

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790457

研究課題名(和文) ウエストナイルウイルス感染ノックアウトマウスにおける脳内浸潤特異的T細胞の検討

研究課題名(英文) Evaluation of brain infiltrating T cells in KO mice infected with West Nile virus

研究代表者

北浦 一孝 (Kitaura, Kazutaka)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・診断治療研究室・研究員

研究者番号：00518136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：K0マウスのバックグラウンドであるC57BL/6マウスを用いて、ウエストナイルウイルスよりも取扱いが簡便な日本脳炎ウイルスをまず感染させ、免疫学的病態解明を行った。Ja0ArS982株の感染実験は感染後10日の体重変化から予後判定(死亡群と生存群)が可能である。両群間の免疫学的性状を比較したところ、死亡群では生存群よりもTh1タイプサイトカイン、細胞障害性因子の有意な増加が認められた。一方、Treg関連遺伝子の発現は生存群において増加した。T細胞受容体レベルでの解析では、脳内で死亡群と生存群で異なるT細胞クローンが存在した。質的に異なるT細胞が脳内に浸潤・増殖していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified brain-infiltrating T cells associated with a fatal outcome of Japanese encephalitis virus (JEV) infection in mice. Two groups of five mice were randomly selected from the dying and surviving groups and used in the analyses. Cytokine patterns in brains were first examined, revealing a higher ratio of Th1-related cytokine genes in dying mice. The expression levels of CD3, CD8, CD25, and CD69 increased in JEV-infected mice relative to mock-infected mice. T-cell receptor (TCR) usage and complementary determining region 3 (CDR3) sequences were analyzed in the brain-infiltrating T cells. T cells expressing VA8-1, VA10-1, and VB2-1 increased in both groups. However, the dominant T-cell clones as defined by CDR3 amino acid sequence differed between the two groups. The results indicate that the outcome of JEV infection, death or survival, was determined by qualitative differences in infiltrating T-cell clones with unique CDR3 amino acid sequences.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フラビウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウエストナイルウイルス (WNV) はフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスであり、罹患者の約 20~30% でウエストナイル熱を発症し、インフルエンザ様症状を認める。さらに感染者の約 150 例に 1 例で、髄膜炎及び脳炎のような重篤な神経症状を伴う[1]。WNV 感染症は 1990 年代半ばまで、中東、ヨーロッパ、アフリカにおける地方病であったが、現在ではアメリカ大陸を含む世界中に拡大し[2]、2005 年にはアメリカから帰国した男性がウエストナイル熱を発症し、国内初の輸入症例を認めた。しかしながら人間に対する WNV ワクチンや特異的治療法は存在せず、したがって軽視できない感染症であることは間違いない事実である。また、WNV 感染症で一部の症例において重篤な脳炎を引き起こすメカニズムは不明なままである。

WNV 感染時、T 細胞による細胞性免疫は、感染制御やウエストナイル脳炎の防御において重要な役割を果たす[3]。一方、タイラーウイルス、マウス肝炎ウイルスでは、脳炎や脱髄が重症化する[4, 5]ため、生体にとって必ずしも有益であるとは限らない。これまでに本研究の代表研究者である北浦らは、WNV を感染させた C3H/HeN マウスにおいて、T 細胞受容体 (TCR) レポートリー解析により脳内浸潤抗原特異的 T 細胞の存在を証明し[6]、過去に報告した近縁関係にある日本脳炎ウイルス (JEV) の特異的 T 細胞[7]とは異なることを見出した。さらに *in vitro* の実験において、WNV 及び JEV 脳内浸潤抗原特異的 T 細胞の間で、交差反応性が全くないことも確認した[6]。

