

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23591510

研究課題名(和文) 欠損型組換え麻疹ウイルスを用いた亜急性硬化性全脳炎の発症機構の解析と治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenic mechanisms of subacute sclerosing panencephalitis by use of recombinant measles viruses, and its therapeutic application

研究代表者

綾田 稔 (AYATA, Minoru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90222702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)由来の麻疹ウイルスに生じた変異と神経病原性との関連を検討した。ハムスターを用いた感染実験により、これらの変異が脳内での感染拡大に重要であることを示した。特に、F蛋白とH蛋白に生じたアミノ酸置換による機能的な変化が複数のSSPE由来株に共通していることを明らかにした。また、麻疹封入体脳炎(MIBE)にみられる変異のSSPEとの共通性を明らかにした。さらには、SSPEやMIBEに特徴的な高頻度偏在変異の出現をヌードマウスの感染実験系で再現することができた。これらの知見を基盤として、欠損型あるいは分節型のSSPE治療用麻疹ウイルスベクターの作製を試みた。

研究成果の概要(英文)： Mutations found in measles viruses derived from subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) were evaluated for the relationship to the neurovirulence in hamsters. Functional alterations due to amino acid substitutions in the F and H proteins were commonly responsible for neurovirulence among SSPE strains. F gene mutations were also responsible for the neurovirulence of measles virus derived from measles inclusion body encephalitis (MIBE). In addition, biased hypermutation in the measles virus genome, which is frequently found in viruses from SSPE and MIBE, was experimentally induced to the viral genome in the brains of nude mice. These findings are useful for the construction of defective- or segmented-type of recombinant measles virus vectors to treat SSPE.

研究分野：ウイルス学

キーワード：亜急性硬化性全脳炎 麻疹ウイルス 干渉現象

1. 研究開始当初の背景

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は、極めてまれな、小児の予後不良の疾患である。SSPE の治療法としては、イソプリノシンの内服とインターフェロンの脳室内投与が一般的である。リバビリンの併用療法も試みられているが、特異的、根治的な治療法は開発されておらず、新規治療法の開発が求められている。

通常の麻疹ウイルスとの比較研究から、SSPE 患者より分離された麻疹ウイルスには、ハムスターなどの実験動物を死滅させる変異が生じていることが脳内への感染実験により明らかにされてきた。しかしながら、SSPE 患者からのウイルス分離が困難であることから、実験動物に対して神経病原性をもつ、生きたウイルスそのものを扱った研究は極めて少ない。また、ウイルスゲノムに生じた変異は非常に多く、かつ多様であることから、複数の分離株の個々の遺伝子の変異と神経病原性との関連を丹念に解析する必要があった。近年の技術革新により、組換え麻疹ウイルスを作製することが可能となり、この問題を解決することができるようになった。

2. 研究の目的

まず、組換え麻疹ウイルス作製技術を応用して、SSPE の脳内感染拡大のメカニズムを明らかにすることを第 1 の目的とした。そして、SSPE の新規治療法の開発をめざして、明らかになった SSPE の変異の特徴を逆に応用した治療用ベクターの開発を第 2 の目的とした。すなわち、ゲノムの欠損したウイルスによる干渉作用により、完全長のゲノムをもつウイルスの増殖が抑制されるという現象を応用することを想定し、ゲノムの一部もしくは大部分に欠損をもつ組換え麻疹ウイルスを作製して、培養細胞およびハムスター脳に接種し、既に感染しているウイルスの増殖抑制・排除をもたらすことが可能かどうかの基礎研究を行った。

具体的には、(1) 複数の株について、細胞融合の増強および神経病原性に関与する F 蛋白のアミノ酸を特定する、(2) 複数の株について、レセプター特異性および神経病原性に関与する H 蛋白のアミノ酸を特定する、(3) ゲノムの一部を欠損させたウイルスを作製し、増殖させる培養系を考案し確立する、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 複数の株における細胞融合の増強およ

び神経病原性に関与する F 蛋白のアミノ酸の特定

SSPE 大阪 1 株、MIBE 大分株の F 蛋白のアミノ酸をもつ F 蛋白発現プラスミドを作製し、H 蛋白との共発現により細胞融合の変化を観察した。また、これらの変異をもつ組換え麻疹ウイルスを作製して、感染性、および神経病原性の変化を培養細胞やハムスターへの感染実験で検討した。また、現行麻疹ワクチンである CAM-70 株をベースに検討し、F 遺伝子に変異を導入することにより、神経病原性を獲得しうるか否かを検討した。

(2) 複数の株におけるレセプター特異性および神経病原性に関与する H 蛋白のアミノ酸の特定

SSPE 大阪 1 株、SSPE 大阪 2 株、SSPE 大阪 3 株の H 蛋白のレセプター特異性および神経病原性に関与するアミノ酸を同定するために、キメラ H 蛋白を発現するプラスミドを作製した。また、これらの変異をもつ組換え麻疹ウイルスを作製して、感染性、および神経病原性の変化を培養細胞やハムスターへの感染実験で検討した。

