養細胞に、麻疹ウイルス H 蛋白質、F 蛋白質、宿主蛋白質、緑色蛍光蛋白質 (GFP) をそれぞれコードするプラスミドを導入し、30 - 48 時間後に蛍光顕微鏡で細胞融合の有無や程度を観察した。実験によっては、H 蛋白質、F 蛋白質と宿主蛋白質を別の細胞 (trans) あるいは同一の細胞 (cis) に遺伝子導入し、その後で細胞を混合することにより、細胞融合を観察した。

(2) 定量的膜融合アッセイ：Renilla luciferase と GFP のそれぞれを 2 つに分離した領域を含む dual split protein (DSP) 1 と DSP2 をコードするプラスミドを導入した細胞同士は、膜融合が起こると Renilla luciferase および GFP の活性が回復する。Renilla luciferase の活性を測ることによって、膜融合の程度を定量的に評価した。

(3) 組換え麻疹ウイルスの作成：H 蛋白質あるいは F 蛋白質に変異を導入した遺伝子を持つ組換え麻疹ウイルスを、すでに確立された麻疹ウイルス reverse genetics の手法に従って作成した。

(4) 動物実験：マウス神経細胞は 胎生 17 日の C57BL/6 マウスの海馬から分離し、初代培養を調製した。生後 10 日のゴールデンハムスター の左半球脳に麻疹ウイルスを接種後、経時的に臨床症状を観察した。また、安楽死後の脳を蛍光実体顕微鏡で観察した。動物実験は大学の動物実験委員会の承認を受けたうえで、動物実験規則及び関係法令に従って実施した。

4. 研究成果

(1) 膜融合能が亢進した変異 F 蛋白質の構造変化を、SLAMF1 と nectin 4 非依存的に誘導できる分子 (言い換えれば、SLAMF1 も nectin 4 も発現していない細胞で膜融合を誘導できる分子) をスクリーニングすることにより、神経細胞に高発現している細胞接着分子 cell adhesion molecule (CADM)1 と CADM2 がそのような性質を持っていることを明らかにした。これらの分子をノックダウンすると、膜融合能が亢進した変異麻疹ウイルスによるヒト由来細胞株での細胞融合 (巨細胞形成) が顕著に低下した。CADM1、CADM2 のマウス orthologue もヒト分子と同様に変異 F 蛋白質を活性化することができたが、マウス神経細胞初代培養でこれらの分子をノックダウンすると、膜融合能が亢進した変異麻疹ウイルスの神経細胞間伝播は顕著に阻害された。これらの結果から、SLAMF1、nectin 4 が発現していない神経細胞では、CADM1 や CADM2 が受容体として働いて、ウイルスの細胞間伝播を可能にしていると考えられた。

(2) 一般のウイルスにおけるウイルス蛋白質と受容体の相互作用と同様に、SLAMF1 や nectin 4 は麻疹ウイルスの H 蛋白質と trans に (異なる細胞上で) 相互作用することにより、F 蛋白質の構造変化を誘導するのに対し、CADM1 と CADM2 は H 蛋白質や F 蛋白質と同一の細胞上で cis に働くことにより F 蛋白質の構造変化を誘導した。また、共免疫沈降法で、CADM1、CADM2 は H 蛋白質と同一細胞上に発現する時のみ、H 蛋白質と相互作用をした。これらの結果から、CADM1、

CADM2は「cis作用性受容体」として機能していると考えられた。このようなメカニズムによるウイルス伝播は、神経におけるシナプスや上皮細胞のように元々細胞同士が密着している場所（ウイルス蛋白質と受容体の相互作用により、異なる膜同士を接近させる必要がない場所）で起こる可能が考えられる。

(3) CADM1とCADM2には、選択的スプライシングにより、ストーク(stalk)領域の長さが異なる様々なタイプが存在するが、短いストーク領域を持つタイプのみが変異F蛋白質による膜融合を誘導することができた。一方、H蛋白質の細胞外領域はヘッド(head)とストークから構成されており、ヘッドでSLAMF1やnectin4と相互作用している。しかし、ヘッドを欠くH蛋白質でも変異F蛋白質による膜融合を誘導したことから、ヘッドではなくストークでCADM1やCADM2と相互作用していることが明らかになった。

(4) H蛋白質のストーク領域にアラニン置換を行うことにより、171-175番目のアミノ酸残基がCADM1、CADM2との相互作用に重要であることが明らかになった。ここを置換したH蛋白質はCADM1あるいはCADM2依存性の変異F蛋白質による膜融合を誘導できなかった。また、171-175番目のアミノ酸残基を置換したH蛋白質と変異F蛋白質を持つ組換え麻疹ウイルスは、神経細胞初代培養間の伝播およびハムスターの脳内伝播を起こさなかった。これらの結果から、CADM1とCADM2は培養細胞における膜融合だけでなく、麻疹ウイルスの脳内伝播と神経病原性に重要であることが明らかになった。

(5) 脳では、麻疹ウイルスゲノムは、シナプスにおける膜融合を介して神経細胞間を直接伝播すると考えられる。そのため、突然変異が起これば、野生型と変異型ゲノムが同時に伝播し共存することになる。F蛋白質は三量体からなるので、変異F蛋白質は野生型F蛋白質とヘテロ三量体を形成する。実際のF蛋白質の融合能は三量体を構成するサブユニットの組み合わせで決定されていた。多くの場合、野生型の共存は変異F蛋白質の融合能を強く抑制した。そのため、SSPE患者では、F蛋白質に変異が蓄積して融合能が強く亢進し、野生型による抑制に打ち勝つ必要があるため発症までの経過が長いと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shirogane Yuta, Takemoto Ryuichi, Suzuki Tateki, Kameda Tomonori, Nakashima Kinichi, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke	4. 巻 95
2. 論文標題 CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Acting in <i>cis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00528-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takemoto Ryuichi, Suzuki Tateki, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke, Shirogane Yuta	4. 巻 96
2. 論文標題 Short-Stalk Isoforms of CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Interacting with the Viral Hemagglutinin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01949-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shirogane Yuta, Harada Hidetaka, Hirai Yuichi, Takemoto Ryuichi, Suzuki Tateki, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Collective fusion activity determines neurotropism of an en bloc transmitted enveloped virus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adf3731	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Takemoto Ryuichi, Hirai Yuichi, Watanabe Shumpei, Harada Hidetaka, Suzuki Tateki, Hashiguchi Takao, Yanagi Yusuke, Shirogane Yuta	4. 巻 97
2. 論文標題 Interaction of the Hemagglutinin Stalk Region with Cell Adhesion Molecule (CADM) 1 and CADM2 Mediates the Spread between Neurons and Neuropathogenicity of Measles Virus with a Hyperfusogenic Fusion Protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.00340-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuta Shirogane, Ryuichi Takemoto, Tateki Suzuki, Tomonori Kameda, Kinichi Nakashima, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi
2. 発表標題 Cell adhesion molecule (CADM) 1 and CADM2 enable measles virus spread in subacute sclerosing panencephalitis by cis-acting fusion triggering
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuichi Takemoto, Tateki Suzuki, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi, Yuta Shirogane
2. 発表標題 Cell adhesion molecule (CADM) 1 およびCADM2のストークの短いアイソフォームが 神経病原性を有する麻疹ウイルスによる膜融合を誘導する
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidetaka Harada, Ryuichi Takemoto, Yuichi Hirai, Tateki Suzuki, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi, Yuta Shirogane
2. 発表標題 Cooperation and Interference between Wild-type and Subacute Sclerosing Panencephalitis-derived Measles Virus Fusion Proteins
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichi Hirai, Ryuichi Takemoto, Tateki Suzuki, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi, Yuta Shirogane
2. 発表標題 Fusion proteins derived from some SSPE measles virus isolates cause membrane fusion independently of SLAM, nectin-4, and CADM1/2
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryuichi Takemoto, Yuichi Hirai, Tateki Suzuki, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi, Yuta Shirogane
2. 発表標題 Alanine substitutions reveal residues in the stalk region of the measles virus hemagglutinin required for CADM1/2-dependent membrane fusion
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022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	白銀 勇太 (SHIROGANE Yuta) (40756988)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	橋口 隆生 (HASHIGUCHI Takao) (50632098)	京都大学・医生物学研究所・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
---------	---------