

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21780271

研究課題名 (和文) 狂犬病ウイルス蛋白質による神経細胞機能変化の解析

研究課題名 (英文) Pathogenesis of rabies virus in neuronal cells

研究代表者

寸田 祐嗣 (SUNDEN YUJI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：20451403

研究成果の概要 (和文)：狂犬病は致死的な人獣共通感染症であり、感染動物の神経細胞内で狂犬病ウイルスが増殖することにより起こる。本研究では、ウイルスの何がどのようにして神経細胞機能を障害するのか、どのようにすれば宿主免疫反応によりウイルスを排除できるのか、という疑問を解明するために実験動物および培養細胞を用いた基礎的研究を行った。その結果、中枢神経系にウイルス中和抗体を多量に誘導することによって、致死量の狂犬病ウイルスを排除可能であることを証明した。さらに狂犬病ウイルスの核蛋白質 nucleoprotein を神経系由来培養細胞に発現させることによって、細胞の遺伝子発現が修飾される可能性を見出した。

研究成果の概要 (英文)：Rabies is a lethal zoonotic disease and its causative agent is rabies virus, which infects in neurons. In the present study, experimental studies using laboratory animals and cultured cells were performed to clarify following two questions; which viral factors induce dysfunction of neurons? And which immune response is important for the virus clearance from central nervous system (CNS)? By experimental intracerebral vaccination, it was clearly shown that virus-specific antibodies were highly induced in CNS and may contribute to the virus neutralization. Further, virus nucleoprotein interacted with some transcripts of neuronal cells suggesting the interference of host gene expression which may have roles in the pathogenesis of rabies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	400,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：狂犬病 中和抗体 病原性 神経細胞 ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

狂犬病はウイルス性人獣共通感染症であり、約4,000年前から人類に恐れられてきた記録があるが、神経症状を発症して回復した症例はわずか6例の報告のみである。

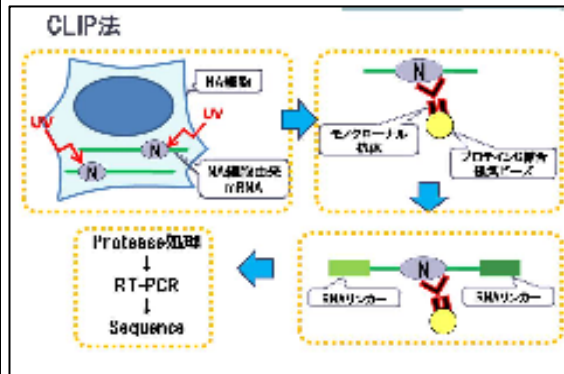
(Lancet, 363:959-969, 2004; N Engl J Med, 352:2508-2514, 2005)。現在もなお世界中で年間5.5万例以上発生があると推測されている。狂犬病は適切な予防接種とウイルス曝露後処置によって、予防できる感染症であるが、ひとたび神経症状を発症した場合にはほぼ100%死亡する恐ろしい疾患である。狂犬病の治療を実現するためには、狂犬病ウイルスの病原性、すなわち中枢神経系(CNS)で増殖した狂犬病ウイルスが宿主細胞の機能に対してどのような影響を及ぼすのか、またCNS内のウイルスを排除するために必要な宿主免疫反応について明らかにする必要があった。

## 2. 研究の目的

動物実験によりCNS内に接種した致死量の狂犬病ウイルスを排除できるかどうかを検証すること、狂犬病ウイルス蛋白質のひとつnucleoprotein (NP) に注目して感染細胞の遺伝子発現への影響を明らかにすることに取り組み、狂犬病の治療法開発に必要な基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

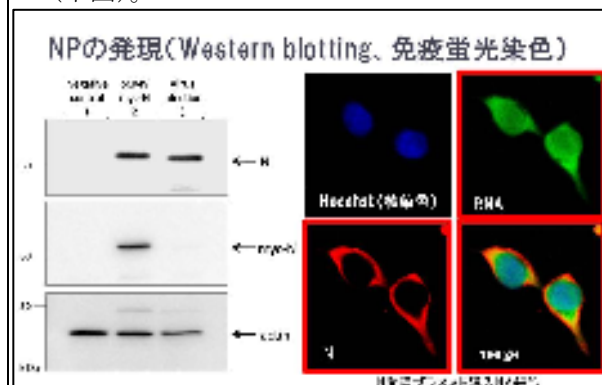
(1) マウス神経芽細胞腫由来株化細胞NAに狂犬病ウイルスNPを発現させ、CLIP法を応用して、NPが結合している細胞由来転写産物の同定を試みた(下図)。



