

野澤直樹、井上直樹 CMV の先天性感染機構
日本臨床 64 巻増刊号 3: 446-450 (2006)

2. 学会発表

N. Inoue, T. Suzutani, H. Ogawa, S. Koyano, Y. Baba, H. Yan, K. Ishibashi, Y. Yamamoto, Y. Inami, N. Nozawa, K. Omori, K. Fujieda, I. Kurane.
Epidemiology of congenital CMV infection in pediatric patients with severe sensorineural hearing loss: prevalence, viral loads, and genotypes. The 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, 2006.

野澤直樹, 古谷野伸, 倉根一郎, 井上直樹 尿・唾液などの液体試料を塗布した濾紙片を直接使用したリアルタイムPCR法の開発: 尿中のCMV検出を実例として 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋市 2006年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1 GPCMVMプラスミドライブラリー

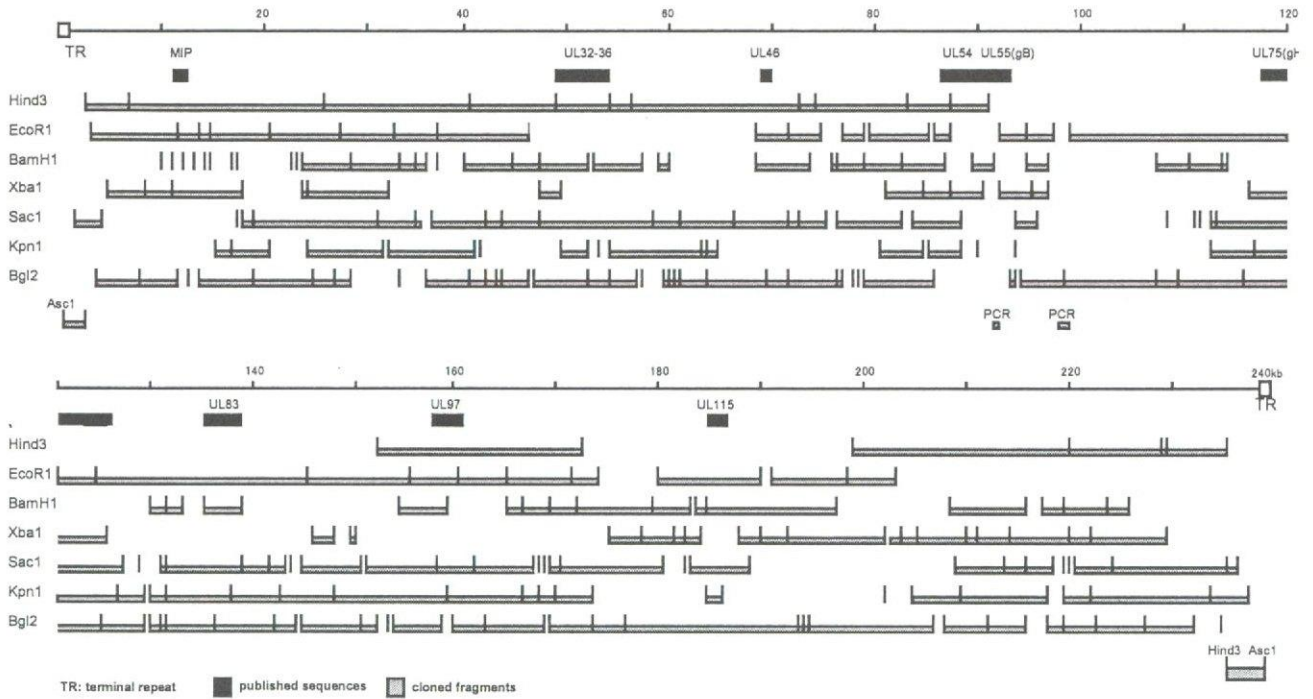


図2 GPCMVMの他の宿主のCMVとの遺伝子構造の類似性

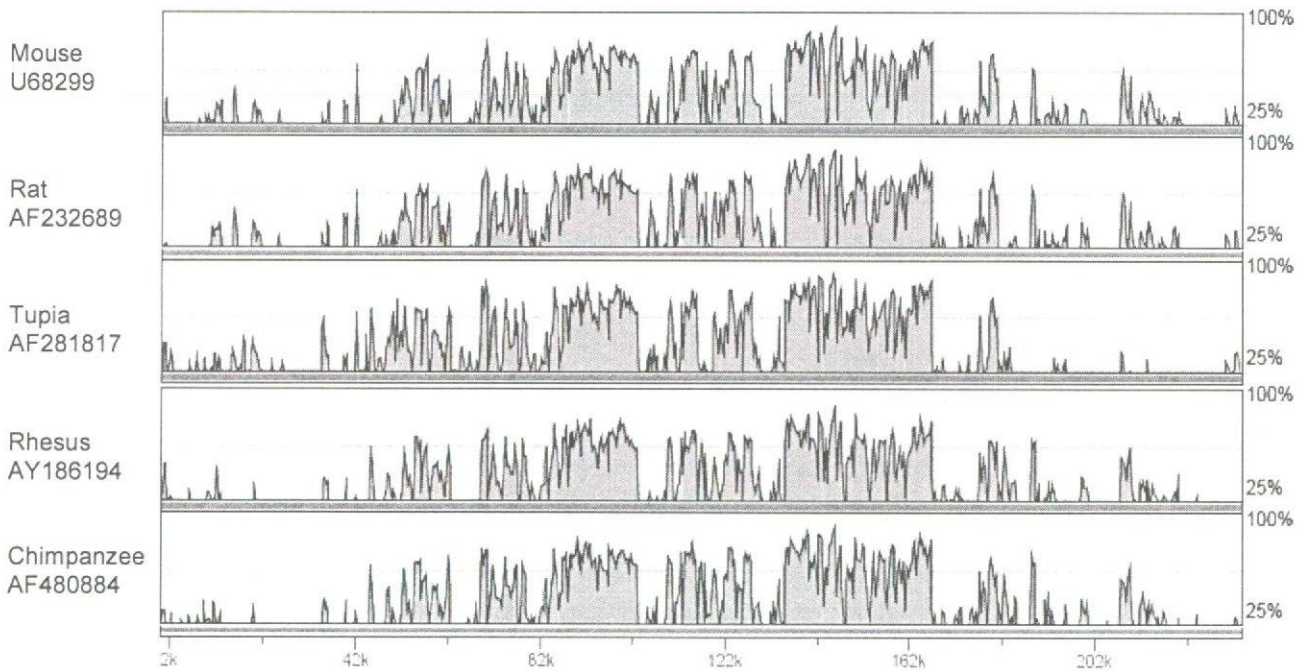


図3 GPCMVの翻訳領域
 (数字番号及びUS番号がヒトなどのCMVに類似性が見出された翻訳領域)

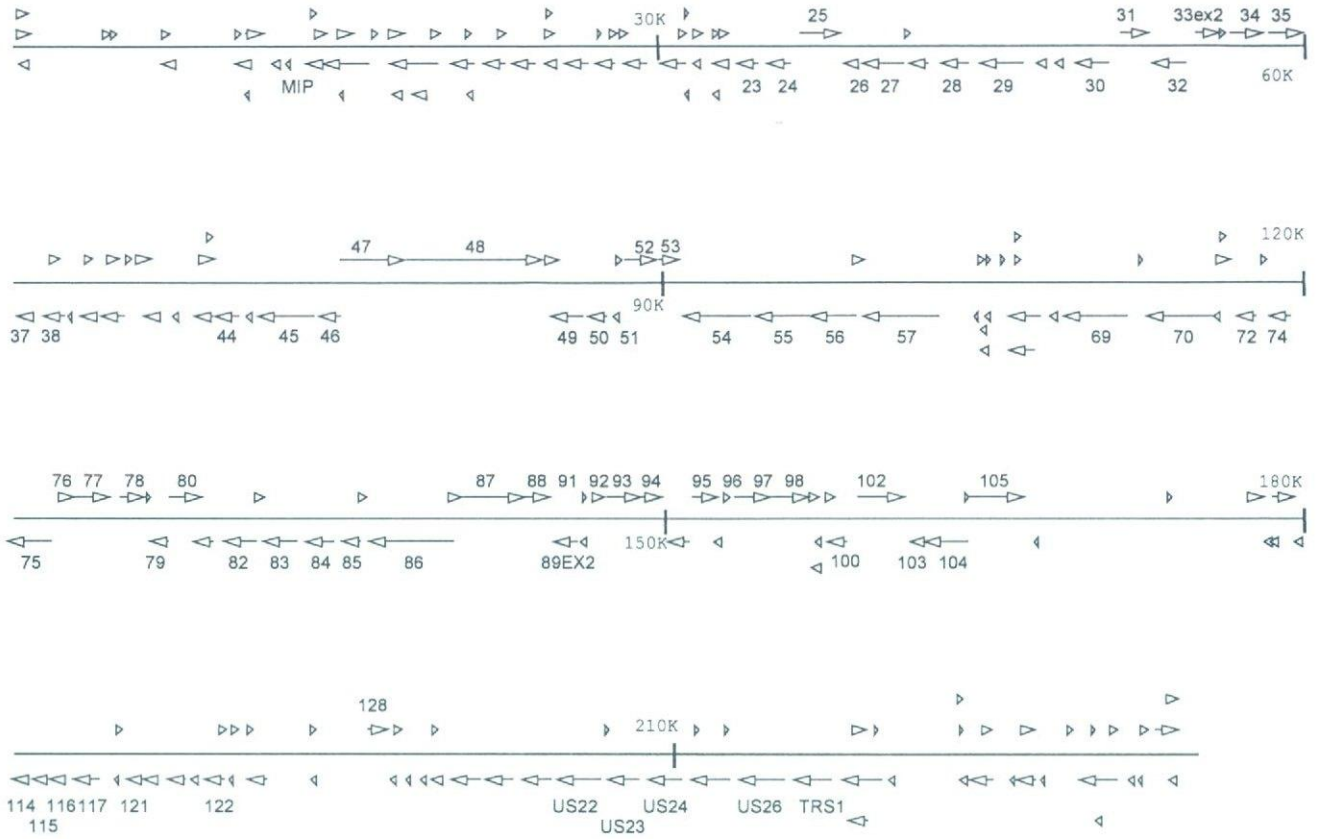


図4 他のCMVとの遺伝子レベルでの類似性

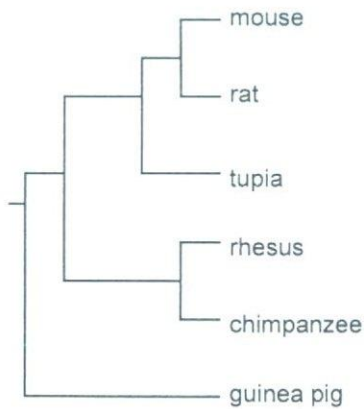
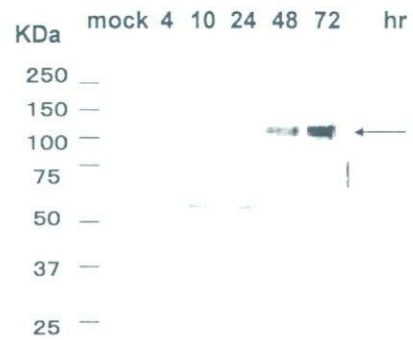


図5 作製した抗体を用いたGPCMV IE蛋白の検出



サル痘ウイルス Zr-599 株（コンゴ盆地型）と Liberia 株（西アフリカ型） の霊長類における病原性

分担研究者：西條政幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第一室）
協力研究者：網 康至（国立感染症研究所 動物管理室）
長谷川秀樹（国立感染症研究所 感染病理部 第二室）
永田典代（国立感染症研究所 感染病理部 第二室）
森川 茂（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第一室）

研究要旨：天然痘ワクチンの有用性を評価するための動物モデルを開発する目的で、サル痘ウイルス Zr-599 株（コンゴ盆地型）と Liberia 株の霊長類における病原性について比較検討した。サル痘ウイルス Zr-599 株または Liberia 株 10^6 PFU を、それぞれ 3 頭のカニクイザルに皮下接種し、臨床症状および各種ウイルス学的指標について解析した。Zr-599 株の方が Liberia 株より、より重篤な症状を引き起した。Zr-599 株感染サルにおけるウイルス血症レベルも、Liberia 株感染サルにおけるそれよりも高かった。さらに Zr-599 株は、Liberia 株に比べて、消化管および泌尿生殖器系臓器により強い病変を引き起した。霊長類において、コンゴ盆地型サル痘ウイルス Zr-599 株は、西アフリカ型 Liberia 株よりも強い病原性を示す。カニクイザルをモデル動物として天然痘ワクチンの有用性を評価するには、コンゴ盆地型サル痘ウイルスを用いるべきである。

A. 研究目的

天然痘が根絶された今日においても、天然痘の原因ウイルスである痘瘡ウイルスがバイオテロリズム病原体として用いられる危険性があることから、天然痘ワクチンおよびその評価法の開発が重要である。本研究では、天然痘ワクチンの効果を評価するための感染動物モデル（霊長類であるカニクイザル）を開発する目的で、サル痘ウイルスの中でもコンゴ盆地型サル痘ウイルス Zr-599 株と西アフリカ型 Liberia 株の病原性の違いを明らかにした。

B. 研究方法

1) ウイルス. 国立感染症研究所に保存されているサル痘ウイルス Zr-599 株（コンゴ盆地型）と Liberia 株（西アフリ

カ型）を用いた。これらのサル痘ウイルスは、オルソポックスウイルス属ウイルスの A-type inclusion body (ATI) 遺伝子におけるサル痘ウイルスに特異的な塩基配列を確認して同定された。

2) カニクイザルとサル痘ウイルスの感染方法. 10 頭のカニクイザル (*Macaca fuscicularis*) を用いた。 10^6 plaque forming unit (pfu) のサル痘ウイルス Zr-599 株を、3 頭に皮下接種経路 (Zr-599-SC 群) で、2 頭に鼻腔内噴霧経路 (Zr-599-IN 群) で感染させた。また、 10^6 pfu の Liberia 株を 3 頭に（西アフリカ型）皮下接種経路 (Liberia-SC 群) で、残りの 2 頭に鼻腔内噴霧経路 (Liberia-IN 群) で感染させた。

- 3) 臨床症状の観察およびウイルス学的指標の解析. サル痘ウイルスの皮下接種後, 食餌摂取量, 体重, 体温, 糞便性状等, 臨床症状を観察した. また, 2 から 4 日毎に全身麻酔下で約 5ml の末梢血液を採取し, 末梢血液検査, 生化学的検査, ウイルスゲノム血症レベル, 末梢血液からのウイルス分離, 病理学的検査を施行した. ウイルスゲノム血症レベルは, サル痘ウイルス ATI-遺伝子の特異配列を利用した定量的 LightCycler-PCR (qLC-PCR) 法によった. また, 感染性サル痘ウイルスは, 末梢血液 4ml から buffy coat 分画を採取し, 同分画に含まれる細胞成分を PBS で洗浄して Vero 細胞と共培養して分離した. サル痘ウイルスは, Vero 細胞で増殖する際に, 細胞から細胞へ接触して感染が広がる性質があることから, プラークを形成する. このプラーク数を数えることにより感染性ウイルス量を決定した.

- 4) 感染実験. カニクイザルを用いたサル痘ウイルスの感染実験は, 国立感染症研究所の高度安全研究施設内で行われた. この感染実験は, 国立感染症研究所実験動物委員会の承認のもとに行われた.

C. 結果

- 1) 体重の推移. Zr-599-SC 群で最も体重減少が激しく, 観察期間中体重の回復がみられなかった. 一方, その他の群では食欲の回復および体重の増加が認められた (図 1). Liberia-SC 群の 1 頭 (#4567) は, 敗血症を合併し感染 10 日後に死亡した.
- 2) 皮膚病変. 水疱性膿疱性病変は Zr-599-SC 群で最も多く, 次いで Liberia-SC 群, Zr-599-IN 群の順に多く, Liberia-IN 群で最も少なかった (表 1).
- 3) 末梢血ウイルスゲノム血症レベルは Zr-599-SC 群で最も高く, 次いで Zr-599-SC 群と Liberia-SC 群 (敗血症を伴った #4567 を除く) の順に高く,

Liberia-IN 群で最も低かった (図 2).

- 4) 内部臓器における肉眼的病変. Zr-599-SC 群と Liberia-SC 群においてサル痘ウイルス感染による内臓 (消化器系臓器や泌尿生殖器系臓器) 病変を比較すると, Zr-599 株は Liberia 株より強い病変を引き起した. Zr-599-SC 群 3 頭において, 胸腺, 胃, 大腸, 泌尿生殖器系に肉眼的病変が認められたのは, それぞれ, 3 頭, 3 頭, 3 頭, 1 頭であったのに対し, 敗血症を伴った #4567 を除く Liberia-SC 群 2 頭では, それぞれ, 1 頭, 1 頭, 2 頭, 1 頭であった.
- 5) 予後. Zr-599-SC 群の 3 頭はすべて致死性であった. 一方, Liberia-SC 群のうち敗血症をともなった 1 頭を除き 2 頭は生存した. また, Zr-599-IN 群の 1 頭で重症サル痘を, 残りの 1 頭は軽度サル痘を発症した. Liberia-IN 群の 2 頭はともに比較的軽度サル痘を発症した.

