

Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用

所 属 国立感染症研究所 ウイルス第一部
研究者 中道 一生

研究要旨 ミクログリアはウイルス性脳炎を含む炎症性脳疾患に深く関与する。ミクログリアを指向する薬剤探索において指標となるマーカーを特定するため、TLR3リガンドに対して活性化するミクログリアの遺伝子発現並びにシグナル経路を包括的に解析した。

A. 研究目的

末梢組織が細菌やウイルス、真菌、原虫等の多様な病原体による感染を受けるのに対して、脳組織では血液脳関門が障壁として機能し、大部分の病原体は侵入を阻止される。しかしながら、ヒト免疫不全ウイルスや節足動物媒介性ウイルス（日本脳炎ウイルスや西ナイルウイルス）、ヘルペスウイルス、狂犬病ウイルス等に代表される中枢神経系ウイルスは神経系細胞間を伝播することで、また白血球の脳内遊走や血管内皮細胞への感染を介して防壁を突破し、脳実質内に侵入する。これらのウイルス侵襲に対する脳内防御免疫は病原体の排除に働くが、閉鎖的環境における過剰な炎症反応は神経細胞の破壊を惹起し、ウイルス性脳炎発症の元凶となることが知られている。ウイルス性脳炎の特徴として、①他の脳疾患と比較した場合、その発生率は必ずしも高くはないが致死的な病態や重度の後遺症を引き起こすリスクが極めて高いこと、②有効な治療法がない場合が多いこと、③アウトブレイクによる大規模発生の危険性を有すること、等が挙げられる。一部のウイルス性脳炎の治療には副腎皮質ステロイドもしくは非ステロイド系の抗炎症剤が用いられているが、脳組織への特異性や全身性の副作用、抗ウイルス剤との併用等を考慮した場合、より高い効果と安全性を有する新規脳炎治療薬の開発が強く望まれる。

ミクログリアは中枢神経系に常在するマクローファージ様細胞であり、変性細胞を貪食除去するだけでなく、局所での炎症やウイルス侵襲を感知するセンサーとして、また脳内サイトカインネットワークの司令塔として働く。ミクログリアの活性化は脳組織における病原体の排除や恒常性維持において必須である一方で、慢性的なミクログリア活性化はウイルス性脳炎を含む様々な炎症性脳疾

患を引き起こすことが報告されている。したがって、ミクログリアの活性化を一時的、かつ効果的に抑制する新規薬剤の開発は脳疾患治療において多大な貢献を果たすことが期待される。

ウイルス性脳炎を対象としたミクログリア活性化抑制剤の候補物質探索では、①中枢神経系ウイルスが10種類以上に上り、各ウイルスの複製様式や病原性誘導機序が大きく異なること、②接種ウイルスの生産や精製において多大なコストを要すること、③その多くがヒトに対して重篤な病態を引き起こす危険性があり、熟達した手技と高度バイオハザード設備を要すること、④薬剤候補物質と抗ウイルス剤との併用による相乗効果や細胞障害作用を詳細に解析する必要があること、等の課題を解決しなければならない。したがって、ウイルス感染モデルを基盤とした大規模薬剤スクリーニングは困難を極める。

二本鎖RNA (dsRNA) はウイルス感染によって共通して産生される分子パターンであり、RNAウイルスのゲノム複製やウイルスに由来する相補mRNA、もしくはウイルスmRNAの二次構造（ヘアピンループ）の形成によって生じる。また、この分子パターンはTLR3受容体に代表される宿主分子によって認識され、NF- κ Bを基幹とする細胞応答を誘導することが報告されている。以上の研究背景に基づき、本研究では、dsRNAに対するミクログリアの活性化パターンを中枢神経系ウイルス感染の場合と比較検討し、両者において共通して応答するミクログリアの分子マーカーを特定することで、危険な病原体を取り扱うことなくウイルスに対するミクログリア応答モデルを確立できると考えた。

平成16年度の本研究では、合成dsRNA (poly inosinic-polycytidylic acid, poly(I:C)) によって活性化されるミクログリアの遺伝子発現並びに

細胞内シグナル伝達分子を包括的に解析し、ミクログリアの炎症性応答において指標となる分子マーカーを特定した。また、中枢神経系ウイルス感染に対するミクログリア活性化についても同様の解析を行い、これらの分子マーカーがウイルス感染に対するミクログリアの活性化を測定する際にも有用であることを確認した。