これらはワクチン開発に際し、両ウイルス間の異なる部位に対して設計することが効果的である可能性を示したものの、脳内浸潤特異的 T 細胞が、生体において防御的に機能しているかの確認には至っていない。また脳内における免疫学的性状が Th1/Tc1 であると結論付けたものの、感染動物にノックアウト (KO) マウスを使用しておらず、純粋な T 細胞の機能を特徴付けるには他の要因が混在しており、CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の詳細な役割や特異性についても特定できていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの実験手法や結果を踏まえながら、KO マウスが整備されている C57BL/6 系マウスを用いて WNV 感染実験を実施する。そして免疫学的性状や脳内浸潤特異的 T 細胞を解析し、個体の生存に T 細胞がどのような形で寄与しているかをより詳細に検討したい。さらにこれらのマウス脳内より分離した WNV 特異的 T 細胞において、別の感染マウスへ移入実験を行い、脳炎の病態が改善するのか増悪するのかを、免疫組織学的解析、リアルタイム PCR による免疫関連

遺伝子の発現解析により検討したい。本研究によって得られる知見は、より安全性が高く、効果的なワクチンを開発するための基礎的な重要情報になるものと考えている。

3. 研究の方法

(1) B 細胞の μ 鎖及び T 細胞の CD4, CD8 KO マウス (C57BL/6 系) を用いて、WNV の感染実験を行う。経時的に脳を採取し、免疫組織学的検討、リアルタイム PCR による免疫関連遺伝子の発現解析により、ウイルスの局在及び浸潤細胞の免疫性状などの詳細な検討を行う。また、TCR レポートリー解析、相補性決定領域 3 (CDR3) の塩基配列解析により、脳内浸潤 T 細胞のクローン特異性を絞り込む。各 WNV 感染 KO マウスにおいて特定した T 細胞を、WNV 感染非 KO マウスにおける脳内浸潤 T 細胞と比較することで、これまで曖昧であった各 T 細胞の分画における免疫学的性状について詳細に検討する。

(2) さらに各 WNV 感染 KO マウスにおいて認められた WNV 特異的脳内浸潤 T 細胞のクローンを樹立し、別の WNV 感染マウスへ経時的に移入する。これにより、T 細胞の活性化がどの時点で個体の生存に有利であるか、不利であるかを検討する。特異的 T 細胞の活性化をターゲットとしたワクチンを開発する際にこれらの情報は重要なる。

4. 研究成果

(1) 動物種の選定

これまでウイルス感染マウスモデルとして作成してきたマウスの系統は C3H/He 系であり、ノックアウトマウスのバリエーションがないため、まずは基本的な感染実験をノックアウトマウスのバリエーションが豊富な C57BL/6 系に置き換える必要があった。そのため WT の C57BL/6 マウスにおける感染実験を実施した。また WNV は P3 であるため取扱いが難しいため、P2 で比較的取扱いが容易な JEV をまず採用し傾向をみた。

(2) 生存群と死亡群の決定

30 頭の C57BL/6j マウス (雌, 7 週齢) に JEV S982 (1.0×10^4 pfu, 0.5 mL) を皮下接種し、体重変化と症状の観察を毎日行い、感染後 (days post-inoculation, dpi) 21 日まで計測をした。8 匹の JEV 感染マウスは 13 dpi までに 25% 以上の体重減少を示し、これらのマウスは 21 dpi までに全頭死亡した。13 dpi に体重変化がなかったマウス、および体重減少が 10% 未満のマウスの中には死亡する個体はいなかった。群分け後に群平均体重を基に有意差検定を行ったところ、13 dpi より死亡群は生存群および非感染群と比較して有意に体重減少していた。さらに、群分け後の生存曲線解析では死亡群と生存群では有意に生存曲線が異なることが示された。

この結果は JEV 感染後の体重変化は予後と関連し、JEV 感染 B6 マウスの予後予測の指標

となることを示している。したがって 13 dpi に 25%以上体重が減少する群を死亡群とし、体重減少が見られなかった、もしくは 10%未満であった感染マウスを生存群とした。

(3) サンプル採取

次に 30 匹の C57BL/6j マウス(雌, 7 週齢)に JEV S982 (1.0×10^4 pfu, 0.5 mL)を皮下接種し、ウイルス接種日を 0 日として 13 dpi にマウスを吸入麻酔薬(イソフルラン)の過麻酔により安楽殺した。採取する組織は、脳内の感染免疫を精査する対象として大脳皮質、末梢を対象として脾臓を選択した。採取した大脳皮質、脾臓はプラーク法を用いたウイルス力価測定用と RNA 抽出用とに分けたのち、直ちに RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)に浸漬した。Total RNA の抽出は、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)を用いてメーカーのプロトコールにしたがって実施した。抽出した total RNA は、バイオアナライザー (Agilent Technologies)においてクオリティーチェックを行った。