(3) ゲノムの一部を欠損させた組換え麻疹ウイルスの作製

H 遺伝子を欠損させたウイルスを作製するためのヘルパー細胞として、H 蛋白発現 T7 ポリメラーゼ発現 BSRT7/3 細胞および H 蛋白発現 B95a 細胞を作製した。H 遺伝子欠損ゲノムをもつプラスミドを作製し、上記 H 蛋白発現細胞を用いて増殖させるための組換え麻疹ウイルス作製実験を行った。

(4) 2 本のゲノムからなる組換え麻疹ウイルスの作製

欠損型ウイルスを作製する代わりに、複数のゲノムからなるウイルスの作製を試みた。まず、F 遺伝子欠損ゲノムと H 遺伝子欠損ゲノムからなるウイルスを BSRT7/3 細胞および B95a 細胞を用いて作製した。次いで、N, P, M, L 遺伝子からなるゲノムと、F, H および、蛍光蛋白 (hrGFP) 遺伝子からなるゲノムよりウイルスを作製した。ウイルスは、BSRT7/3 細胞へのトランスフェクションを行った後、B95a 細胞との共培養により回収を行った。

(5) ハムスター・マウスへの感染実験

3 週齢メスのゴールデンハムスターの脳内

に組換え麻疹ウイルスを接種し、神経症状の発現を観察し、発症率、死亡率を比較検討した。また、一部のハムスターを安楽死させて、ウイルスの再分離を行い、回収されたウイルスの遺伝子解析、および脳の病理学的検索を行った。また、5週齢のヌードマウス（BALB/c-nu/nu）にウイルスを脳内接種し、発症の有無を観察し、発症したマウスから回収されたウイルスの遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

(1) F 蛋白のアミノ酸置換と神経病原性との関連

SSPE 大阪 1 株では、F 蛋白の F₂ ドメインの heptad repeat (HR) C 領域と F₁ ドメインの HRA 領域のアミノ酸置換、中でも、94 番目（メチオニンからバリン、M94V）と 167 番目（アラニンからスレオニン、A167T）のアミノ酸置換が重要であることが明らかになった。M94V または A167T 単独の変異では SSPE 大阪 2 株の場合の様に致死性では無かったが、M94V と A167T の 2 か所の変異を同時に導入した場合には致死性な脳炎を誘導した（表 1）。

表 1. SSPE 大阪 1 株の F 遺伝子をもつ組換え麻疹ウイルスのハムスターにおける神経病原性

Virus	Incidence of disease
IC/F:OSA1ext	5/5
IC/F:OSA1cyt	0/5
IC/F:OSA1-F ₁ ext	0/5
IC/F:OSA1-F ₂	5/5
IC/F:M94V&A167T	5/5

各群 5 匹のハムスターに脳内接種し、発症率を比較した。

したがって、以前に SSPE 大阪 2 株の解析で示されたことが、変異の部位や程度が異なる SSPE 大阪 1 株においても同じ結論に達することが明らかになった。すなわち、細胞融合能の増強と神経病原性の獲得に關与するアミノ酸置換が F 蛋白に生じることが SSPE に普遍的な現象であることを証明できた。

また、MIBE 由来の大分株についても同様の解析を行ったところ、やはり、F 蛋白がハムスターにおける神経病原性を規定することが明らかになった。關与するアミノ酸の変異

の特定には至っていないが、Vero 細胞での細胞融合能の増強に關わる変異であることが共通している。SSPE と MIBE とでは宿主の免疫学的バックグラウンドや発症状況が異なるが、分離されたウイルスの変異と神経病原性との関連においては共通点が存在することから、発病病理としては類似していることが示唆された。

次に、実際の患者への応用を考慮して、ワクチン株を基に神経病原性との関連性を検討した。その結果、現行麻疹ワクチンの一つである CAM-70 株を基に作製された組換えウイルス rCAM-70 の F 遺伝子に SSPE 大阪 2 株の解析で神経病原性との関連が明らかになった T461I 変異を導入してハムスターに接種したところ、ハムスターは神経症状を呈して斃死した。また CAM-70 株の F 遺伝子に、SSPE 大阪 1 株の解析で神経病原性との関連が明らかになった A167T 変異、あるいは M94V + A167T 変異を導入したところ、ハムスターに対して致死性なウイルスに変化した。これらのことから、ワクチン株においてもわずか 1~2 か所のアミノ酸置換で致死性な病原性を獲得したウイルスに変化することが示された。

(2) H 蛋白のアミノ酸置換と神経病原性との関連

SSPE 大阪 1 株、SSPE 大阪 2 株の H 蛋白をもつ組換え麻疹ウイルスはハムスターに対する神経病原性を有することを既に明らかにしていたが、これに關与するアミノ酸置換を特定するために、キメラ H 蛋白を発現する組換えウイルスを作製してさらに検討した。大阪 2 株の H 蛋白では、C 末端のアミノ酸置換（終止コドンが変化し、さらに 3 アミノ酸の付加が生じている）が關与することを見いだした。大阪 1 株および大阪 3 株でも同様に C 末端のアミノ酸置換が生じている（ただし配列は異なる）が、この領域のみを導入したウイルスでは神経病原性を獲得することはできなかった。さらに変異アミノ酸を追加したウイルスを作製して検討したが、病原性に關与する領域、変異を特定するには至っていない。いずれにしても、H 蛋白の変異は F 蛋白の変異のように致死性な変異では無かった。

(3) ヌードマウスの脳内で生じる高頻度偏在変異

通常の麻疹ウイルスに相当する IC323 株を

ヌードマウスの脳内に接種すると、3-5 か月の潜伏期を経て神経症状を呈した後に死亡した。マウスからウイルスを再分離して遺伝子解析を行ったところ、ゲノムに A 塩基から G 塩基（ゲノムセンス）への変化が多数生じており、しかもそれが M 遺伝子に集中して認められるという現象、いわゆる高頻度偏在変異が生じていた(図 1)。

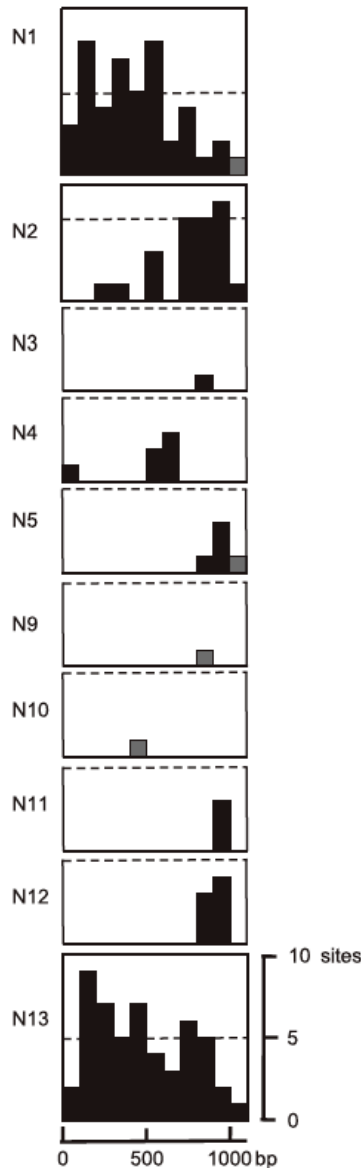


図 1. ヌードマウスに接種した麻疹ウイルス IC323 株に生じた M 遺伝子の変異
変異がほとんど無いマウスもあるが、高頻度
に A から G への変異（黒色）が生じている。

この変異が M 遺伝子だけに生じるのか否かを明らかにするために、ウイルスの増殖には不要な hrGFP 遺伝子をリーダー配列と N 遺伝子の間、または H 遺伝子と L 遺伝子の間に挿入した組換え麻疹ウイルスを用いて実験を

行った。その結果、リーダー配列と N 遺伝子の間に挿入された hrGFP 遺伝子にも同様の高頻度偏在変異が生じることが証明された。したがって、M 遺伝子以外の遺伝子にも宿主の酵素によると考えられる A 塩基から G 塩基への特異的な変異は生じうるが、脳内での増殖に必須な遺伝子、例えば N 遺伝子や L 遺伝子に変化が生じた場合には存続できず、必須ではない M 遺伝子や F 遺伝子の一部の領域に痕跡として残存することが証明された。この変異機構が SSPE の長い潜伏期を一部説明するものと考えられる。この特異な変異以外にも散在的に変異が認められたが、ハムスターにおける神経病原性を増大することが証明された変異は検出されなかった。

F、H 遺伝子の変異とアミノ酸置換による神経病原性への影響、免疫不全マウスでの通常の麻疹ウイルスの神経病原性の発現、および M 遺伝子の変異のメカニズムに関する結果は、今後のワクチンの品質管理や改良、また麻疹ウイルスを腫瘍溶解療法や遺伝子治療用のベクターとして用いる際にも有益な情報であると思われる。

