

審査の結果の要旨

氏名 新井 哲郎

本研究は麻疹ウイルス(MV)の神経病原性発現機構を明らかにするため、げっ歯類脳馴化株 MV-CAMR40 を用いた組換えウイルスの *in vitro* および *in vivo* 感染実験系によって、神経病原性発現に必要なウイルス蛋白の同定と新たな感染モデルの開発を試みたもので、下記の結果を得ている。

1. MV 臨床分離株でありげっ歯類に病原性を示さない MV-HL 株のリバースジェネティクス系を用いて、MV-CAMR40 株の P 遺伝子、H 遺伝子、および P 遺伝子と H 遺伝子の両方を組み換えた組換えウイルス群、rMV-CAMP、rMV-CAMH、rMV-CAPH を作出した。組換えウイルスの *in vitro* 増殖曲線の解析とウイルス蛋白のアミノ酸配列の解析により、培養細胞でのウイルス増殖は H 蛋白の受容体親和性に影響を受けると考えられた。
2. マウスでの *in vivo* 感染実験において、rMV-CAMP と rMV-CAMH はいずれも致死率が 0% であるのに対し、rMV-CAMPH のみが親株である MV-CAMR40 と同様 100%の致死率を示した。体重変化や神経症状といった臨床症状、RT-PCR によるウイルス検出と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の検出と HE 染色による炎症像の観察と併せ、rMV-CAMH でも若干の神経病原性はあるものの、MV-CAMR40 の高い神経病原性を再現するには P 遺伝子と H 遺伝子の両方を組み換えることが必要であることが示された。このことから、H 遺伝子は受容体特異性を、P 遺伝子は *in vivo* 病原性を規定することが示唆された。
3. P 遺伝子にコードされているアクセサリ蛋白、V 蛋白および C 蛋白の *in vivo* 病原性における機能を明らかにするため、rMV-CAMPH をもとにこれらを欠損させた V/C ノックアウトウイルス群を作出した。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、*in vitro* 増殖曲線を解析したところ、C 蛋白の欠損により B95a 細胞におけるウイルス増殖が低下することが示された。また V/C ノックアウトウイルスはいずれも親株に比べてマウスでの致死率が低下しており、脳乳剤のウイルス力価も低下していた。このことから、V/C 蛋白がウイルス増殖と神経病原性発現に重要な役割を果たすことが示された。
4. V/C 蛋白の *in vivo* 病原性における機能を調べるため、マウス脳初代培養を用いて V/C ノックアウトウイルス群の解析を行った。その結果、蛍光免疫染色法によりウイルスの神経細胞指向性には変化が見られず、またリアルタイム RT-PCR 法によりウイルス mRNA 合成が変化していることが示された。さらにインターフェロンバイオアッセイにより、これまで V/C 蛋白の機能として注目されていた 1 型インターフェロン誘導には変化が無いことが示された。
5. マウス神経系でのウイルス感染を可視化するために、マウス脳で高い増殖性を示す rMV-CAMPH に外来の蛍光蛋白である EGFP 遺伝子を挿入した rMV-CAMPH-EGFP を作出した。rMV-CAMPH-EGFP は *in vitro* において親株である rMV-CAMPH と遜色のないウ

ウイルス増殖を示した。rMV-CAMPH-EGFP のウイルス増殖は、培養細胞およびマウス脳において EGFP の蛍光観察によって可視化できることが示された。

6. rMV-CAMPH-EGFP のマウス脳初代培養におけるウイルス増殖は EGFP の蛍光観察によって経時的に観察できることが示された。また蛍光免疫染色法によりウイルスは主としてマウス神経細胞に感染していることが示された。rMV-CAMPH-EGFP はヒト神経系細胞株でも著しい増殖を示し、多核巨細胞形成を伴わないウイルス感染も可視化できることが示された。

以上、本論文はげっ歯類脳馴化株 MV-CAMR40 において H、V および C 蛋白がマウスにおける神経病原性発現に重要な役割を果たすことを明らかにした。また外来の蛍光蛋白を発現する神経指向性組換え MV を作出し、*in vivo* および *in vitro* での解析に有用であることを示した。本研究は MV による神経病原性発現機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。