(4) 生存群と死亡群における脳内ウイルス量の比較

JEV 感染マウスにおける生存群と死亡群の脳内ウイルス量を検討するため、ウイルス RNA 量およびプラーク法による力価の比較を 13 dpi において評価を行った。JEV の RNA 量は感染後 13 dpi で増加していたが、死亡群ではすべての個体の脳内で 10^6 コピー以上のウイルス RNA 量を示すのに対し、生存群では検出限界以下のものから死亡群と同程度のウイルス量を示す個体まで、個体によって脳内ウイルス量に大きな差が認められた。プラーク法によるウイルス粒子数の測定においても同様の結果であり、死亡群ではすべての個体が 10^6 pfu 以上であるのに対し、生存群では 10^2 - 10^8 pfu と、個体により大きなばらつきがあることが確認された。本研究では脳内ウイルス量に依存しない重症化要因を探索することを目的とするため、以降の実験においては生存群の中で JEV ウイルス量が 10^6 pfu/g 以上の個体の中から、無作為に 5 個体を選んで生存群として解析を行った。

(5) JEV 感染マウスの大脳皮質における病理解析

組織病理学的な検査において、JEV 感染群では単核球の炎症性浸潤が認められた。死亡群においては脳皮質の広い領域で神経細胞の変性が確認され、神経細胞上で JEV 抗原が確認された。生存群においては死亡群と類似の神経細胞感染を示していたが、大脳皮質における神経細胞の変性は死亡群と比較して少なかった。

(6) 生存群と死亡群の脳内における Th1, Th2 サイトカインバランスの比較

JEV 感染マウスにおける脳内の免疫性状の

評価を行うため、Th1 (IFN- γ , TNF- α) および Th2 (IL-4, IL-5)系サイトカインの mRNA 発現レベルを qRT-PCR で測定し、発現比率 (IFN- γ / IL-4, TNF- α / IL-4, TNF- α / IL-5) を 13 dpi で解析した(図 1)。その結果、JEV 感染マウス脳内の IFN- γ / IL-4 比率は非感染群と比較して有意に Th1 側に偏ったバランスを示した。また JEV 感染マウス群の比較では、死亡群の脳内サイトカインバランスは生存群と比較して Th1 側に偏っていた。

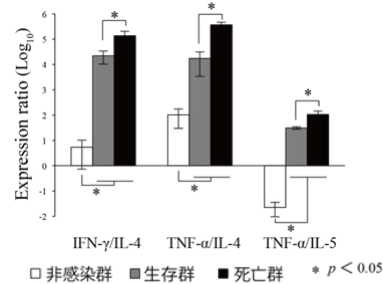


図 1. サイトカインバランス

Th1 関連サイトカインの産生を亢進させた要因を明らかにするため、2 つのサイトカイン転写制御因子 (T-bet, GATA3) を JEV 感染マウスで測定した(図 2)。13 dpi で非感染群のマウスと比較して T-bet と GATA3 は JEV 感染マウスで有意に発現量が増加していた。感染マウス群の比較では、死亡群では T-bet の発現量が生存群と比較して有意に増加した。一方、生存群では GATA3 の発現量が死亡群と比較して有意に増加した。

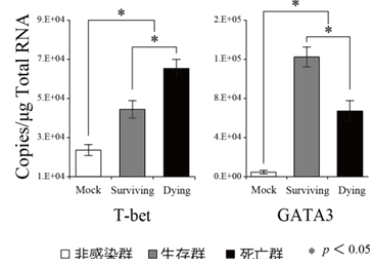


図 2. サイトカイン転写制御因子

(7) 生存群と死亡群の脳内における細胞表面抗原、細胞障害因子、Treg 関連遺伝子の発現量比較

脳内浸潤細胞の活性化状態を詳細に解析するために、T 細胞抗原標識分子 (CD3, CD4, CD8, CD25), リンパ球活性化標識分子 (CD69), 細胞障害因子マーカー (Perforin, Granzyme A, Granzyme B, FasL) の発現量を qRT-PCR を用いて解析を行った(図 3)。JEV 感染群では非感染群と比較して CD3, CD8, CD25, CD69 の発現量が有意に増加していた。しかしながら、死亡群と生存群の間には発現量に有意差は認められなかった。細胞障害因子としての Perforin と Granzyme A, Granzyme B は生存群と比較して死亡群で有意に発現量が増加していた。次に Treg 関連遺伝子 (TGF- β 1, Foxp3) の発現量を JEV 感染マウスで測定し