(4) 欠損型ウイルスの作製

欠損型のウイルスを作製するための準備として、まず、H 蛋白発現細胞を作製した。BSRT7/3 細胞あるいは B95a 細胞に IC323 株の H 遺伝子をトランスフェクトし、薬剤耐性を指標に選択し、H 蛋白を恒常的に発現する細胞を樹立した。これらの細胞に F 蛋白を発現するプラスミドを導入したところ、H 蛋白発現 BSRT7/3 細胞ではさらに H 蛋白発現 B95a 細胞と共培養することにより、H 蛋白発現 B95a 細胞の場合にはそのまま細胞融合が誘導されたことから、どちらの細胞においても機能する H 蛋白が発現していることが確認された。しかしながら、これらの細胞を用いて H 遺伝子を欠損するウイルスの回収を試みたが、目的とするウイルスを回収することは現在まで成功していない。

そこで、F 遺伝子欠損ゲノム、および H 遺伝子欠損ゲノムをもつプラスミドからウイルスの回収を試みたところ、増殖可能なウイルスを回収することができた。そして、H 蛋白発現細胞を用いてクローン化を試みたが、H 遺伝子を欠くゲノムのみからなるウイルスを分離することはできなかった。将来的には安全性の面から、後述の分節型ウイルスよりも欠損型のウイルスが望ましいため、分節型

ウイルスの回収に向けた検討が今後も必要であると考えている。

(5) 分節型ウイルスの作製

当初の目標である欠損型ウイルスを得ることが困難であったことから、2つのゲノムからなる分節型ウイルスを利用する方法を検討した。上述のF遺伝子欠損ゲノムとH遺伝子欠損ゲノムからなるウイルスは、通常の麻疹ウイルスと同様の性質を示した。ハムスターを発症させるウイルスを接種した翌日にこのウイルスを重感染させて、発症率および死亡率に影響を及ぼすか否かを検討したが、結果に差は認められず、ハムスターは発症、死滅した。脳内での感染にはSSPEタイプのFが必要と推定されるが、ゲノムが大きいため干渉現象が誘導されないことも可能性として考えられる。

次に、ゲノムをさらに欠損させたウイルスの作製を試みた。IC323株のN、P、M、L遺伝子からなるゲノムと、IC323株のH、およびSSPE大阪1株のF遺伝子、さらにマーカーとしてのhrGFP遺伝子からなるゲノムをもとに、2つのゲノムからなるウイルスの回収を試みたところ、首尾よく回収することに成功した(図2)。このウイルスは、SSPE株やSSPE由来のF遺伝子をもつこれまでの1本鎖からなる組換えウイルスの解析結果と同様の性質を示し、Vero細胞で細胞融合を誘導することができた。

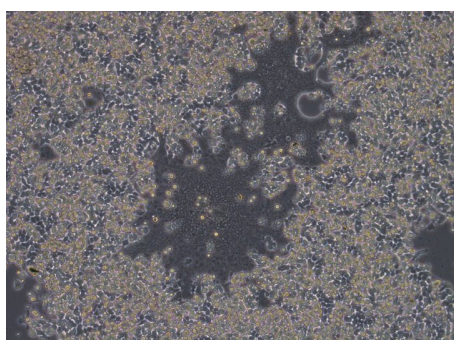


図2. 組換え麻疹ウイルス IC/NPML+F^{OSA1} HhrGFPの感染により生じたシンシチウム

今後、このウイルスの神経病原性の有無、先に感染させた病原性ウイルスの発症阻止または死亡率の低下の有無を検討していく予定である。また、種々の変異を導入した分節型ウイルスの作製を行って比較検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Ayata M, Tanaka M, Kameoka K, Kuwamura M, Takeuchi K, Takeda M, Kanou K, Ogura H., Amino acid substitutions in the heptad repeat A and C regions of the F protein responsible for neurovirulence of measles virus Osaka-1 strain from a patient with subacute sclerosing panencephalitis. *Virology* (2016) 査読有り, 487:141-149 DOI: 10.1016/j.virol.2015.10.004

Otani S, Ayata M, Takeuchi K, Takeda M, Shintaku H, Ogura H., Biased hypermutation occurred frequently in a gene inserted into the IC323 recombinant measles virus during its persistence in the brains of nude mice. *Virology* (2014) 査読有り, 462-463:91-97. DOI: 10.1016/j.virol.2014.05.035

〔学会発表〕(計 1件)

大谷早苗、綾田稔、竹内薫、竹田誠、小倉壽、ヌードマウスの脳内で持続感染した組換え麻疹ウイルス IC323 に生じた偏在高頻度変異、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綾田 稔 (AYATA, Minoru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90222702

(2) 研究分担者

扇本 真治 (OHGIMOTO, Shinji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・前期研究医

研究者番号：80292853

(削除：平成24年7月9日)

佐久間 悟 (SAKUMA, Satoru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医
研究者番号：80570605

(削除：平成24年7月9日)

小倉 壽 (OGURA, Hisashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：10115222

(削除：平成26年12月4日)

(3) 連携研究者

桑村 充 (KUWAMURA, Mitsuru)

研究者番号：20244668

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授