

論文の内容の要旨

ポリオウイルス感染の感受性決定機構の解析

指導教員 野本 明男教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 13 年 4 月入学
医学博士課程
病因・病理学専攻
吉河 智城

研究の背景

ポリオウイルス感染の組織特異性： ポリオウイルスはピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属し、急性灰白髄炎（小児マヒ）の原因となるウイルスである。その病原性のモデルは以下のように考えられている。経口感染の後、まず消化管で増殖する。さらに扁桃やパイエル板を介し、血流に侵入しウイルス血症となる。さらにウイルスは中枢神経系に到達し、神経細胞を破壊しマヒなどの発症に至る。ウイルス血症の間に、全ての組織はウイルスにさらされることになるのだが、中枢神経系以外に明確な病変やウイルス抗原が確認される組織はほとんど無い。つまりポリオウイルスの特徴は神経系で選択的に病変を示す点である。神経系で激しく増殖するのに、消化管以外の非神経系では増えにくいという感受性の明確な差が何故生まれるのかは長い間謎のままであった。一方で *in vitro* ではウイルスはほとんどの培養細胞にその由来組織に関係なく感染してよく増殖する。1949 年に Enders らがヒト胎児小腸由来の細胞を使ってポリオウイルスの増殖を行った。それ以来多くの初代培養細胞や株化細胞はその由来組織に関係なくウイルスは感染して増殖することがよく知られている。本来はウイルスに対しての感受性を持たない腎臓や、肝臓等の組織由来であっても培養細胞になれば感受性を獲得する。*in vivo* であれば明確に存在した組織特異性が *in vitro* になると無くなる理由は長い間不明であった。

感受性の違いを生む因子： ウイルスが感染し増殖をするためには、宿主側が持っている様々な因子が必要となる。今までウイルスの組織感受性の違いは、感染、増殖に必須な因子の発現が、組織によって偏りがあるためだと考えられてきた。逆に培養細胞の場合 *in vivo* では発現量の低かった因子が、*in vitro* での培養という環境の劇的な変化により誘導されてウイルスに対して感受性を獲得するようになると考えられた。ポリオウイルスは、ポリオウイルスレセプター（PVR）に結合後、脱核し細胞内に侵入する。PVR を持たない細胞へは感染しない。その後ウイルスタンパクの合成、ゲノム RNA の複製、ウイルス粒子の形成が行われてウイルスは増殖する。強毒株と弱毒株の中枢神経系での増殖能力を決めている比較的強い決定基は、ウイルス RNA の 5'-noncoding region に存在する internal ribosome entry site (IRES) にマップされてい

る。IRES はウイルス特異的蛋白合成開始のシスエレメントである。この機構には通常の mRNA の翻訳開始 (cap 依存性のタンパク合成開始) に必要な因子群以外に IRES *trans*-activating factors (ITAFs) を必要とすることが判明している。このことより感受性の違いは PVR や ITAFs に起因するのではないかと考えられている。1989 年に PVR の単離がなされ、トランスジェニック (tg) マウスが作製された。するとマウスはウイルス接種によってヒトの急性灰白髄炎と類似した症状、病変を示した。PVR-tg マウス組織での PVR 発現は感受性組織である神経系では神経細胞に強く発現が見られる。しかし、非感受性組織である腎臓でも糸球体に強い発現がみられた。PVR は感受性の一部を決定する因子だが発現していても感受性を持たない組織があり、これだけでは全てを説明しきれないことがわかった。また ITAFs として polypyrimidine tract binding protein (PTB)、La autoantigen、poly(rC) binding protein-2 (PCBP-2) などが同定されている。特に PTB は中枢神経系での発現は少なく、代わりに同じ遺伝子ファミリーの neural cell-specific PTB (nPTB) が高レベルで発現している。ポリオウイルス強毒株の IRES は PTB、nPTB とともに利用して効率よくタンパク合成を開始できる。弱毒株の IRES は PTB を利用可能だが翻訳効率は強毒株に劣りさらに nPTB は十分効率よく利用することができないことが明らかになっている。「IRES 依存性ウイルストロピズム」の一例である。しかし、非神経系組織にも PVR や ITAFs は存在するのでポリオウイルスは増殖できるはずである。そこでウイルスの組織感受性の違いを決定する因子として、PVR や ITAFs に加えて別の因子の存在を考える必要があった。

目的及び方法

我々は、PVR-tg マウスにウイルスを静脈内接種後、各組織中のウイルス量を比較したところ、PVR-tg マウスでは肝臓、脾臓、膵臓において一過性にウイルス量が増えて、その後減少する傾向があることを明らかにしていた。これは PVR によって細胞内に侵入できればウイルスは非神経系組織でも増殖しうること、一過性の増加であることからウイルス増殖に抑制的な因子が非神経系組織には存在していることを示唆している。我々は、その因子は自然免疫ではないかと推測した。また、*in vitro* においても IFN 処理をした細胞にポリオウイルスを感染させるとウイルスの増殖は著しく阻害される。IFN 作用の effector である OAS, protein kinase R (PKR) を単独で強制的に発現させた細胞でも EMCV の増殖は阻害されることがわかっている。そこで本研究では、もっともよく研究されている I 型 IFN に着目し、IFN α / β レセプター (IFNAR) を欠損しているノックアウト (KO) マウスと PVR-tg マウスを交配した。このマウスへのウイルスの病原性の変化を調べた。

実験結果

組織感受性の違いは IFN 応答によって説明できる： I 型 IFN レセプターを KO した PVR-tg マウスにウイルスを静脈内接種すると、非標的臓器であった、肝臓、脾臓、膵臓などで脳や脊髄と同等の効率よいウイルス増殖が見られた (図 1)。ウイルスは非神経系組織にも潜在的に感染が可能だが、IFN 系による防御機構のために十分な増殖ができなかったことを示している。す

なわち I 型 IFN 系はポリオウイルス特有の組織感受性を決定している負の制御因子であると結論づけられた。更にこの結果より、通常の非神経系組織は IFN 系による防御機構が神経系組織よりも強く働いているのではないかと推測した。そこで wt の PVR-tg マウス各組織の IFN 応答に関与する遺伝子群(IFN-stimulated genes (ISGs))の発現をリアルタイム定量 PCR によって調べた。その結果、肝臓、腎臓などの非感受性組織では、IFN- β や抗ウイルス作用に関わる effector である 2',5' oligoadenylate synthetase (OAS)1a 等や、IFN の誘導に重要な役割を果たしている regulator である RIG-I など ISGs の発現が感染前から神経組織に比べて高いレベルで発現しており、さらに感染後の発現量は更に増加した(図 2AB)。即ち、ポリオウイルスの非感受性組織は感染前から ISGs 発現量が比較的高いので、感染に対しすぐに応答してさらなる IFN を誘導して抗ウイルス状態になると思われる。一方で神経系では effector, regulator ともに発現量が低くウイルス感染に対する準備ができていないと考えられた。実際に poly I:C を中枢神経に接種するとポリオウイルス抵抗性が上昇した。

***in vitro* でのウイルス感受性の増加は ISGs 発現量の低下に起因する:** *in vitro* でほとんどの細胞がウイルス感受性を持つ大きな原因は IFN 応答が *in vivo* の感受性組織の様に弱くなるためではないかと考えた。そこで、PVR-tg マウスの初代培養細胞での OAS1a 等 ISGs の発現をリアルタイム定量 PCR によって調べた。*in vivo* では wt の PVR-tg マウス腎臓は感染前から高いレベルで OAS1a を発現しており、感染後更に増加した(図 3A)。一方で *in vitro* の初代培養細胞では wt の PVR-tg マウス由来であっても ISGs の発現量は、I 型 IFN レセプター KO マウス由来の細胞と同程度の非常に低い発現量であった(図 3B)。これらの結果より *in vitro* の多くの培養細胞は ISGs の発現量が非常に低く、ウイルス感染時に速やかな IFN 応答によって抗ウイルス状態になるための準備ができていないことが明らかとなった。このことが由来組織に関係なく初代培養細胞や株化細胞にウイルスは感染して増殖する大きな要因であることが示唆された。事前に細胞に IFN β 処理しておくことでポリオウイルスの抵抗性が上昇したことからこのことが示唆される。

結語

今までは PVR や ITAFs といったウイルスの複製に直接関与する因子が感受性の決定に重要であると考えられてきた。しかしこれらの発現量に神経組織、非神経組織といった明確な区別はない。したがってポリオウイルスは全身感染を引き起こしても良いはずである。本研究では新たに I 型 IFN 応答系が *in vivo* の組織においても、*in vitro* の培養細胞においてもポリオウイルス感染の感受性を決定する重要な負の因子の一つであることを明らかにした。ポリオウイルスの野生株にヒトが自然感染しても、ほとんどが軽微な症状などで終わり発症に至るのは感染したヒトの 1% 以下である。このことも、IFN 応答の効率で、ある程度説明できる可能性があると考えている。PVR、ITAFs、I 型 IFN 応答といった因子が相互に複合的に関与することで、細胞や組織のウイルスに対しての感受性が決定されていると考えられる。

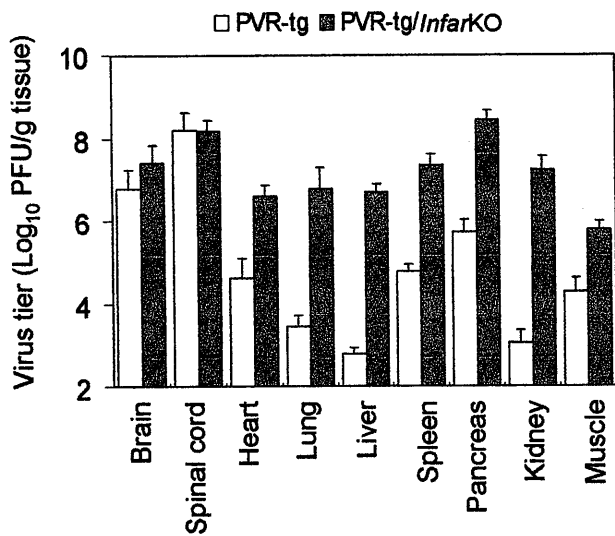


図1 PVR-tg、PVR-tg/*Infar*KOマウスの各組織でのウイルス量の比較。2x10⁷PFUのMahoney株を静脈接種し、その3日後に各組織を採取してウイルス量をプラークアッセイによって測定した。

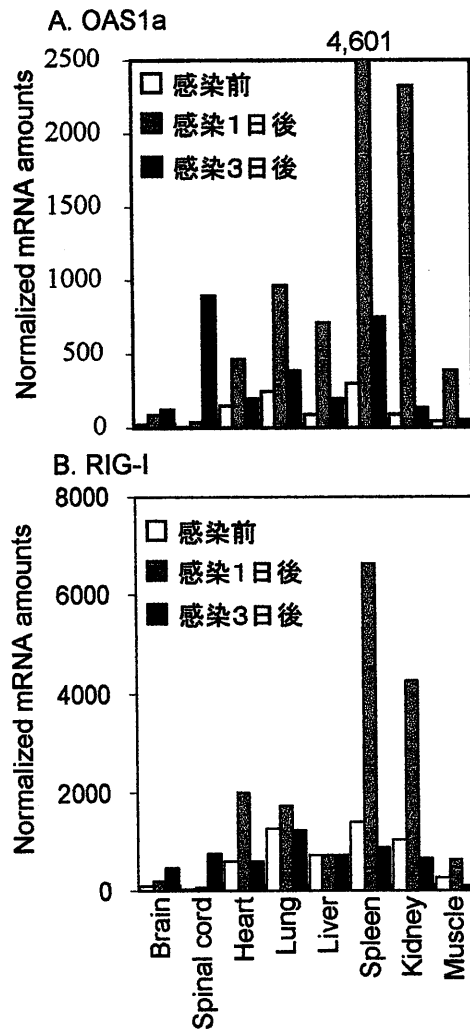


図2 PVR-tgマウスのISGsの発現。PVR-tgマウスの各組織中のOAS1a (A), RIG-I (B) mRNAの発現量をウイルス感染前と2x10⁷PFUのウイルスを静脈接種した後の経時変化についてリアルタイム定量PCRを用いて測定した。

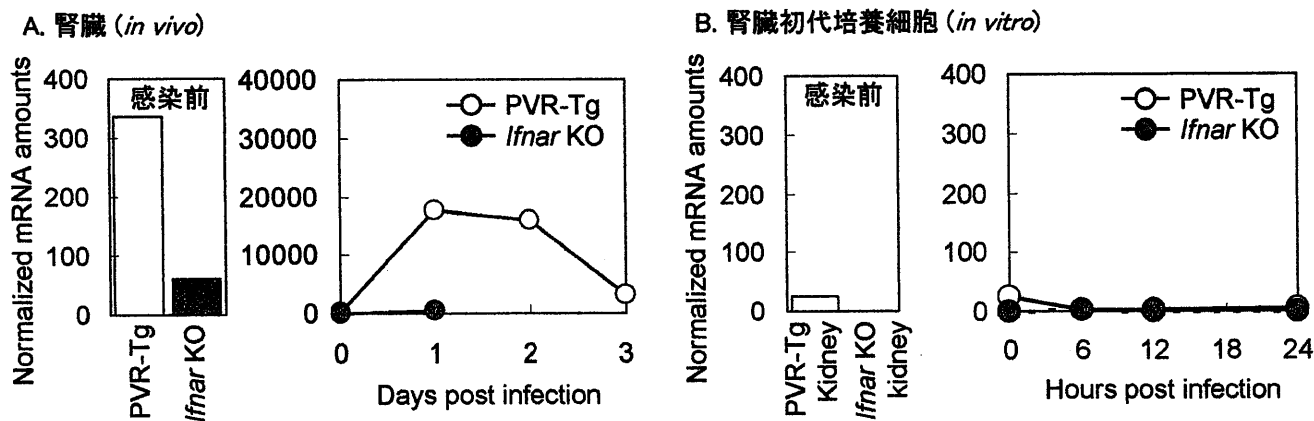


図3 PVR-tgマウス及びその腎臓初代培養細胞のISGsの発現量の比較。PVR-tgマウスに2x10⁷PFUのウイルスを静脈接種する前(A左)と後の腎臓中のOAS1a mRNA量の推移(A右)。PVR-tgマウスの腎臓初代培養細胞にMOI=0.001のウイルスを感染させる前(B左)と後の細胞中のOAS1aのmRNA量の推移(B右)