た．TGF- β 1 と Foxp3 はともに非感染感染群と比較して JEV 感染群では高い発現量を示した．さらに感染群内では生存群で有意に高い発現量を示した．

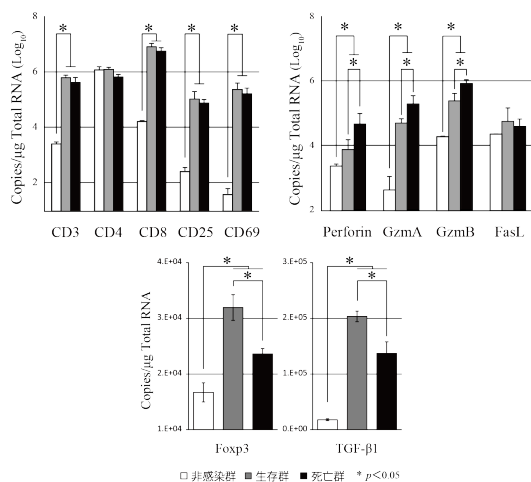


図 3. 脳内浸潤細胞の活性化状態

(8) 脳内浸潤 T 細胞の TCR レパトア解析

生存群と死亡群の間で脳内浸潤 CD3+CD8+T 細胞数や活性化因子に差は認められないが，サイトカインの性状や細胞障害因子活性について有意差があることが示された．これらの脳内免疫性状の相違が浸潤 T 細胞の質的な違いによるものかを明らかにするため，脳内浸潤 T 細胞の TCR AV と TCR BV のレパトア解析を行った (図 4)．

脾臓におけるレパトア解析においては，TCR AV および TCR BV レパトアいずれにおいても JEV 感染マウスおよび非感染感染マウス間に有意差を認めなかった．一方，JEV 感染マウスの脳において，VA8-1, VA10-1, VB2-1 を発現する T 細胞の相対頻度は，JEV 感染マウスもしくは非感染マウスの脾臓に比べ有意に増加した．一方，これらの TCR を発現する T 細胞の相対頻度は生存群と死亡群間の脳において差が認められなかった．

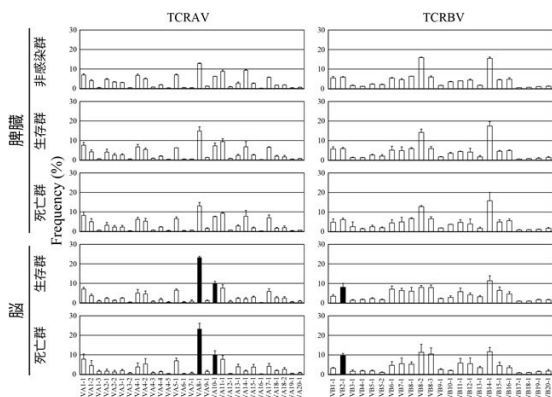


図 4. TCR レパトア解析

(9) 生存群と死亡群の脳内浸潤 T 細胞にお

ける CDR3 アミノ酸配列解析

PCR により増幅され，ランダムに選択された cDNA クローンを用いて VA8-1, VA10-1, VB2-1 の CDR3 アミノ酸配列を解析した．JEV 感染マウスの脳から得られた浸潤 T 細胞の CDR3 アミノ酸配列は cDNA クローン頻度とともに，個体ごとに評価した．非感染群の脾臓において 30 以上の cDNA クローンの解析を行ったが，同一配列のクローンは存在しなかった．

