

論文の内容の要旨

論文題目 Analyses of viral proteins in determining neurovirulence of rodent brain-adapted measles virus strain

(麻疹ウイルスげっ歯類脳馴化株の神経病原性発現に関わるウイルス蛋白の解析)

氏名 新井 哲郎

麻疹ウイルス(MV)は、牛痘ウイルス (RPV)、イヌジステンパーウイルス(CDV)などと共にパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属し、そのゲノムはマイナス一本鎖の非分節 RNA からなるモノネガウイルスである。MV はヒトを宿主とし、発熱、カタル症状、発疹とともに数週間にわたる免疫抑制を引き起こす。MV はまれに中枢神経系合併症を引き起こし、感染者のおよそ 1,000 人に 1 人の割合で急性散在性脳脊髄炎(ADEM)を、免疫不全患者に麻疹封入体脳炎(MIBE)を、また感染者のおよそ 100,000 人に 1 人の割合で亜急性硬化性全脳炎(SSPE)と呼ばれる予後不良の疾患を引き起こす。MV が中枢神経系に感染する機構を解明するために様々な研究がなされてきたが、その全様はいまだに明らかになっていない。

筆者らの研究グループは、MV ワクチン株である Tanabe-CAM 株をラット脳で 40 代にわたり継代することで樹立された、げっ歯類脳馴化株である MV-CAMR40 株を保有している。MV-CAMR40 はげっ歯類への脳内接種により急性脳炎を引き起こすため、MV 神経病原性の解析に有用な動物モデルとなる。そこで筆者は MV-CAMR40 を用いて、MV 神経病原性発現機構の基礎的研究を行った。本論文は以下の二章より構成される。

第一章：麻疹ウイルスげっ歯類脳馴化株の神経病原性発現に必要なウイルス蛋白の解析

MV のゲノムは N、P、M、F、H、L の 6 つの遺伝子からなる。このうち H 遺伝子がコードする Hemagglutinin (H) 蛋白が受容体特異性をもつ。MV ワクチン株は全てのヒト有核細胞に発現する CD46 を受容体として利用するが、MV 野外株が利用する受容体は CD46 ではなく免疫系細胞に発現する SLAM/CD150 であることが明らかにされた。さらに昨年 MV 野外株の呼吸器上皮細胞における受容体として PVRL4/Nectin-4 が報告された。一方、P 遺伝子がコードする Phosphoprotein (P 蛋白) は N 蛋白・L 蛋白とともにゲノム RNA と複合体を作るほか、宿主の自然免疫応答に関与する。筆者らの研究グループは、これまでに MV と近縁の RPV において、H および P 遺伝子が *in vivo* 病原性発現に重要な役割を果たすことを明らかにした。そこで筆者は RPV と近縁の MV においても同様の病原性発現機構が働いているのではないかと考えた。

筆者らの研究グループでは MV 臨床分離株である MV-HL 株をもとにしたリバーシジェネティクス系を確立している。MV-HL はサルにヒトの麻疹と類似した症状を引き起こすが、げっ歯類には病原性を示さない。そこで、MV-HL のリバーシジェネティクス系を利用し MV-CAMR40 の P および H 遺伝子を持つ組換えウイルス群、P 組換え(rMV-CAMP)・H 組換え(rMV-CAMH)・PH 組換え(rMV-CAMPH)ウイルスを作出した。

培養細胞においては、Vero 細胞(CD46+)/SLAM(-)では MV-CAMR40 由来の H 遺伝子を持つウイルス群が高い増殖性を示し、B95a 細胞(CD46+)/SLAM(+)ではいずれのウイルス群も高い増殖性を示した。H 蛋白のアミノ酸配列の比較から、MV-CAMR40 の H 蛋白は主として CD46 を、MV-HL の H 蛋白は SLAM を受容体として使用すると考えられ、培養細胞におけるウイルス増殖の特性は H 蛋白の受容体親和性を反映していると考えられた。

次に MV-CAMR40 が高い神経病原性を示した 1 週齢 C57BL/6 マウスを用いて *in vivo* 感染実験を行った。各ウイルスを脳内接種したところ、rMV-CAMP と rMV-CAMH 接種群では全例生存した。MV-CAMR40 接種群では接種後 3~4 日目に激しい臨床症状を示し、100%の致死率を示した。一方、rMV-CAMPH 接種群では接種後 5~7 日目に激しい臨床症状を示し、MV-CAMR40 と同様 100%の致死率を示した。臨床症状を観察したところ、rMV-CAMPH では MV-CAMR40 と同様、激しい体重減少と、歩行困難・間代性強直性けいれん・昏睡といった激しい神経症状を示した。一方 rMV-CAMH では一部に体重増加の停滞と活動性の低下がみられたが、全例生存した。rMV-CAMP では臨床症状はみられなかった。激しい臨床症状のみられたマウスと接種後 21 日目まで生存したマウスから脳を摘出し、ウイルス分離および病理標本の作製を行った。RT-PCR によるウイルス検出、10%脳乳剤のウイルス力価測定、脳切片の免疫染色によるウイルス抗原検出、HE 染色による炎症像の観察によっても、rMV-CAMPH は MV-CAMR40 に近い高い神経病原性を保持しており、一方 rMV-CAMH の神経病原性はそれに比べ著しく限定的であった。

MV の P 遺伝子には構造蛋白である P 蛋白の他にアクセサリ蛋白である V および C 蛋白がコードされており、これらは宿主の 1 型インターフェロン(IFN)系の阻害機能を持つことから *in vivo* 病原性を規定すると考えられている。このため筆者は rMV-CAMPH をもとに V/C 蛋白の欠損ウイルス、V(-)・C(-)・VC(-)を作製し、各種解析を行った。V/C 蛋白の欠損をウェスタンブロッティング法により確認し、B95a 細胞における *in vitro* 増殖性を調べたところ、V(-)の増殖は親株と同等であったが、C(-)・VC(-)ではウイルス増殖が一桁低下していた。各ノックアウトウイルスをマウスに脳内接種すると、V(-)および C(-)では致死率がそれぞれ 20%および 40%と、親株である rMV-CAMPH の致死率 100%と比べて低下しており、さらに VC(-)では致死率 0%と、完全に神経病原性を失っていた。また接種後 5 日目のマウス脳乳剤のウイルス力価の測定では、V(-)・C(-)では親株より増殖が一桁低下しており、VC(-)ではウイルス力価は検出限界以下となった。

この弱毒化の機構を調べるため、マウス脳初代培養細胞を用いた解析を行った。ウイルス感染細胞を、抗 MV-N 抗体と抗 MAP-2 抗体によって蛍光免疫染色したところ、各ウイルスとも親株と同様神経細胞に感染していた。次にリアルタイム RT-PCR 法によりウイルス N 蛋白の mRNA 合成を定量したところ、V(-)および C(-)では親株よりも mRNA 合成が低下していたが、VC(-)では親株よりも mRNA 合成が増加していた。また、ウイルス感染細胞から分泌された 1 型 IFN 活性を IFN バイオアッセイにより測定したところ、MV-CAMR40 では少量の 1 型 IFN 分泌が検出されたが、その他のウイルスについては検出限界以下であった。

これらのことから、rMV-CAMPH のマウスでの神経病原性発現には H、V および C 蛋白が必須であり、V/C 蛋白はウイルス RNA 合成およびウイルス増殖に影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、V/C 蛋白の欠損はウイルスの神経細胞指向性には影響を及ぼさず、また 1 型 IFN 誘導にもほとんど関与しないことが明らかとなった。

第二章：EGFP を発現する神経指向性組換え麻疹ウイルスの樹立

筆者は第一章においてマウス神経系で著しい増殖を示した rMV-CAMPH に着目した。ウイルスの生細胞での増殖を可視化するために、外来の蛍光蛋白である緑色蛍光蛋白 (EGFP)を組み込んだ rMV-CAMPH-EGFP を作出し、神経系における感染性を検討した。

rMV-CAMPH-EGFP は B95a および Vero 細胞において親株である rMV-CAMPH と遜色のないウイルス増殖を示し、感染細胞において EGFP の蛍光が確認できた。またマウス脳でも著しい増殖を示し、脳の広範囲にわたって EGFP の蛍光が観察された。さらにマウス脳初代培養ではウイルス感染の拡大が EGFP 蛍光によって経時的に観察できた。このことから、rMV-CAMPH-EGFP は *in vitro* および *in vivo* で親株である rMV-CAMPH と同様の高い増殖性を保持しており、またその増殖を蛍光顕微鏡下でリアルタイムに検出できることが確認できた。

次に rMV-CAMPH-EGFP をマウス脳初代培養に感染させ、神経細胞のマーカーである MAP-2 およびグリア細胞のマーカーである GFAP に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、rMV-CAMPH-EGFP は神経細胞に効率よく感染していることがわかった。

さらに、rMV-CAMPH-EGFP のヒト神経系細胞株における感染性を確認した。rMV-CAMPH-EGFP を 3 種のヒト神経系細胞株、IMR-32 (神経芽細胞腫)、118-MGC (神経膠腫)、KG-1 (乏突起膠腫)に感染させ、蛍光観察を行ったところ、rMV-CAMPH-EGFP は IMR-32 および 118-MGC 細胞において効率的に多核巨細胞形成を引き起こし、また KG-1 細胞では多核巨細胞形成を伴わずに多くの細胞で蛍光が検出された。このことから、rMV-CAMPH-EGFP はマウス神経系だけでなく、ヒト由来の神経系細胞株を用いた研究にも有用なツールとなりうることがわかった。

本研究では、第一章において MV-CAMR40 の神経病原性発現に H、V および C 蛋白が必須であることを明らかにし、また V/C 蛋白の *in vivo* 病原性における機能を解析した。第二章においては EGFP を発現する組換えウイルスを作出し、MV の神経系への感染機構を解析するツールとしての有効性を検討した。本研究の成果は麻疹ウイルスの神経病原性発現機構の基礎的研究に新たな知見を与えたと考えられる。