

機関番号：82606

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790438

研究課題名 (和文) 運動神経細胞におけるポリオウイルス感染初期過程の解析

研究課題名 (英文) Analysis of early infection with poliovirus in motor neurons.

研究代表者

大岡 静衣 (OHKA SEII)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80313097

研究成果の概要 (和文)：

マウスまたはラット運動神経細胞のシナプス側と細胞体側を分離培養する系を改良するため、シナプス側と細胞体側それぞれの培地条件を最適化した。マウス骨格筋抽出液を運動神経細胞シナプス側へ添加することにより、マウス運動神経細胞のシナプス伸長が有意に促進された。分離培養チャンバーを用いたヒトポリオウイルス (PV) 受容体 (hPVR) - トランスジェニック (Tg) マウス運動神経細胞培養系において、細胞体側から GFP 発現欠陥干渉 PV を感染させた場合には、感染 6 時間後には GFP 発現が確認されウイルス複製開始が認められたのに対し、シナプス側から感染させた場合には、感染 24 時間後までは GFP 発現が確認されず、48 時間後に初めて GFP 発現が確認され、感染 48 時間後までにウイルス複製開始していることが明らかになった。この結果から、細胞体側からとシナプス側からの PV 感染には、感染効率に大きな差があるか、もしくは感染様式に質的な差がある可能性が示された。生細胞内での蛍光蛋白質の挙動を 4 次元イメージングするための条件検討として、CO<sub>2</sub> 培養器付き共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡を用い GFP 発現細胞の蛍光観察を行った。培地を CO<sub>2</sub> 非依存培地に変更し密閉系で培養することで、細胞の状態が良いまま顕微鏡下での長期培養が可能となった。しかし、レーザー強度、ピンホールサイズ、Z 断面数等について条件を幅広く振り検討したが、検討したいずれの条件でも、長時間観察ではレーザーによる細胞ダメージを免れなかった。

研究成果の概要 (英文)：

We were able to culture primary motor neurons from rat or mouse using dual chamber system. It enabled us to culture the synapse side and cell body side in the different medium. To improve the culture condition, we improved the condition of the medium. The axonal elongation has improved by adding the extract of skeletal muscles from mouse. We cultured motor neurons derived from human poliovirus (PV) receptor (hPVR) - transgenic (Tg) mouse on the dual chamber and added PV defective interfering particles coding GFP from the synapse side or the cell body side. When the virus was added from the cell body side, expression of GFP was observed at six hours after the addition. On the other hand, when the virus was added from the synapse side, expression of GFP had not been observed until twenty-four hours after the addition, while the expression was observed at forty-eight hours after the addition. These results suggest that the infection from the cell body side progresses differently to the infection from the synapse side. Next, we tried to optimize the four-dimensional imaging system for live fluorescent-cells. For long term culture under the microscope, we changed the medium into CO<sub>2</sub> independent medium in a closed system. This enabled cells to live longer under the microscope. We tried various conditions of laser intensity, pinhole size, and number of Z slices for long term observation under the confocal laser microscope. However, we could not optimize the conditions for the long term observation as long as the confocal laser microscope was used.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ポリオウイルス、運動神経細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ポリオウイルス (PV) は小児まひの病因ウイルスで、中枢神経系内で運動神経選択的に感染し脱落させ、麻痺を生じさせる。骨格筋へ投射している運動神経を經由して、骨格筋から直接中枢神経系へ PV が侵入する神経経路が存在することから、申請者らは PV の最終ターゲットである運動神経での PV 感染モデルとしてこの経路に焦点をあて、これまでに PV 運動神経軸索逆行性輸送機構を解明してきた。運動神経細胞での PV 脱殻に至る感染初期過程をさらに解明することは PV の複製機構を理解するために非常に重要である。そのためには、*in vivo* で起こっているシナプス側からの感染を運動神経初代細胞培養系で再現し解析することが必須である。

### 2. 研究の目的

運動神経初代培養細胞を、細胞体側とシナプス側に分けて分離培養する系を確立する。そして、蛍光標識 PV を用いたリアルタイムイメージング等により、どのようにして PV が軸索輸送されて脱殻の場へ到達し、脱殻を開始するのか、を明らかにし、運動神経細胞における PV 感染初期過程を解明する。また同時に、シナプス側からの感染機構を解明することにより、細胞体側からの感染との差異および神経筋接合部位 (NMJ) の有無がウイルス取り込みへ及ぼす影響を明らかにし、従来の PV 感染実験系により得られてきた結果を検証すると同時に、非分離培養系では観られない PV 感染時の運動神経細胞に特有な性質を明らかにする。

### 3. 研究の方法

運動神経細胞の細胞体側とシナプス側を同一平面上で分離して培養する技術 (Taylor A. M., et al., Nature Methods, 2005) をもとに、Polydimethylsiloxane (PDMS) デバイスを作製した (東京大学生産技術研究所の藤井輝夫教授らとの共同研究)。ラットまたはマウス胚から得た運動神経初代培養細胞を

細胞体側に播種し、軸索をシナプス側へ伸長させた。

運動神経細胞の分離培養系において運動神経細胞を培養し、GFP 発現 PV を細胞体側またはシナプス側から感染後、細胞変性効果出現の時間経過、ウイルス蛋白質の発現時間経過を、共焦点レーザー顕微鏡を用い観察した。

### 4. 研究成果

マウスまたはラット運動神経細胞のシナプス側と細胞体側を分離培養する系を改良するため、シナプス側と細胞体側それぞれの培地条件を最適化した。マウス骨格筋抽出液を運動神経細胞シナプス側へ添加することにより、マウス運動神経細胞のシナプス伸長が有意に促進された。

Polydimethylsiloxane (PDMS) を用いた分離培養チャンバーの細胞毒性を検討した。PDMS デバイスは高温処理により一般的には細胞毒性が低下すると言われていたが、オートクレーブまたは高温処理いずれの処理後のチャンバーを用いて培養しても、神経細胞が死滅したのに対し、熱処理なしのものでは神経細胞生存率が高かった。したがって、熱処理なしのチャンバーを培養に用いることにした。

感染性ウイルス粒子内のゲノム標識を行った。蛍光色素 Syto59 を用いたところ、行った実験条件では、ゲノムが標識されているらしいものの、輝度が低く検出が極めて難しかった。

分離培養チャンバーを用いた hPVR-Tg マウス運動神経細胞培養系において、細胞体側から GFP 発現欠陥干渉 PV を感染させた場合には、感染 6 時間後には GFP 発現が確認されウイルス複製開始が認められたのに対し、シナプス側から感染させた場合には、感染 24 時間後までは GFP 発現が確認されず、48 時間後に初めて GFP 発現が確認され、感染 48 時間後までにウイルス複製開始していることが明らかになった。この結果から、

細胞体側からとシナプス側からの PV 感染には、感染効率に大きな差があるか、もしくは感染様式に質的な差がある可能性が示された。

既存の分離培養チャンバーは細胞体培養部分上部が開放構造になっておらず、ウイルス受容体遺伝子やウイルス複製関連遺伝子、そのドミナントネガティブ遺伝子等をマイクロインジェクションできない。細胞体培養部分上部が開放構造になりマイクロインジェクション可能な分離培養チャンバーの設計が終わり、試作中である。

生細胞内での蛍光蛋白質の挙動を 4 次元イメージングするための条件検討として、CO<sub>2</sub> 培養器付き共焦点レーザー顕微鏡を用い GFP 発現細胞の蛍光観察を行った。培地を CO<sub>2</sub> 非依存培地で密閉系で観察することで、細胞の状態は良いまま顕微鏡下での培養が可能となった。しかし、レーザー強度、ピンホールサイズ、Z 断面数等について条件を幅広く振り検討したが、検討したいずれの条件でも、長時間観察ではレーザーによる細胞ダメージを免れなかった。

#### 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)

1. 2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication. Igarashi H, Yoshino Y, Miyazawa M, Horie H, Ohka S, Nomoto A. J Virol. 2010, 84(12):5947-5957.

2. Rapid detection of Pseudomonas aeruginosa in mouse feces by colorimetric loop-mediated isothermal amplification. Goto M, Shimada K, Sato A, Takahashi E, Fukasawa T, Takahashi T, Ohka S, Taniguchi T, Honda E, Nomoto A, Ogura A, Kirikae T, Hanaki K. J Microbiol Methods. 2010, 81(3):247-252.

3. Analysis of dissemination pathways for poliovirus. Ohka S. ウイルス 2009, 59(1):107-114.

4. Distribution of Kakugo virus and its effects on the gene expression profile in the brain of the worker honeybee Apis mellifera L. Fujiyuki T, Matsuzaka E, Nakaoka T, Takeuchi H, Wakamoto A, Ohka S, Sekimizu K, Nomoto A, Kubo T. J Virol. 2009, 83(22):11560-11568.

5. Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. Ohka S, Sakai M, Bohnert S, Igarashi H, Deinhardt K, Schiavo G, Nomoto A. J Virol. 2009, 83(10):4995-5004.

〔学会発表〕(計 4 件)

大岡静衣、他 運動神経初代培養細胞の分離培養系におけるポリオウイルス感染 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月7日～9日 徳島

大岡静衣 RNA component of mitochondrial RNA-processing endoribonuclease (RMRP) と関連蛋白質の時空間局在から見えてくるがん性幹細胞の新規機能解析 NanoBio 若手ソーシャルネットワークワーキングシンポジウム 2010年6月4日～5日 名古屋

大岡静衣、永田典代、小池智、野本明男 カニクイザルを用いたポリオウイルス経口感染実験 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月26日 東京

大岡静衣 運動神経細胞におけるポリオウイルス感染初期過程の解析 NanoBio 若手ソーシャルネットワークワーキングシンポジウム 2009年6月12日 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: ヒトテロメレース逆転写酵素に対するモノクローナル抗体

発明者: 増富健吉、安川麻美、岡本奈緒子、大岡静衣、木下圭太

権利者: 独立行政法人国立がん研究センター  
種類: 特願

番号: 2011-101970

出願年月日: 平成 23 年 4 月 28 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 標的抗原の検出方法

発明者: 花木賢一、大岡静衣、萩原純子

権利者: 学校法人岩手医科大学

種類: 特許

番号: 第 4538586 号

取得年月日: 平成 22 年 7 月 2 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大岡静衣 (OHKA SEI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 80313097