VA8-1 の解析において，死亡群のマウスから 4 種の同一のクローン型 CAL-R-SSNTNKVVF (5 頭/5 頭中), CAL-RM-SNYNVLYF (3 頭/5 頭中), CAL-RR-SNYNVLYF (3 頭/5 頭中), CALS-G-SNYNVLYF (2 頭/5 頭中) が得られた．死亡群の脳内から検出されたアミノ酸配列の中で，2 つのクローン型 (CAL-R-SSNTNKVVF, CAL-RR-SNYNVLYF) は生存群の脳内からもアミノ酸配列として検出されたが，各々のアミノ酸配列は生存群の 1 個体ずつに確認されたのみであった．

VA10-1 の解析においては生存群内で複数の個体に共通する 4 種のクローン型 (CA-P-DSNYQLIW (4 頭/5 頭中), CA-F-SGGSNAKLTF (3 頭/5 頭中), CA-PM-SNYNVLYF (2 頭/5 頭中), CA-I-DSNYQLIW (2 頭/5 頭中)) が確認された．一方で，死亡群内においても複数の個体に共通する 6 種のクローン型 (CAL-G-GSALGRLHF (4 頭/5 頭中), CAL-GY-YNQGLIF (3 頭/5 頭中), CAL-ID-SNYNVLYF (2 頭/5 頭中), CAL-GG-NYAQGLTF (2 頭/5 頭中), CAL-RG-ATGGNNKLT (2 頭/5 頭中), CA-R-NYNVLYF (2 頭/5 頭中)) が確認された．1 クローンのみ生存群と死亡群の各 1 個体に共通するクローンが確認された (CAL-RGSALGRLH) が生存群と死亡群でそれぞれ共通するクローンは完全に異なった．VB2-1 の解析では生存群内で複数の個体間に共通する 2 種のクローン型 (CSA-ETLYF (4 頭/5 頭中), CSA-DWG-SYEQYF (2 頭/5 頭中)) が検出されたが，そのクローンは死亡群の 1 個体にもそれぞれ確認された．また，死亡群内の複数の個体間に共通する 2 種のクローン型 (CSA-RLG-SYEQYF (4 頭/5 頭中), CS-PYN-SGNTLYF (2 頭/5 頭中)) が確認され，生存群の 1 個体にもそれぞれ同一クローンが確認された．また，生存群と死亡群にそれぞれ 4 頭ずつの個体に共通して確認されたクローン型 (CSA-GLGG-EQYF) も存在していた．

まとめ

生存群と死亡群間では，CD3 および CD8 の発現量に差は認められなかったことから，これら免疫性状の違いは脳内に浸潤する T 細胞の量によるものではなく，T 細胞の質によるものと考えられる．

TCR レパトア解析では，V 遺伝子のスクリーニングレベルでは生存群と死亡群の間で差を認めることはなかったが，CDR3 シーケン

スレベルでは、両者間における明確な違いを
発見することができた。したがって、脳内浸
潤T細胞の量的な差や活性化度に差は認めら
れなかったが、TCRの異なる質的に異なるT
細胞がそれぞれ脳内に浸潤・増殖しているこ
とが明らかとなった。

<引用文献>

[1] Watson JT et al. 2004. Ann Intern Med.
141:360-5. [2] Dauphin G et al. 2004. Comp
Immunol Microbiol Infect Dis. 27:343-55.
[3] Purtha WE et al. 2007. Eur J Immunol.
37:1845-54. [4] Lindsley MD et al. 1989.
J Immunol. 142:2677-2682. [5] Castro RF et
al. 1994. Virology. 200:733-743.
[6] Kitaura et al. 2011. J Immunol.
187:3919-30.

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 1件)

Shirai K, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki
T, Morita K, Suzuki R, Kurane I.
Qualitative differences in
brain-infiltrating T cells are associated
with a fatal outcome in mice infected with
Japanese encephalitis virus. Arch Virol.
2015 Mar;160(3):765-75.

〔学会発表〕(計 1件)

白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、
鈴木隆二、倉根一郎
日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎
発症に関わる脳内浸潤T細胞の解析
第60回 日本ウイルス学会学術集会
2012年11月13日 - 15日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
北浦一孝 (KITAURA, Kazutaka)

研究者番号：00518136

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：