(2) 狂犬病不活化ウイルス粒子を鞘内免疫(脳内免疫)したマウスに致死量の狂犬病ウイルスを脳内接種することによって、神経組織内におけるウイルス増殖阻止効果を検証した。

## 4. 研究成果

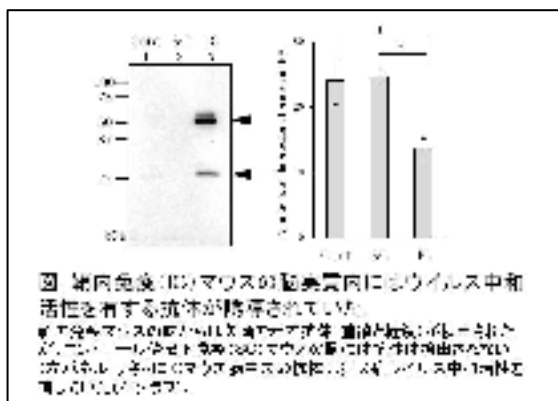
(1) まずNP単独での一過性発現系を確立した(下図)。



CLIP法により検出された宿主遺伝子断片をシーケンスすることによって、*Mus musculus Ngg1 interacting factor 3-like 1* (以下Nif311) が複数クローンから検出された。マウスの神経系由来細胞を用いてNPを単独発現させること、狂犬病ウイルスを感染させることによって、Nif311の発現量が変化することを見出した。Nif311の機能は未知であるが、神経細胞の分化や蛋白質の細胞内輸送に関与することが報告されているため、NPがNif311の発現量を変化させることによって、神経細胞

の機能を障害する可能性、ウイルスや宿主由来蛋白質の細胞内動態を修飾する可能性が推測された。今後、成熟脳組織におけるNif311の発現を確認し、その発現量の変化が神経細胞機能に与える影響の詳細を調べる必要がある。

(2) 鞘内免疫マウスに致死量の狂犬病ウイルスを脳内接種すると、ウイルス接種後初期には脳神経細胞内にウイルス抗原が検出されたが、その後80%以上のマウスは症状を示さずに耐化した。耐化したマウスの神経組織からはウイルスは検出されなかった。また、免疫マウスの脳内にはウイルス中和活性を有する抗体が大量に誘導されていた(下図)。



今後は脳内への中和抗体誘導のメカニズムを解明し、その制御法を確立することによって、脳神経細胞に感染した狂犬病ウイルスの排除、すなわち発症後治療への応用が期待される。

## 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 5件、全て査読有)

1. Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. PLoS

Pathog. 2010, 12:6(3):e1000801.

2. Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K, Umemura T. Lipopolysaccharide treatment and inoculation of influenza A virus results in influenza virus-associated encephalopathy-like changes in neonatal mice. J Neurovirol. 2010, 16(2):125-132.

3. Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, Orba Y, Kimura T, Sawa H. Natalizumab has no direct biological effect on JC virus infectivity in permissive human neural cell lines. J Med Virol. 2010, 82(7):1229-35.

4. Ikebuchi R, Konnai S, Sunden Y, Onuma M, Ohashi K. Molecular cloning and expression analysis of bovine programmed death-1. Microbiol Immunol. 2010, 54(5):291-8.

5. Sunden Y, Yano S, Ishida S, Ochiai K, Umemura T. Intracerebral vaccination suppresses the spread of Rabies virus in the mouse brain. Microbes Infect. 2010, 12(14-15):1163-9.

[学会発表] (計 3 件)

1. 寸田祐嗣、青島圭祐、石田幸代、梅村孝司. 鞘内免疫による脳内への抗体誘導と発症予防効果に関する実験的研究. 第10回狂犬病研究会、ホテル由布院倶楽部(大分県)、2011年3月4日.

2. 李賢敬、寸田祐嗣、梅村孝司. Intracerebral vaccination against PRV showed efficient protection by inducing antibody secreting

cells in CNS and lymphoid organs in mouse.

第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島県郷土文化会館、2010年11月7 - 9日.

3. Yuji Sunden, Saki Akita, Tomohisa Tanaka and Takashi Umemura.

The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in suckling mice infected with H3N2 subtype influenza virus.

The 2<sup>nd</sup> International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010, 13-14 September, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

寸田 祐嗣 (SUNDEN YUJI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：20451403

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし