

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07527

研究課題名(和文)麻疹ウイルスの進化が引き起こす亜急性硬化性全脳炎の発症機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Measles Virus Evolution for Neuropathogenicity

研究代表者

白銀 勇太 (Shirogane, Yuta)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40756988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルスは麻疹の病原ウイルスであるが、稀に脳に持続感染が成立して亜急性硬化性全脳炎(SSPE)を引き起こす。私たちは麻疹ウイルスの神経での増殖に必要な宿主因子としてCADM1およびCADM2を同定した。CADM1/2はトランスに作用する一般的な受容体とは異なり、麻疹ウイルスの受容体結合タンパク質(H)と同一膜上に発現し、細胞融合を誘導する。CADM1/2の機能は特定のスプライシングバリエーションのみで発揮される。更に、CADM1/2による膜融合の誘導は、Hのヘッドドメインを必要としない。また、SSPE分離株はF遺伝子に複数の変異を蓄積し、神経での増殖能を高めていく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

麻疹の合併症である亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は、現在も有効な治療法のない致死的な疾患である。本来は神経で増殖できない麻疹ウイルスが、どのように進化して、最終的に脳で増殖し、SSPEを引き起こすのか。私たちの研究により、ウイルス側の要因(膜融合遺伝子の変異)と宿主側の要因(神経増殖を可能にする宿主分子の存在)が明らかにされ、SSPEの理解が大きく前進した。このように、SSPEをウイルス側、宿主側から総合的に解明する基礎的研究を進めることで、治療法の開発に向けた有効な手掛かりをつかむことにつながる。また、その他のウイルスにも適応できるウイルス進化メカニズムの解明にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Measles virus, the causative agent of measles, may persist in the brain and cause subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). We have identified CADM1 and CADM2 as cis-acting receptors required for measles virus growth in the nervous system. Interestingly, short-stalk isoforms, but not long-stalk ones, of CADM1/2 are functional. Furthermore, the head domain of the H protein, a receptor attachment protein for measles virus, is not required for membrane fusion induced by CADM1/2. We also found that SSPE isolates accumulate multiple mutations in the F gene, causing efficient spread of MeV in nerves.

研究分野：ウイルス学

キーワード：亜急性硬化性全脳炎 麻疹 麻疹ウイルス 膜融合 CADM1 CADM2 集団伝播

1. 研究開始当初の背景

麻疹ウイルス (measles virus、MeV) はエンベロープを持つ RNA ウイルスの一種であり、麻疹 (ましん、はしか) の病原体である。また MeV はまれに脳内に持続感染し、数年の後に亜急性硬化性全脳炎 (Subacute sclerosing panencephalitis、SSPE) という致死性の脳炎を引き起こす。未だに SSPE に対する根治療法は存在しない。興味深いことに SSPE は MeV が脳内で進化を遂げることで初めて発症する。

MeV のエンベロープには Hemagglutinin (H) タンパク質と Fusion (F) タンパク質という 2 つの糖タンパク質が存在する。細胞侵入時にはまず H タンパク質が宿主細胞膜上の受容体に結合し、続いて F タンパク質の構造変化が誘導されることでエンベロープと細胞膜が融合する。また感染細胞膜上に発現する H、F タンパク質の作用により隣接する非感染細胞との膜融合が誘導され、その場合はゲノムが細胞間で直接伝達される。

野生型 (wild-type、WT) の MeV の受容体として免疫系細胞に発現する Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM、または CD150) と上皮細胞に発現する nectin-4 が同定されている。一方 SSPE における MeV の主要な標的である神経細胞では両受容体が発現しておらず、WT の MeV は増殖しない。したがって MeV がどのようにして脳での増殖能を獲得するのかは SSPE の発症メカニズムを理解するために重要である。SSPE 患者から分離された MeV は多くの変異を獲得している。よって前述の問いに答えるにはまず MeV が脳内でどのような進化を遂げたのかを理解し、その成果をもとに神経に発現する未知の受容体 (神経受容体) を同定することが不可欠である。

私たちは SSPE 患者から分離された MeV の F 遺伝子に存在する変異が MeV の神経細胞での増殖を可能にしていることを明らかにした¹⁻⁴。更に変異 F タンパク質では H タンパク質と受容体の結合親和性が著しく弱い場合でも膜融合が誘導されることを報告した⁵。しかしながら、MeV が神経で増殖するための宿主側の因子 (受容体) は同定されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は MeV の神経受容体を同定し、SSPE の発症メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

神経受容体を同定するため、野生型 H タンパク質および変異 F タンパク質との共発現で膜融合を誘導できる宿主因子の検索を行った。分割ルシフェラーゼタンパク質をそれぞれ恒常発現する 2 種類の培養細胞を共培養し、H タンパク質、変異 F タンパク質、および宿主分子を共発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定することで細胞融合を誘導できる受容体候補分子をスクリーニングした。

次に、受容体候補分子を H・F タンパク質発現細胞と異なる細胞に (トランスに) 発現させた場合、同じ細胞に (シスに) 共発現させた場合の膜融合誘導能を調べた。また、神経腫瘍由来培養細胞 IMR32 やマウス胎仔から分離した初代神経細胞で受容体候補分子をノックダウンし、MeV の神経増殖能への影響を調べた。

同定された受容体分子について、各スプライシングバリエーションの機能を解析した。また H タンパク質のアラニン変異体を作製し、CADM1/2 との機能的相互作用に重要な H タンパク質領域を調べた。さらに CADM1/2 を利用できない変異 H タンパク質を持つ組換え MeV を作製し、マウス初代培養神経細胞やハムスターの脳に接種することでその神経病原性への影響を調べた。

また MeV は細胞融合により神経間をゲノムが直接集団伝播する。そのようなゲノムの集団伝播が F タンパク質の相互作用を調べるため、野生型 F タンパク質と SSPE 分離株にみられる変異を単独または複数もつ変異 F タンパク質を共発現させ、その融合能への影響を調べた。また、ゲノムを混在させた状態で回収した組換え MeV を作製し、マウス初代培養神経細胞での増殖能に野生型ゲノムと変異型ゲノムの混在が与える影響について評価した。

4. 研究成果

スクリーニングの結果、神経接着因子の Cell adhesion molecule (CADM) 1 および CADM2 が H タンパク質と変異 F タンパク質による細胞融合を誘導できることを発見した⁶。興味深いことに、CADM1 と CADM2 は通常受容体とは異なる様式で膜融合を誘導することが分かった。SLAM や nectin-4 は標的細胞膜に存在し、ウイルスエンベロープや感染細胞膜上の H タンパク質とトランスに相互作用して F タンパク質の構造変化を誘導するが、CADM1 と CADM2 は感染細胞上の H タンパク質と同一膜上でシスに相互作用して膜融合を起こした。

次に CADM1/2 のスプライシングバリエーションについて解析を進めた。CADM1/2 の細胞外領域には 3 つのドメイン (V、C2-1、C2-2) があり、C2-2 ドメインと細胞膜貫通領域の間にはストーク領域が存在する。CADM1/2 にはストーク領域の長さが異なるスプライシングバリエーションが複数存在することが知られていたため、各スプライシングバリエーションが受容体模倣因子として膜融合を誘導できるかを調べた。その結果、ストークの短いバリエーションのみが機能を持ち、ストークの長

いバリエーションでは融合誘導能を失うことが明らかとなった⁷。短ストークのバリエーションは一部の例外を除き神経細胞を含むほとんどの組織・細胞で主要なバリエーションであり、これは MeV の神経病原因子として矛盾の無い結果であった。

また、H タンパク質の細胞外領域は既知の受容体 (SLAMF1・nectin-4) に結合するヘッドドメインと、膜近傍のストーク領域に分けられる。H タンパク質の欠損変異体を用いた実験により、CADM1/2 による膜融合の誘導にはヘッドドメインが必ずしも必要ではなく、H タンパク質のストーク領域が機能的相互作用に重要な役割を果たしていることが明らかとなった⁷。そこでストーク領域のアラニンスキャニングを実施したところ、H タンパク質の 171 番目から 175 番目のアミノ酸をアラニンに置換すると CADM1/2 および nectin-4 の利用能を失うことが明らかとなった⁸。この領域がどのようなメカニズムで直接的ないしは間接的に CADM1/2 を含む受容体の利用能に関連するののかについては、今後の研究課題である。さらに、この変異 H タンパク質を持つ組換え MeV はマウス初代培養神経細胞やハムスターの脳での増殖能および神経病原性を失っていた。Nectin-4 を特異的に利用できない組換え MeV では神経増殖能や病原性への影響は認めなかったことから、CADM1/2 の利用能が MeV の神経病原性に必要であることが明らかとなった。

以上の結果から、CADM1/2 は感染した神経細胞と隣接する神経細胞を融合させ、粒子を介さずに直接 MeV のゲノムを伝播するために必要な宿主因子であると考えられた。この場合、融合部分から野生型ゲノムや変異したゲノムを含む多くのウイルスゲノムがまとめて次の細胞に伝播していく (集団伝播する) ことになる。

そこで私たちは野生型の F タンパク質と SSPE 分離株由来の変異を単独ないしは複数持つ F タンパク質を共発現させて細胞融合能を評価した⁹。その結果、単独変異体である F(T4611) は野生型の F タンパク質により膜融合能が著しく抑制 (干渉) されることが明らかとなった。次に、SSPE 分離株にみられる T4611 以外の変異を追加で導入したところ、変異の蓄積により F タンパク質の膜融合能が著しく上昇する場合と逆に低下する場合があることが分かった。後者は神経増殖能の低下した変異体が選択されたことを意味し、矛盾している。しかしながら、野生型の F タンパク質の共存下での膜融合能は、前者では干渉され、後者では逆に促進された (協調)。結果として野生型の F タンパク質の存在下ではどちらのケースも変異の蓄積により徐々に膜融合能が上昇し、より高い神経増殖能を獲得する方向に進化したと解釈可能であった。またこの結果はマウスの初代培養神経細胞に異なるゲノムをもつ組み換え MeV を感染させた際にも再現された。このような干渉・協調現象が起こる原因として、F タンパク質が機能的な三量体を形成するタンパク質であることが挙げられる。変異型の F タンパク質は野生型に比べて不安定であり、構造変化の閾値が下がるために融合能が上昇している。安定性の高い野生型 F タンパク質が共発現すると変異型の F タンパク質とヘテロオリゴマーが形成され、両者の中間の安定性を持つようになり、融合能が抑制されると考えられる^{9,10}。一方、安定性の低すぎる変異 F タンパク質では、野生型 F タンパク質とのヘテロオリゴマー形成により、適度に安定性が上昇し、膜融合能が促進したと考えられる。このように、我々はヘテロオリゴマーの形成による安定性の変化が F タンパク質の機能的な相互作用のメカニズムであると考えている。

我々は本研究により SSPE 発症に重要な麻疹ウイルスの F 遺伝子の変異、宿主 CADM1/2 の受容体模倣機能、集団伝播の要素について明らかにした。このような膜融合遺伝子の変異による新規病原性の獲得、受容体利用能の拡大、集団伝播によるゲノム間の相互作用、といった現象は、MeV のみではなくすべてのエンベロープウイルスで起っている可能性がある。今後はエンベロープウイルスの膜融合タンパク質がウイルスにもたらす進化ポテンシャルについて、更に研究を深めていきたい。

1. Watanabe, S., Shirogane, Y., Sato, Y., Hashiguchi, T. & Yanagi, Y. New Insights into Measles Virus Brain Infections. *Trends Microbiol* **27**, 164–175 (2019).
2. Sato, Y. *et al.* Cell-to-Cell Measles Virus Spread between Human Neurons Is Dependent on Hemagglutinin and Hyperfusogenic Fusion Protein. *J Virol* **92**, e02166-17 (2018).
3. Watanabe, S. *et al.* Measles Virus Mutants Possessing the Fusion Protein with Enhanced Fusion Activity Spread Effectively in Neuronal Cells, but Not in Other Cells, without Causing Strong Cytopathology. *J Virol* **89**, 2710–2717 (2015).
4. Watanabe, S. *et al.* Mutant Fusion Proteins with Enhanced Fusion Activity Promote Measles Virus Spread in Human Neuronal Cells and Brains of Suckling Hamsters. *J Virol* **87**, 2648–2659 (2013).
5. Shirogane, Y., Hashiguchi, T. & Yanagi, Y. Weak cis and trans Interactions of the Hemagglutinin with Receptors Trigger Fusion Proteins of Neuropathogenic Measles

Virus Isolates. *J Virol* **94**, e01727-19 (2020).

6. Shirogane, Y. *et al.* CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Acting in cis . *J Virol* **95**, (2021).
7. Takemoto, R., Suzuki, T., Hashiguchi, T., Yanagi, Y. & Shirogane, Y. Short-Stalk Isoforms of CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Interacting with the Viral Hemagglutinin. *J Virol* **96**, (2022).
8. Takemoto, R. *et al.* 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. *J Virol* (2023) doi:10.1128/JVI.00340-23.
9. Shirogane, Y. *et al.* Collective fusion activity determines neurotropism of an en bloc transmitted enveloped virus. *Sci Adv* **9**, (2023).
10. Shirogane, Y., Watanabe, S. & Yanagi, Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nat Commun* **3**, 1235 (2012).

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 1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, 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 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takemoto Ryuichi, Hirai Yuichi, Watanabe Shumpei, Hideataka Harada, Suzuki Tateki, Hashiguchi Takao, Yusuke Yanagi, 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白銀 勇太、竹本 竜一、鈴木 干城、亀田 朋典、中島 欽一、橋口 隆生、柳 雄介
2. 発表標題 Cell adhesion molecule (CADM) 1 およびCADM2は亜急性硬化性全脳炎における麻疹ウイルス増殖を可能にする宿主因子である
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹本 竜一、鈴木 干城、橋口 隆生、柳 雄介、白銀 勇太
2. 発表標題 Cell adhesion molecule (CADM) 1 およびCADM2の特定のアイソフォームのみ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 九州微生物研究フォーラム
4. 発表年 2021年

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 Short-stalk isoforms of CADM1 and CADM2 induce membrane fusion mediated by hyperfusogenic fusion proteins of neuropathogenic measles viruses
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 竹本 竜一、平居 優一、鈴木 干城、橋口 隆生、柳 雄介、白銀 勇太
2. 発表標題 Cell adhesion molecule (CADM)1/2は麻疹ウイルスのヘマグルチニンストーク領域を介して中枢神経病原性に関与する
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白銀 勇太、原田 英鷹、平居 優一、竹本 竜一、鈴木 干城、橋口 隆生、柳 雄介
2. 発表標題 脳炎発症への進化途上における麻疹ウイルス融合タンパク質間の協調と干渉
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2022
4. 発表年 2022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

1. 発表者名 白銀勇太
2. 発表標題 RNAウイルスの病原性・進化・集団内相互作用
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）
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

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