B. 研究方法

1. 細胞：

マウス初代培養ミクログリア由来細胞、及びマウス神経芽種由来NA細胞を用いた。

2. ウイルス：

狂犬病ウイルス (RV) 固定毒株 challenge virus standard-11 (CVS-11)、及び弱毒RVワクチン株 high egg passage-Flury (HEP) を用いた。ウイルスストックの調製及び力価測定にはNA細胞を用いた。また、シヨ糖密度勾配によるウイルス粒子の精製は常法に従った。

3. dsRNAパターンの認識による遺伝子発現誘導の解析：

ミクログリアをpoly(I:C)の存在・非存在下で培養した後、経時的に細胞を回収し全RNAを抽出した。常法に従って相補DNA(cDNA)を合成した後、サイトカイン(IFN- α 、及びIFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、GM-CSF、TGF- β 1、TGF- β 2)及びケモカインリガンド・受容体(CXCL2/MIP-2、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、CXCL11/I-TAC、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 α 、CCL4/MIP-1 β 、CCL5/RANTES、CX3CL1)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CXCR3、CXCR4)、接着分子(CD11a、CD11b、CD11a、CD49a、CD49b、CD49d、CD49e、CD49f、CD54、CD80、CD86)、一酸化窒素合成酵素等、約40種類の遺伝子を標的として定量的PCRを行った。

4. ケモカイン蛋白質の定量：

ミクログリアをpoly(I:C)存在・非存在下にて培養した後、経時的に培養上清を回収し DuoSet ELISA Development kit(R&D Systems Inc)を用いてケモカイン産生量を測定した。

5. シグナル分子リン酸化の解析：

Poly(I:C)処理したミクログリアを経時的に回収し、TritonX-100及び蛋白質分解酵素阻害剤、脱リン酸化酵素阻害剤を含む緩衝液に浮

遊させた後、超音波破碎処理をおこなった。得られた蛋白質をSDS-PAGEにより分離した後、リン酸化・非リン酸化状態のシグナル伝達分子(I κ B及びNF- κ B p65、MKK1/2、MKK3/6、MKK4、ERK1/2、JNK1/2、p38、C/EBP β 、STAT-1、STAT-3、STAT-5、STAT-6、ATF-2、c-Jun等)に対する抗体によるウェスタンブロット解析に供した。

6. シグナル経路活性化阻害実験：

ミクログリアをU0126及びPD98059、SB202190、SP600125、CAPE、BAY11-7802等の阻害剤にて前処理した後、poly(I:C)処理を行った。培養上清を回収した後、ケモカイン産生量を上記の方法により定量した。

7. 液体内pHの中和試験：

ミクログリアをbafilomycin A1及びmonensinにて前処理し、poly(I:C)刺激を行った。細胞並びに培養上清を回収した後、シグナル分子の活性化とケモカイン産生量を上記の手法を用いて調べた。

8. ミクログリアにおけるRV感染様式の解析：

ミクログリアにRVを多重感染度2にて接種した後、FITC標識抗RV-N抗体を用いて蛍光染色した。また、培養上清中への子孫ウイルスの放出をフォーカス形成試験により測定した。

9. ウイルス感染によるミクログリア活性化機序の解析：

ミクログリアにRVを感染させ経時的に細胞を回収した後、蛋白質と全RNAを抽出した。ウイルス感染による遺伝子発現パターン並びにシグナル分子の活性化、さらには遺伝子発現誘導に関与するシグナル経路を上記の手法を用いて調べた。

10. ウイルス侵襲を受けた脳組織における遺伝子発現応答：

RV(CVS株)をC57BL/6系統マウスの下肢筋肉内に接種した後、時間経過毎に脳を摘出し、上記遺伝子群を対象としたリアルタイムPCRを行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いたウイルス感染実験については国立感染症研究所動物実験指針に従うとともに、動物愛護を最大限尊重した上で遂行した。

C. 研究結果

1. dsRNA刺激に対するミクログリアの遺伝子発現応答:

近年の報告から、dsRNAはミクログリアにおいてIFN- β やIL1- β 等のサイトカイン遺伝子の発現を誘導することが知られている。しかしながら、広範囲の免疫関連遺伝子を対象とした発現応答プロファイルは明らかとなっていない。本研究ではサイトカイン及びケモカイン、接着分子、細胞傷害因子等の遺伝子群を標的とした定量PCRを行い、dsRNA処理したミクログリアにおける遺伝子発現の時間的、量的な変動パターンを調べた。合成dsRNAであるpoly(I:C)を用いて刺激したミクログリアでは、接着分子やケモカイン受容体、細胞障害因子等の遺伝子発現量においては軽微な変化しか認められなかったが、炎症性サイトカイン(IL- β 、IL-6)及びケモカイン(CXCL2、CXCL10、CCL2、CCL5)の遺伝子発現が有意に増加した。とりわけCXCL10遺伝子の発現はpoly(I:C)刺激の最初期から応答し、長時間培養後もmRNA量が安定して維持されること、また刺激後2時間以降にはCXCL10蛋白質が細胞外へ放出されることが分かった。

2. dsRNA刺激によって活性化されるミクログリアの細胞内シグナル分子の解析:

ミクログリアは、様々な外界刺激に対して細胞内シグナル伝達系を活性化することが知られている。しかしながら、dsRNAに対するミクログリアの細胞内シグナリングの詳細は不明である。そこで、ミクログリアをpoly(I:C)処理し、シグナル分子群のリン酸化を広範囲に調べた。Poly(I:C)処理したミクログリアではSTAT経路等の活性化は軽微であった。これに対して、NF- κ B及びERK1/2、JNK、p38を介したシグナル経路はPoly(I:C)刺激に対して迅速に応答することが分かった。核酸を認識する数種のTLRは細胞内の液胞においてリガンドを認識することが報告されているため、dsRNAによるミクログリア活性化におけるエンドソームの役割を調べた。プロトンポンプ(H⁺-ATPase)阻害剤、もしくはイオンキャリアーを用いて液胞内pHを中和した場合、poly(I:C)によるシグナル分子活性化は顕著に抑制されることが分かった。

3. dsRNA誘導性CXCL10発現における細胞内シグナリングの役割

dsRNAの認識によるミクログリアのシグナル経路活性化と、CXCL10の高発現誘導との関連を明らかにするため、各シグナルカスケードに対する特異的阻害物質の存在下でのCXCL10発現誘導を調べた。Poly(I:C)刺激に対するミクログリアのCXCL10発現は、NF- κ B及びJNK、p38シグナリングを阻害することで顕著に低下した。以上の研究結果より、ミクログリアは液胞内においてdsRNA構造を認識することで、特定のシグナル伝達経路を活性化し、CXCL10の発現を選択的に誘導することが分かった。

4. 中枢神経系ウイルス感染に対するミクログリアの遺伝子発現応答:

上記1.から3.までの研究結果から、ウイルス感染に共通の分子構造に対するミクログリア活性化プロファイルが明らかとなった。しかしながら、ミクログリア活性化モデルとして合成dsRNAを用いる場合には、観察された応答が実際のウイルス感染によっても生じうることを証明しなければならない。そこで、中枢神経系ウイルスをミクログリアに感染させた後、上記と同様の手法を用いて、遺伝子発現誘導及びシグナル分子の活性化を調べた。代表的な中枢神経系ウイルスであるRVを接種したミクログリアでは感染が成立し、ウイルス由来蛋白質が発現されるものの、子孫ウイルスは産生されないことが分かった。また、ミクログリアにおけるRVの増殖障害はウイルスゲノム複製前の過程において生じていることが分かった。さらに、RV感染に対してミクログリアは、dsRNA刺激の場合と同様の遺伝子発現パターンを示すことが分かった。

5. 中枢神経系ウイルス感染に対するミクログリアの細胞内シグナル分子活性化:

dsRNA刺激に対するミクログリアのシグナル分子活性化が、実際のウイルス感染においても誘導されるか否かを検討した。RVを接種したミクログリアでは、NF- κ B並びにERK1/2、JNK、p38シグナルカスケードの活性化が観察された。また、各経路に対する阻害物質の存在下でのミクログリア応答を解析した結果、CXCL10の発現誘導は(dsRNA刺激の場合と同様に)NF- κ BとMAPKシグナリングを介することが分かった。

6. 脳へのウイルス侵襲による遺伝子発現応答:

ウイルス侵襲に対する脳内免疫応答を把握するため、ウイルス感染脳を摘出し、遺伝子発現プロファイリングを行った。RVを接種したマウス脳内ではミクログリアをdsRNAにて刺激した場合と同様の遺伝子発現誘導が観察された。とりわけ、CXCL10の発現は脳内へのウイルス侵襲の最初期から高発現することが分かった。

D. 考察

脳内への病原体侵襲、とりわけウイルス感染においてミクログリアは防御免疫の司令塔として機能し、その排除に働く。しかしながら、慢性的なミクログリア活性化はウイルス性脳炎における重篤な病態や後遺症の元凶となることが知られている。したがって、ウイルス性脳炎の治療には抗ウイルス剤の開発と同様に、ミクログリアの活性化を一時的に抑制する新規薬剤の探索が強く求められる。本研究では、中枢神経系ウイルスを用いた薬剤スクリーニングにおける問題点(研究開発時のコストや危険性)を考慮し、ウイルス感染において共通して産生される分子パターン(dsRNA)に対するミクログリアの応答機序を基盤として細胞活性化測定系を確立することを目的とした。初年度における本研究では、dsRNAの認識によって活性化されるミクログリアの炎症性応答マーカーを特定すべく、poly(I:C)刺激に対する遺伝子発現応答並びにシグナル分子の活性化を包括的に解析した。

これまで、ミクログリアは脳に常在するマクロファージとして考えられてきたが、近年、末梢マクロファージとは異なる遺伝子発現様式や組織特異性、神経細胞の保護や高次脳機能への関与等が報告されており、脳内ホメオスタシスの維持のために特殊化した細胞であることが示唆されている。また、血液脳関門によって隔離された脳組織に侵入する病原体の多くはウイルスであるため、ミクログリアがウイルス感染に対して末梢マクロファージとは異なった細胞応答を示すことが考えられるが、これらの詳細は解明されていない。本研究の結果、ミクログリアはdsRNAを認識することでNF- κ B及びERK1/2、JNK、p38を介したシグナルカスケードを活性化することが示された。また、各々のシグナリングは、TLR3リガンドが細胞内のエンドソームにおいて認識されることで活性化すること、この過程にはプロトンポンプ(H⁺-ATPase)を介した液胞内の酸性化が必須であることを明らかにした。ミクログリアにおけるシグナル分子の活性化はdsRNA刺激直後から誘導されるとともに、炎症性応答において中心的な役割を担うことから、細胞活性化を高感度かつ迅速に測定するための指標

として応用できると考えられる。

dsRNA刺激に対するミクログリアの遺伝子発現解析を行った結果、サイトカイン及びケモカイン遺伝子の発現が選択的に誘導されることが明らかとなった。とりわけ、CXCL10遺伝子はdsRNA刺激に対して最も迅速かつ高レベル(約300倍)の発現応答を示すことが分かった。また、中枢神経系ウイルスを感染させたミクログリア、さらにはウイルス侵襲を受けた脳組織においてもCXCL10が高発現することを示した。CXCL10はマクロファージ系細胞等によって分泌されるケモカインであり、受容体であるCXCR3を介してT細胞や単球、NK細胞の遊走を促進する。中枢神経系においてCXCL10は柔組織内への白血球浸潤のインデューサーとして機能し、様々な脳疾患における免疫応答及び炎症反応に深く関与することが知られている。CXCL10は、①dsRNA刺激の最初期に発現誘導される、②産生された蛋白質は培養上清中へと放出されるため細胞溶解等のステップを省略することができる、③細胞培養上清中において安定であり、長期保存が可能である、④ウイルス感染においても発現が誘導される、⑤炎症性脳疾患への関与が確認されている、⑥発現誘導に関与する細胞内シグナル分子が(本研究において)特定されている等の点から、ミクログリア活性化の炎症性応答マーカーとして有用であると思われる。

以上の研究の結果、ミクログリアの炎症性応答を高感度かつ迅速、安全に測定するための分子マーカーを特定した。平成17年度の本研究では、これらの炎症性応答マーカーを指標としてミクログリアの活性化をモニターするための試験系を確立し、その有用性を評価する。

E. 結論

ウイルス感染において共通の分子パターンであるdsRNAの認識を介して活性化されるミクログリアの遺伝子発現及びシグナル伝達経路を特定するとともに、両者の相互関係を明らかにした。これらの遺伝子発現並びに細胞内シグナリングの活性化は、ウイルス感染に対するミクログリアの活性化を高感度かつ迅速、安全に測定するための応答マーカーとして応用することが可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

上記の研究成果を学術雑誌に投稿し、二報が審査中。一報が投稿準備中。

2. 学会発表

中道一生・齊木めぐみ・森本金次郎・倉根一

郎. 狂犬病ウイルス感染によるミクログリア
のMAPキナーゼ活性化とケモカイン発現誘導.
第52回日本ウイルス学会学術集会・総会. 2004
年11月(横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし