

論文の内容の要旨

論文題目 ポリオウイルス感染による神経細胞変性効果 (CPE) 発現機構の研究

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 14 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名：松田法恵

ポリオウイルス (PV) は小児麻痺の病因ウイルスであり、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類されるエンベロープを持たないプラス鎖 RNA ウイルスである。自然宿主はヒトのみであり、感染にはポリオウイルス受容体 (PVR ; CD155) を必要とする。PV による麻痺は非対称で、ウイルスが脊髄前角の運動神経で増殖し、その細胞を破壊することによって引き起こされる。PV 感染細胞ではクロマチンの凝集、膜小胞の増加、細胞の円形化などの細胞変性効果 (cytopathic effect : CPE) が起こり死に至る。様々な細胞種で PV による CPE が観察される一方で、神経細胞では持続感染が成立すること、感染後に感染阻止能

力を持つ抗体を添加することで CPE が抑制されることが報告されていた。そこで本研究では神経細胞の PV 抵抗性に着目し、抵抗性の機構および神経細胞での CPE 発現機構を解明することを目標とし実験を行った。

当研究室の柳谷らの実験により、神経細胞では PV 感染 2 時間後に抗体 (抗 PV 抗体または抗 PVR 抗体) を添加すると CPE が抑制されることが示されていた。また、感染阻止能力を持つ抗体を用いた場合にのみ CPE 抑制効果が見られたことから、CPE の発現には複数回の感染が必要であることが示唆されていた。しかし、抗体が感染阻止以外の効果によって CPE 発現抑制に寄与している可能性も否定できない。そこで、抗体を用いずに一回感染を実現するため、ゲノムの構造領域に欠失を持ち子孫ウイルスを産生しない欠陥干涉粒子 (DI 粒子) を作製し、感染実験を行った。

細胞にウイルスを 200 TCID₅₀ / cell で感染させ、感染 24 時間後に CPE を起こした細胞を除去し、生き残った細胞をクリスタルバイオレットで染色し観察した。DI 粒子を感染させた場合、HeLa 細胞では、全細胞が CPE を発現し細胞死に至ったのに対し、神経細胞 (SK-N-SH) 細胞では、かなりの細胞が抵抗性を示し細胞死を免れた。この結果から、神経芽種由来の SK-N-SH 細胞は、抗体の影響なしに、それ自体が DI 粒子の一回感染に対し抵抗性を持つことが明らかとなった。また、神経細胞での CPE の発現には複数回の感染が必要であること

が示唆された。

次に PV 感染で実際に複数回感染が起こりうるかを検討するためにウイルス干渉実験を行った。一回目の感染に DI 粒子を、二回目の感染に野生型 (wt) PV を用いてウイルス感染実験を行い、二回目の感染ウイルスからのウイルスタンパク質の合成をウエスタンブロット法で、ウイルス産生量をプラークアッセイ法を用いて検討した。DI 粒子のゲノムは構造タンパク質の領域に欠失を持つため、正常な構造タンパク質を発現しない。よって、ウエスタンブロット法で検出される構造タンパク質は二回目の感染に用いた wt PV からのウイルスタンパク質の合成を反映している。また、DI 粒子はプラークを形成しない、よって、プラークアッセイによって得られるウイルス産生量は二回目の感染に用いた wt PV からのウイルス産生量を反映している。一回目の感染から 3 時間の時点で二回目のウイルス感染を行った場合にもウイルスタンパク質の合成と子孫ウイルスの産生がみられ、二回目の感染が成立することが明らかとなった。これらの結果は、PV 感染では複数回の感染が可能であることを示しており、神経細胞での CPE の発現には複数回の感染が必要であるという考えと矛盾しないことを示すことが出来た。

SK-N-SH 細胞での CPE の発現に複数回の感染が必要であることが示唆された。そこで、DI 粒子を SK-N-SH 細胞に複数回感染させ、CPE が発現す

るか否かを検討した。DI 粒子を 1 回もしくは 4 回感染させ、感染 2 4 時間後に CPE を観察した。その結果 DI 粒子感染による CPE の発現に、1 回感染でも複数回感染でも顕著な差はみられず、wt PV 感染で観察されるような全細胞の CPE 発現には至らなかった。wt PV の複数回感染では CPE が発現するのに対し、DI 粒子の複数回感染では CPE が発現しないことから、この両者の違いは感染に用いたウイルス、つまり、 wt PV と DI 粒子の差によるものであると考えられた。DI 粒子ゲノムは構造タンパク質領域に欠損を持つことから、CPE の発現にはキャプシドタンパク質領域が関与している可能性が考えられた。

そこで、 PV の構造タンパク質が単独で細胞毒性を示すか否かを検討した。構造タンパク質の発現には PV の構造タンパク質 (P1) を発現する vaccinia virus vector (VV-P1) を用いた。Vaccinia virus の野生株 (WR 株) もしくは VV-P1 を HeLa 細胞および SK-N-SH 細胞に moi 100 で感染させ 1 時間後に CPE を観察した。HeLa 細胞でも SK-N-SH 細胞でも、P1 を発現していない WR 株感染細胞では CPE が観察されなかったのに対し、P1 を発現している VV-P1 感染細胞では CPE が観察された。以上の結果から、PV の構造タンパク質は単独で細胞変性効果を示すことが初めて明らかとなった。

今まで PV 感染による CPE 発現には、PV の非構造タンパク質の一つである 2A プロテアーゼ (2A^{pro}) が中心的な役割を果たすと考えられてきた。

HeLa 細胞では 2A^{Pro} の単独発現により CPE が起こることが報告されている。

しかし、神経細胞では 2A^{Pro} を単独発現させても CPE が観察されず、2A^{Pro} に抵抗性を示すことが報告されていた。今回 PV の構造タンパク質が細胞障害性を持つことが明らかになったことから、神経細胞における CPE の発現には 2A^{Pro} ではなく構造タンパク質が中心的な役割を果たしていることが示唆された。

本研究から、1) 神経細胞は PV の一回感染に抵抗性を持つこと、2) 神経細胞での CPE の発現には複数回の感染が必要であること、3) PV の構造タンパク質が細胞変性作用を持つことが明らかとなった。

PV 感染細胞の CPE 発現機構に関する詳細については、まだまだ不明な点が多いが、神経細胞の PV 抵抗性および CPE 発現機構の研究は、神経病原性の解明、ベクター開発、抗ウイルス薬の開発につながる大変重要な課題である。