

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660222

研究課題名(和文) 神経細胞のフラビウイルス感受性を規定する宿主因子：細胞分化からのアプローチ

研究課題名(英文) Host factors affecting the susceptibility of neurons to flavivirus: an approach from cellular differentiation

研究代表者

木村 享史 (KIMURA, TAKASHI)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：90261338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット中脳由来神経細胞株CSM14.1は分化依存的に日本脳炎ウイルス(JEV)感受性の低下を示す。分化状態によって発現が変動する遺伝子群をマイクロアレイ法にて解析し、これらのうちから神経細胞のウイルス感受性に関与する未知の宿主遺伝子を同定する目的で、未分化CSM14.1細胞での発現が分化CSM14.1に比較して高い遺伝子群より2個、分化CSM14.1細胞での発現が未分化CSM14.1細胞に比較して高い遺伝子群より2個の遺伝子を選別した。これら遺伝子を未分化CSM14.1細胞に過剰発現させ、JEV感受性の変動を解析した。

研究成果の概要(英文)：CSM14.1 is a rat mesencephalic neuronal cell line that can be induced to differentiate into neurons by culture under non-permissive conditions. CSM14.1 cells become more resistant to Japanese encephalitis virus (JEV) infection as they mature. Differentiation-dependent gene expression in CSM14.1 cells was analyzed by microarray. To identify host molecules that is responsible for the differentiation-dependent susceptibility of neuronal cells with JEV infection, we cloned two genes whose expression in undifferentiated CSM14.1 cell was higher than that in differentiated CSM14.1 cells, and also cloned other two genes whose expression in differentiated CSM14.1 cell was higher than that in undifferentiated CSM14.1 cells. Effect of expression of those genes in undifferentiated CSM14.1 cells on JEV-susceptibility was analyzed.

研究分野：農学

キーワード：日本脳炎ウイルス 神経細胞 ウイルス感受性

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本脳炎 (JE) は極東から東南アジア、南アジアにかけて広く分布するウイルス感染症である。日本脳炎ウイルス (JEV) 感染に際し、ヒトでは感染者の多くが不顕性感染に終わる。しかし、いったん脳炎症状を起こすと、死亡率は 20~40% に至る危険な疾患である。特に幼少児では死亡の危険が大きいことが知られており、より効率的な治療法の開発が求められている。

(2) JEV の標的細胞は神経細胞であり、神経細胞へのウイルス感染と増殖に続く細胞死が JE の本態である。従って、神経細胞の JEV 感受性を規定する宿主因子の解明は本ウイルスに対する予防治療戦略を構築する上で極めて重要であるにもかかわらず、これまでほとんど行われてこなかった。

(3) ヒト、動物の JEV に対する感受性は加齢に伴って低下することが知られている。本現象の背景には JEV の標的細胞である神経細胞の分化・成熟レベルが関与していると考えられており、加齢に伴って分化・成熟した神経細胞は胎生期、新生子期の未熟な神経細胞に比較して JEV 感受性が低いことが *in vivo* の動物実験によって示唆されている。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは不明である。

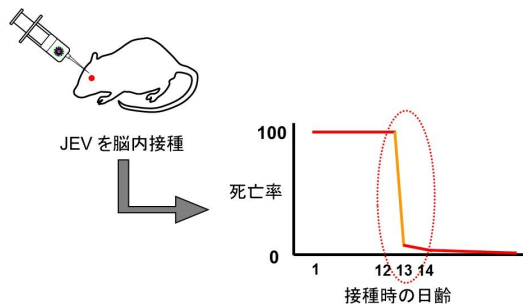


図. ラットの JEV 感受性は日齢と共に低下する

(4) CSM14.1 細胞はラット 14 日胚中脳由来神経細胞に温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子を導入して樹立された不死化細胞株である。培養温度を変化させることで未分化状態から分化状態となり、より成熟した神経細胞の性質を獲得する。分化誘導した CSM14.1 細胞は未分化状態に比較して JEV 感受性が低下するため、研究代表者らは本細胞を「神経細胞の分化・成熟に依存する JEV 抵抗性」の *in vitro* モデルとして提唱した (Kimura et al. *Microbiol Immunol* 57:723-31, 2013)。

2. 研究の目的

分化依存的に JEV 感受性の低下を示すラット細胞株 CSM14.1 を *in vitro* モデル系として用い、分化状態によって発現が変動し、かつ神経細胞のウイルス感受性に関する未

知の宿主遺伝子を同定・機能解析する。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ法により、JEV 高感受性を示す未分化 CSM14.1 細胞、8 日齢ラット脳と低感受性を示す分化 CSM14.1 細胞、17 日齢ラット脳の遺伝子発現を比較した。

(2) 未分化 CSM14.1 細胞は分化 CSM14.1 細胞に比較してより多くのウイルス粒子を細胞内に取り込むことが明らかになっている。そこで、未分化 CSM14.1 細胞での発現が分化 CSM14.1 に比較して高い遺伝子群ならびに分化 CSM14.1 細胞での発現が未分化 CSM14.1 細胞に比較して高い遺伝子群のうち、ウイルスのエンドサイトーシスに関与が推測される候補遺伝子をクローニングした。クローニングした遺伝子を CSM14.1 細胞に過剰発現させ、JEV 感受性の変化を解析した。

(3) 未分化 CSM14.1 細胞と分化 CSM14.1 細胞にそれぞれに JEV を感染させ、インターフェロン誘導の差異に関与する宿主分子をパスウェイ特異的なリアルタイム PCR アレイを用いて比較した。

4. 研究成果

(1) 「神経細胞の分化・成熟に依存する JEV 抵抗性」の *in vivo* モデルであるラットの脳組織と *in vitro* モデルである CSM14.1 細胞の遺伝子発現パターンを全ラットゲノムオリゴ DNA マイクロアレイ (アジレント) にて網羅的に比較した。その結果、ラット脳と CSM14.1 で共通して分化に伴い発現が増加する遺伝子が 78 個、減少する遺伝子が 13 個同定された。

(2) エンドサイトーシスへの関与が推測される遺伝子として、未分化 CSM14.1 細胞での発現が分化 CSM14.1 に比較して高い遺伝子群から 4 個、分化 CSM14.1 細胞での発現が未分化 CSM14.1 細胞に比較して高い遺伝子群から 3 個の候補遺伝子をクローニングし、発現コンストラクトを作成した。これら遺伝子を未分化 CSM14.1 細胞に過剰発現し、JEV 感受性を検討した。その結果、未分化 CSM14.1 細胞での発現が分化 CSM14.1 に比較して高い遺伝子 1 個はエンドサイトーシスの促進因子であり、分化 CSM14.1 細胞での発現が未分化 CSM14.1 細胞に比較して高い遺伝子 2 個はいずれもエンドサイトーシスの抑制因子であることが確認された。従って、本研究により、「神経細胞の分化・成熟に依存する JEV 抵抗性」に関与する可能性のある宿主遺伝子が同定された。

(3) 未分化 CSM14.1 細胞と分化 CSM14.1 細胞のそれぞれにおけるインターフェロン誘導に関しては、サンプル間のばらつきが大きいため、サンプルサイズを増加させてさらに

検討を行う予定である。

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 9 件)

Kobayashi, S., Sasaki, M., Nakao, R., Setiyono, A., Handharyani, E., Orba, Y., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Kimura, T., Sawa, H.*. 2015. Detection of novel polyomaviruses in fruit bats in Indonesia. *Arch Virol.* 160:1075-82. (査読有)

doi: 10.1007/s00705-015-2349-7

Anindita, P.D., Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Orba, Y., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H.*, Kimura, T.. 2015. Detection of coronavirus genomes in Moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. *Arch Virol.* 160:1113-8. (査読有)

doi: 10.1007/s00705-015-2342-1.

Kobayashi, S., Orba, Y., Yamaguchi, H., Takahashi, K., Sasaki, M., Hasebe, R., Kimura, T., Sawa, H. 2014. Autophagy inhibits viral genome replication and gene expression stages in West Nile virus infection. *Virus Res.* 191:83-91. (査読有)

doi:10.1016/j.virusres.2014.07.016.

Guo, X., Izume, S., Okada, A., Ohya, K., Kimura, T., Fukushi, H. 2014. Full Genome Sequences of Zebra-Borne Equine Herpesvirus Type 1 Isolated from Zebra, Onager and Thomson's Gazelle. *J. Vet. Med. Sci.* 76:1309-12. (査読有)

Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H., Kimura, T.* 2014. Isolation and characterization of a novel alphaherpesvirus in fruit bats. *J. Virol.* 88:9819-29. (査読有)

doi: 10.1128/JVI.01277-14

Yamaguchi, H., Kobayashi, S., Maruyama, J., Sasaki, M., Takada, A., Kimura, T., Sawa, H., Orba, Y. 2014. Role of the C-Terminal Region of Vervet Monkey Polyomavirus 1 VP1 in Virion Formation. *J. Vet. Med. Sci.* 76:637-44. (査読有)

Muleya, W., Sasaki, M., Orba, Y., Ishii, A., Thomas, Y., Nakagawa, E., Ogawa, H., Hang'ombe, B., Namangala, B., Mweene, A., Takada, A., Kimura, T., Sawa, H. 2014. Molecular Epidemiology of Paramyxoviruses in Frugivorous

Eidolon helvum Bats in Zambia. *J. Vet. Med. Sci.* 76:611-4. (査読有)

Sasaki, M., Muleya, W., Ishii, A., Orba, Y., Hang'ombe, B.M., Mweene, A.S., Moonga, L., Thomas, Y., Kimura, T., Sawa, H. 2014. Molecular epidemiology of paramyxoviruses in Zambian wild rodents and shrews. *J. Gen. Virol.* 95(Pt 2):325-30. (査読有)

doi: 10.1099/vir.0.058404-0

Makino, Y., Suzuki, T., Hasebe, R., Kimura, T., Maeda, A., Takahashi, H., Sawa, H. 2014. Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in particle transport. *J. Virol. Methods.* 195:250-7. (査読有)

doi: 10.1016/j.jviromet.2013.10.002

〔学会発表〕(計 2 件)

福井 佑基、青島 圭佑、小林 篤史、木村 享史 . イヌ血管肉腫における Notch シグナルの役割の解析、第 3 回日本獣医病理学専門家協会学術集会、2015 年 03 月 30 日、三鷹市公会堂 (東京都) 港 江利奈、青島 圭佑、小林 篤史、木村 享史 . ウマヘルペスウイルス 1 型 レセプター遺伝子導入マウスの作製、第 10 回北海道獣医病理三大学セミナー、2015 年 08 月 29 日、合宿の宿ひまわり (北海道夕張市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

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

木村 享史 (Kimura, Takashi)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：90261338