D. 考察

本研究では, 天然痘ワクチン効果を検討するための霊長類を用いた評価系を開発する目的で, 用いられるべきサル痘ウイルス株, および, チャレンジウイルス感染経路について検討した. 西アフリカ株サル痘ウイルスとコンゴ盆地型サル痘ウイルスの間に病原性に違いがあることがかねてかれ指摘されていたが, 本研究では両者の病原性における違いが詳細に明らかにされた. 中央アフリカ, 特にコンゴ民主共和国で流行しているヒトサル痘の病原体であるコンゴ盆地型サル痘ウイルスを用いることと, 比較的症状の重軽に差が生じないようにチャレンジウイルスを皮下接種経路で感染させることが望ましいと考えられる.

Zr-599 株感染群と Liberia 株感染群におけるウイルス血症レベルの推移を比較すると, 興味深い点が明らかにされた. ウイルス血症レベルの最高値が Zr-599 株感染群でより高く, さらに高い値が観察期間中 (約 3 週間) 維持されているこ

とである。Liberia 株感染群では、感染後約 10 日前後に最高値を示し、徐々に低下していく傾向が確認された。サル痘ウイルス感染サルでは、局所および所属リンパ節で増殖したウイルスの増殖に伴う初期のウイルス血症（初期ウイルス血症）に引き続いて、内部臓器で増殖したウイルスによる感染後期のウイルス血症（後期ウイルス血症）が認められる。Zr-599 株感染群と Liberia 株感染群でのウイルス血症レベルおよびそのパターンの違いは、Zr-599 株が Liberia 株に比較して、内部臓器により強い病変を引き起す性質を有していることを反映していると考えられる。Zr-599 株が Liberia 株より高い病原性を呈する性質の違いは、リンパ系組織、消化管臓器、および、泌尿生殖器系臓器における増殖能、または、それらの臓器に対する親和性の違いにあるものと考えられる。

E. 結語

コンゴ盆地型サル痘ウイルスは、霊長類において西アフリカ型サル痘ウイルスより高い病原性を呈する。新規に開発される天然痘ワクチンを含む天然痘ワクチンを評価するには、霊長類にコンゴ盆地型サル痘ウイルスを皮下接種経路で感染させる系が望ましいと考えられる。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, George-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Philippe M, Georges AJ, Kurane I, Morikawa S. Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant nucleoprotein detection of authentic Marburgvirus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 59:323-325, 2006
- 2) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. *Journal of Virology* 80:5179-5188, 2006
- 3) Saijo M, Niikura M, Ikegami T, Kurane I, Kurata T, Morikawa S. Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:437-443, 2006
- 4) Ike F, Bourqade B, Sato H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Yamada Y, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa N, Mekada K, Takakura A, Itoh T, Obata Y, Yoshiki A, Montagutelli X. LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comparative Medicine* (in press)
- 5) Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* (in press)
- 6) Shirato K, Nishimura H, Saijo M, Okamoto M, Noda M, Tashiro M, Taguchi F. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 139:78-84, 2007
- 7) Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shirato K,

- Kurane I, Morikawa S. Mechanism of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 347:261-265, 2006
- 8) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Evaluation of a vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of valuable for SARS-CoV neutralizing antibody responses to SARS-CoV. *Journal of Medical Virology* 78:1509-1512, 2006
 - 9) Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 46:236-243, 2006
 - 10) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Letter* 580:1417-1424, 2006
 - 11) 西條政幸. ウイルス講座「天然痘」. 感染制御 2 : 342-346, 2006
 - 12) 西條政幸. 根絶されたはずの天然痘の今. *小児科臨床* 60:149-154, 2007
2. 学会発表
- 1) Saijo M, Georges-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Marianneau P, Georges AJ, Kurane I, Romanowski V, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-base diagnosis of Lassa fever-antibody and antigen detection systems. *Filoviruses: Recent advances and future challenges, An ICID global conference, Winnipeg, Canada, September 2006*
 - 2) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC18m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal, June 2006
 - 3) Yokote H, Shinmura Y, Satou A, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal, June 2006
 - 4) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy study of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. *ASM Biodefence Research Meeting, Washington DC, USA, February 2006*
 - 5) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎、佐多徹太郎、倉田毅、森川茂. サル痘ウイルス Zr-599 株（コンゴ盆地型）と Liberia 株（西アフリカ型）の霊長類における病原性. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月
 - 6) 西條政幸、錫谷達夫、水田克巳、倉根一郎、森川茂. チミジンリン酸化酵素遺伝子の 1 番目と 45 番目のコドンに存在するメチオニンの間に終始コドンが存在する HSV-1 の薬剤感受性. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 本研究で用いられたカニクイザルおよびサル痘ウイルス感染症による皮膚病変（水疱性膿疱性病変数），ウイルス血症レベル（最高値），症状の重軽，および，予後

群	ID	水疱性膿疱性病変数	最高ウイルス血症レベル [log10(copies/ml)] (感染後日数)	重症度	予後
Zr-599-SC	#4651	390	8.4 (6)	極めて重症	安楽殺
	#4653	1150	8.4 (6)	極めて重症	安楽殺
	#4683	388	7.1 (13)	極めて重症	安楽殺
Zr-599-IN	#4654	178	7.8 (18)	重度	生存
	#4655	1	6.1 (7)	軽度	生存
Liberia-SC	#4650	29	6.5 (7)	軽度	生存
	#4567*	560	8.7 (9)	極めて重症	安楽殺
	#4639	196	6.2 (7)	重症	生存
Liberia-IN	#4695	10	4.2 (10)	軽度	生存
	#4696	16	5.2 (10)	軽度	生存

*:敗血症を合併し，全身症状が悪化したため感染 10 日目に安楽殺

図 1. 各群における体重の推移

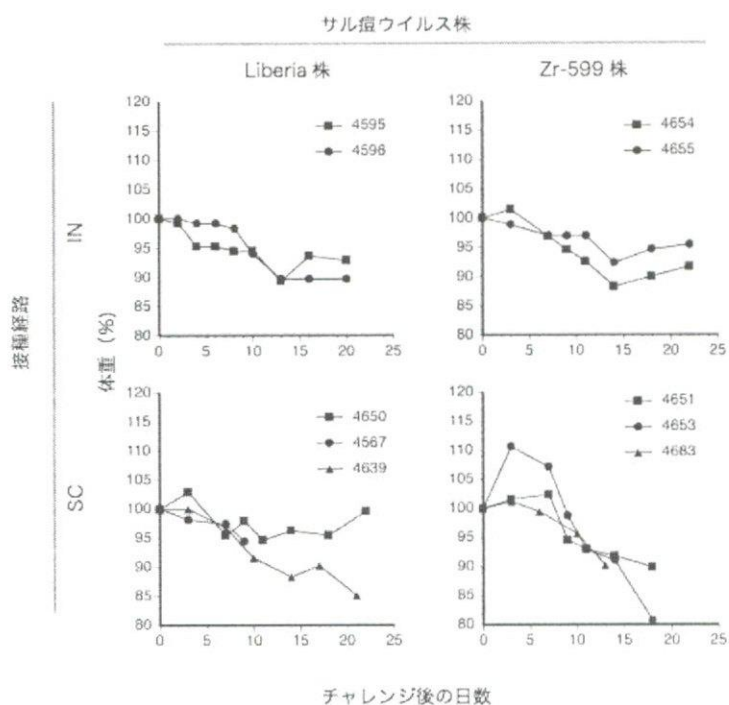
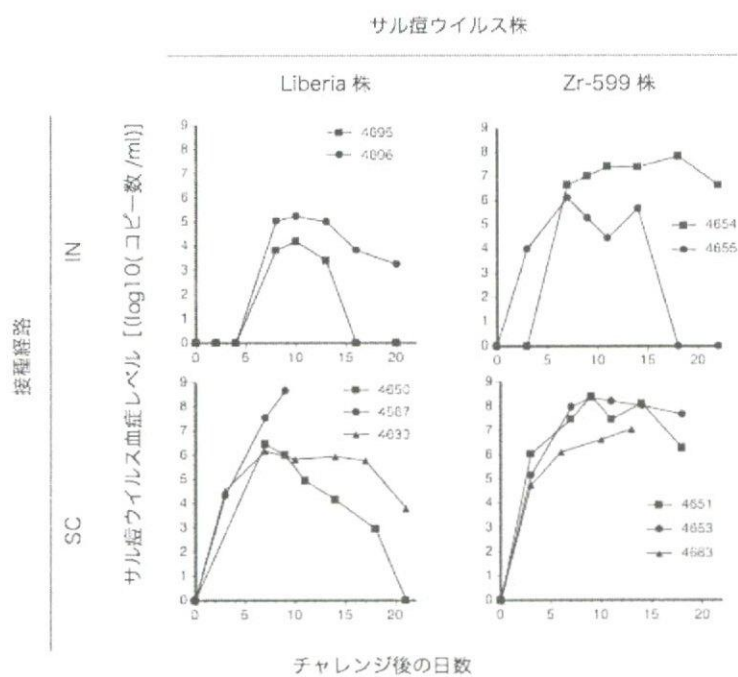


図 2. 各群におけるウイルス血症レベルの推移



ウイルス感染における分子パターン（二本鎖RNA）に対する ミクログリアの形態学的応答様式の解析

主任研究者：森本金次郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第三室）

協力研究者：中道一生（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第三室）

倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

研究要旨：近年、脳局所に薬物を作用させるための先端技術として、ウイルスベクターを用いたドラッグデリバリーシステムが注目を集めている。その一方で、ウイルスに対する免疫応答は脳特有の閉鎖環境における炎症反応を誘発し、神経細胞へのダメージを引き起こすことが知られている。脳内の炎症反応には中枢神経系に常在する免疫細胞（ミクログリア）の活性化が深く関与する。本研究ではウイルス感染において普遍的な分子パターンである二本鎖RNAに対するミクログリアの活性化、とりわけアメーバ型細胞への形態学および構造学的な応答機序を解析した。

A. 研究目的

血液脳関門によって外部から隔離され、かつ組織内の物質輸送さえも大きく制限される脳実質に薬物を作用させることは、脳疾患治療における大きな課題の一つである。近年、この問題を解決するための先端技術としてウイルスベクターを用いたドラッグデリバリーが注目を集めており、アルツハイマー病やパーキンソン病といった脳疾患、ならびに脳腫瘍等の治療における有用性が示されている。他のドラッグデリバリーシステムと比較した場合、ウイルスベクターは極めて高い遺伝子導入効率を示す。その反面、投与部位における免疫誘導という欠点が指摘されている。とりわけ、脳特有の閉鎖環境における炎症反応は周囲のグリア細胞等の活性化を誘発し、神経細胞へのダメージを引き起こす。また、ウイルスベクター自体に対する免疫誘導は遺伝子導入効率を大幅に低下させる。

多種類の白血球が混在する末梢組織とは

対照的に、脳における免疫システムでは、常在型のマクロファージ様細胞であるミクログリアが、中心のかつ多彩な役割を担っている。正常組織におけるミクログリアは静止型として存在し、細長い突起を周囲に張り巡らせた特徴的な形態を示す。この突起は伸縮性に富んでおり、周辺の細胞（アストロサイトや神経細胞、血管内皮細胞）と接触することで脳内の微小環境を監視している。脳に損傷や疾患、ウイルス侵襲等が生じた場合、ミクログリアはアメーバ型へと形態変化し、変性細胞を貪食除去する。また、サイトカインやケモカイン等の液性因子を分泌することで免疫応答を調節する。そのため、ウイルスベクターによる炎症反応の回避および導入効率の改善のためには、ミクログリアに対する刺激を低減させたベクター系の開発、ならびに細胞の活性化を一時的に抑制する抗炎症物質の開発が必要となる。

ウイルスベクターに対するミクログリアの活

性化機序の解析、ならびに抗炎症物質の探索では、抗ウイルス応答を可能な限り単純化した実験モデルの構築が必要不可欠である。二本鎖RNA(dsRNA)はウイルス感染において普遍的に産生される分子構造であり、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)によって生じる。この分子構造は宿主のToll-like receptor 3 (TLR3)によって認識され、NF- κ BやIRF、MAPK等の情報伝達経路を介して細胞応答を誘導する。昨年度までの本研究では、dsRNAに対するマイクログリアの遺伝子発現応答パターンを明らかにしている。本年度の研究では、dsRNAによるマイクログリアの形態学的ならびに構造学的な応答における細胞内シグナリングの役割を解析した。

B. 研究方法

1) 細胞:

C57BL/6マウス新生児脳に由来するマイクログリア細胞株MG6-1を用いた。MG6-1細胞は、初代培養マイクログリアに、ウイルスベクターを用いてc-myc遺伝子発現ユニットを導入した後、不死化細胞をクローニングすることで樹立された。ベクターとして用いたレトロウイルスは増殖に必要な遺伝子を欠損しているため、MG6-1細胞からの組換えウイルスの産生はない。また、MG6-1細胞は一般的な培養条件において増殖が可能であり、マイクログリアの培養に必要なフィーダー細胞の維持、およびサイトカインの添加を必要としない。

2) 静止型、および活性化型マイクログリアの誘導:

MG6-1細胞を、10%牛胎児血清(FCS)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(以後、増殖培地と記す)にて増殖させた後、培養ディッシュに播種した。細胞を基

質に接着させた後、栄養因子を低減させた試験培地にて一定時間培養し、静止型(突起伸長型)のマイクログリアを誘導した。この細胞を、合成dsRNAであるpoly(I:C)(= polyinosinic-polycytidylic acid)の存在下において培養し、以下の解析に用いた。

3) 細胞形態の観察:

突起伸長型の静止型マイクログリアをpoly(I:C)にて刺激した後、細胞形態の経時的変化を位相差顕微鏡にて観察し、顕微鏡用デジタルカメラを用いて画像を記録した。

4) 細胞骨格構造の解析:

突起伸長型のMG6-1細胞をpoly(I:C)刺激し、ホルムアルデヒドを用いて固定処理した。TIRTC標識したファロイジンを用いてアクチン繊維を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を調べた。

5) 細胞内シグナル伝達経路の解析

Poly(I:C)処理したMG6-1細胞を経時的に回収し、Triton X-100およ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溶解した。得られた蛋白質をSDS-PAGEにより分離し、シグナル分子[Inhibitory NF- κ B α (I κ B α)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38]の活性化を、リン酸化蛋白質に特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法により調べた。

6) シグナル経路の阻害:

低栄養環境において誘導した静止型マイクログリアをNF- κ B阻害剤(BAY11-7082)、JNK阻害剤(SP600125)、およびp38阻害剤(SB202190)を用いて前処理した後、poly(I:C)刺激し、上記の解析に

用いた。

C. 研究結果

1) ミクログリアの形態学的解析を目的とした実験モデルの確立:

初代培養によって脳から分離されたミクログリアは、アストロサイトの培養上清、ならびに高濃度の血清を添加した培養液において生存することができる。この条件下におけるミクログリアは球状を示し、脳に存在するミクログリアに特徴的な突起の伸長はほとんど観察されない。しかしながら、これらの細胞を低栄養環境において培養することで、静止型のミクログリアを誘導することができる。本研究では、MG6-1細胞が初代培養細胞と同様の形態学的性質を保持しているか否かを調べた。増殖培地において培養した場合、MG6-1細胞は株化マクロファージ様の形態を示し、約36時間で倍加した。MG6-1細胞を低栄養環境下において培養した場合、細胞増殖が停止し、処理12時間以降には細胞質の縮小および突起の伸長を示した。また、これらの突起の胴部は棘状構造を、突起の末端は球状の形態を示した。この結果から、初代培養細胞の場合と同様に、MG6-1細胞は低栄養環境において静止型ミクログリアへと変化することが分かった。

2) dsRNAに対するミクログリアの形態学的な応答:

低栄養環境において誘導した静止型のミクログリアを、dsRNAによって刺激した場合、アメーバ型細胞への形態学的応答が誘導されるか否かを調べた。静止型のMG6-1細胞をpoly(I:C)の存在下において刺激し、細胞形態を経時的に観察した。対照群と比較した場合、poly(I:C)刺激した細胞では、処理後30分から1時間にかけて細胞質の縮小と突起の短縮が

認められた。また、刺激後2時間を経たMG6-1細胞は、細胞質の伸展ならびに小胞形成を呈した。この結果から、静止型のMG6-1細胞は、dsRNA刺激によってアメーバ型の活性化ミクログリアへと変化することが分かった。

3) dsRNAに対するミクログリアの構造学的な応答:

MG6-1細胞における形態レベルの炎症応答をさらに詳しく調べるため、その基盤となっている細胞骨格(F-アクチン)の構造を解析した。静止型のMG6-1細胞では、F-アクチンは細胞質および突起の末端に散在した。一方、poly(I:C)刺激した細胞では、F-アクチンが細胞質全体において高度に蓄積した。これらの結果から、dsRNAを認識したミクログリアでは、細胞骨格構造が再構築されることでアメーバ型へと変化することが分かった。

4) dsRNAに対するミクログリアの細胞内シグナリング:

MG6-1細胞における分子レベルの炎症応答をさらに詳しく調べるため、刺激に対する細胞内シグナル伝達経路の活性化を調べた。静止型のMG6-1細胞をpoly(I:C)の存在下、もしくは非存在下において培養した後、経時的に蛋白質を抽出した。炎症反応に関与する代表的なシグナル伝達経路としてNF- κ B、およびMAPK経路に注目し、これらの経路に関与するシグナル伝達分子の活性化を、リン酸化蛋白質に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。poly(I:C)刺激したMG6-1細胞では、処理直後からI κ B α 、およびJNK1/2、p38のリン酸化が検出された。この結果から、dsRNA刺激した静止型ミクログリアでは、細胞内シグナル伝達経路が鋭敏に応答することが示唆された。

5) ミクログリアの形態学的応答における細胞内シグナリングの役割:

ミクログリアの形態学的応答におけるシグナル経路の役割を調べるため、特異的阻害剤にて前処理した静止型ミクログリアをpoly (I:C)にて刺激し、性状を解析した。NF- κ Bおよびp38阻害剤にて処理したミクログリアでは、薬剤未処理群と同様の形態変化が観察された。一方、JNK阻害剤にて処理した細胞では、poly (I:C)刺激によるアメーバ化(突起の縮小ならびに細胞質の伸展)が顕著に抑制された。また、JNK経路を阻害した場合、poly (I:C)刺激した後においても、F-アクチンが細胞核の周囲に構築されないことが分かった。これらの結果から、dsRNAに対するミクログリアの形態学的応答には、JNK経路が深く関与することが分かった。

D. 考察

これまで、ミクログリアは単なる脳に常在するマクロファージとして考えられてきた。しかしながら、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次々と報告されたことで、ミクログリアは脳の恒常性維持のために特殊化した細胞であるという概念が定着しつつある。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ほとんど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。本研究では、ウイルス感染において普遍的な分子パターンであるTLR3リガンド(合成dsRNA)および新規の株化ミクログリアであるMG6-1細胞を基盤とした実験モデルによって、ミクログリアの形態学的、構造学的な応答機序を解析した。

本研究の結果、MG6-1細胞は、①低栄養

環境において培養することで増殖が停止し、突起をもつ静止型ミクログリアへと変化すること、②静止型ミクログリアをpoly (I:C)によって刺激することで細胞骨格が再構築され、アメーバ型への形態変化が誘導されること、③MG6-1細胞の活性化に伴う細胞応答には、JNKを介したシグナル経路が必要であること、が示唆された。

ミクログリアの活性化は、脳の恒常性維持に必須である反面、過剰な炎症応答は神経破壊を誘発し、脳疾患の重篤化に繋がること多数報告されている。これらの知見は、ミクログリアが脳疾患治療における創薬のターゲットであることを意味する。正常組織における静止型ミクログリアは、長い突起をもった特徴的な形態を示す。これらの細胞突起は組織内を絶えず運動しており、短時間で脳全体の微小環境をモニターすることができる。脳局所の異常に際してミクログリアがマクロファージ様のエフェクター機能を発揮するためには、静止型からアメーバ型への形態変化が必要となる。この形態は、遊走によって脳柔組織内を移動する際に、また貪食作用によって変性細胞を除去する際に有利となる。この細胞応答を回避することで、もしくは一時的に抑制することで、ミクログリアに起因する脳内炎症を調節できると思われる。

ミクログリアの培養には専門的な手技が要求される上に、得られる細胞数も限りがあるため、詳細な機構は解析されていない。本研究では、近年樹立された細胞株MG6-1を用いて、ミクログリアのアメーバ化に必要な細胞内シグナル経路を探索した。特異的阻害剤を用いた研究の結果、poly (I:C)刺激によってMG6-1細胞がアメーバ型へと変化する際には、JNKを介した細胞内シグナル伝達経路が必要であることを明らかにした。サイトカインや熱、浸透圧、紫外線等の刺激を受けた細胞では、ストレスに応答するMAPK経路が活性化する。JNKは代表的なストレス応答性MAPKであり、様々な細胞応答において中心

的な役割を担っている。JNKシグナルカスケードの下流には、activator protein-1 (AP-1)等の転写因子が存在し、これらの分子群が活性化することで標的遺伝子の発現が誘導される。JNK阻害剤にて処理したMG6-1細胞では、細胞骨格の再構築が顕著に抑制されたことから、JNKシグナリングはF-アクチンの形成に必要な遺伝子群の発現を誘導することでミクログリアの形態変化を促すものと考えられる。

なし

E. 結論

ウイルス感染において共通の分子パターンに対するミクログリアの形態学的な細胞応答には、JNKを介したシグナル伝達経路が必要であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Suppressive effect of simvastatin on interferon-beta-induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neuroscience Letters* 407(3): 205-210 (2006)

2) Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Roles of NF-kappaB and MAPK signaling pathways in morphological and cytoskeletal responses of microglia to double-stranded RNA. *Neuroscience Letters* 414(3): 222-227 (2007)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

狂犬病ウイルスに対する骨髄系樹状細胞の反応

分担研究者：西園 晃（大分大学医学部 感染分子病態制御講座）

協力研究者：後藤和代（大分大学 総合科学研究支援センター）

野口賀津子（大分大学医学部 感染分子病態制御講座）

塩田星児（大分大学医学部 感染分子病態制御講座）

研究要旨：狂犬病ウイルス街上毒株の感染は最終的に致死的病態を誘導するが、その際の中枢神経系における病理学的所見には形態的特徴、特に炎症反応などはほとんど認められず、中枢神経系においては免疫応答の抑制または不応答が引き起こされていると考えられている。それに対し、致死的病原性の減衰した弱毒株は、末梢において免疫を賦活し、それが故に致死的病態から免れていると考えられている。本研究では狂犬病ウイルス (RV) に対する樹状細胞の応答を検討することで、中枢神経系における病原性発現の端緒を末梢の免疫系細胞が担っている可能性について検討した。マウス樹状細胞由来 JAWSII 細胞は Challenge Virus Standard (CVS) または Evelyn Rotkitniki Abelseth strain (ERA) 接種により培養上清中に子孫ウイルスの産生は観察されなかった。CVS または ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中の TNF- α 、IFN- α および IFN- β を解析した結果、CVS と比較して ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中には顕著に TNF- α 、IFN- α および IFN- β が検出され、樹状細胞が末梢において暴露を受けた RV の株の違いにより自然免疫応答からひいては獲得免疫応答も左右されている可能性が推測された。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは (RV) はラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される一本鎖 RNA ウイルスである。RV は神経細胞に特に指向性が強く、ひとたび上向性に侵入し免疫特権領域である脳内に感染が拡大すれば、もはや獲得免疫応答をはじめ、いかなる手段をしても排除不可能であり、宿主は死に至る。よって脳神経まで感染が及ぶか否かは、最初に暴露を受けた末

梢組織での自然免疫応答に深く左右されており、暴露後ワクチン接種が効果を表す根拠もそこにあると考えられている。致死的病原性の減衰した RV 弱毒株の末梢における応答性と致死的病態を誘導する街上毒株とでは、末梢における免疫応答、特に自然免疫応答と獲得免疫応答を繋ぐ樹状細胞の応答に根本的な違いがあることが予測される。

これまで、末梢局所に実験的に接種さ

れたRV粒子の多くはマクロファージ等の食食系の細胞内に存在することが報告されており、またマクロファージ由来のRAW264を用いた *in vitro* の実験において、RVはRAW264細胞に対して非感染性であり子孫ウイルスは産生しないが、ERK1/2シグナル経路を介してCXCL10の発現を誘導する事により、免疫系を活性化する事が報告されている。

これらの報告を元に本年度の研究では、末梢における自然免疫と獲得免疫を仲介するキーパーソンと考えられる樹状細胞を用いて、狂犬病ウイルス固定毒株と弱毒株をそれぞれ接種した場合の反応性の違いの解析を行った。

B. 研究方法

1) 細胞

C57BL/6 マウス(H-2b)の骨髄より樹立された骨髄系樹状細胞株 JAWSII 細胞(ATCC CRL-11904)、およびマウス神経芽細胞腫由来細胞株 MNA を用いた。JAWSII 細胞の表面マーカーを FACSscan にて解析したところ、CD11c, CD11b とともに強陽性で CD8 α は陰性であり、骨髄系樹状細胞に典型的な phenotype であった(図1)。

2) ウイルス

RV 固定毒株 Challenge Virus Standard-11 (CVS)、および弱毒株 Evelyn Rotkitniki Abelseth (ERA) strain を用いた。ストックウイルスの調整および感染力価の測定には MNA 細胞を用い、Focus forming unit として算定した。

3) 樹状細胞への RV 接種

イ) JAWSII 細胞の形態的観察とウイルス特異抗原の観察

24 穴培養プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を 2.5×10^5 個播種した後に CVS または ERA を MOI=10、MOI=5、MOI=1 で接種した。6, 12, 24, 48, 72 時間後の感染細胞を顕微鏡下で観察を行った。さらに、これらの細胞をピペッティングにて回収し、PBS で洗浄した後スライドグラスに固着させ、アセトンで固定を行った。固定終了後、FITC 標識抗 RV-N モノクローナル抗体 (Centocor 社) を用いた直接蛍光抗体法により 40 分、37°C インキュベーター内で反応させ、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

ロ) FACSscan と共焦点レーザー顕微鏡による RV N と G 蛋白の樹状細胞内での確認

96 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を 6.0×10^4 個播種した後に CVS または ERA を MOI=5 で接種した。48 時間後に細胞をピペッティングにて回収し、PBS で洗浄した後、イ) と同様に FITC 標識抗 RV-N モノクローナル抗体 (Centocor 社) と RV-G モノクローナル抗体 (#4-12) を 40 分、37°C 反応させた後、FACSscan により蛍光強度の測定を行った。また同様に接種した細胞を上記と同じ 1 次抗体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss 社) にて観察した。

ハ) RV 特異的 mRNA の検出

6 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を 2.5×10^5 個播種した後に CVS または ERA を MOI=5 で接種した。48, 72, 120 時間後に Isogen (和光純薬) にて回収し、総 RNA を抽出し、cDNA

合成用プライマーとしてウイルス特異配列検出用 N5R-660 (5' -GTTCGCTATAGTACTCC -3')プライマーにより MMLV 逆転写酵素(Gibco BRL)にて cDNA を合成、その後 10g(5' -CTACAATGGATGCCGAC -3')と N5R-660 にて PCR 反応を行い、アガロースゲルにて電気泳動、エチジウムブロミド染色を行った。内部標準対照として oligo(dT)をプライマーに用いて cDNA 合成後、GAPDH 遺伝子領域を PCR にて増幅し、同様に解析した。

ニ) JAWSII 培養上清中の子孫ウイルス産生量の測定

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を 2.5×10^5 個播種した後に CVS または ERA を MOI=5 で接種した。6, 12, 24, 48, 72 時間後に培養上清液を回収し感染性子孫ウイルス量を MNA 細胞を用いたフォーカス形成試験により測定した。

4) ウイルス接種による JAWSII 細胞表面での抗原提示関連分子の発現の観察

CVS, ERA いずれも moi=5 で JAWSII 細胞に接種し、72 時間後に細胞を回収・固定し、FACScan により細胞表面分子の解析を行った。FACScan に用いた抗体は、MHC class I(Pharmin gen clone 28-8-6), class II (Beckton Dickinson clone M5/114/15.2), CD40 (eBioScience clone 4B12), CCR7 (eBioScience clone 1C10)である。

5) 樹状細胞培養上清中の TNF- α , IFN- α および IFN- β 産生

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII

細胞を 2.5×10^5 個播種した後に CVS または ERA を MOI=10, MOI=5, MOI=1 で接種した。24, 72 時間後に培養上清液を回収し TNF- α , IFN- α および IFN- β を ELISA(eBioScience 社)にて測定した。

C. 研究結果

1) 樹状細胞への RV 接種

イ) JAWSII 細胞の形態的観察とウイルス特異抗原の観察

CVS, ERA いずれを感染させた JAWSII 細胞も 6, 12, 24, 48 間後では形態学的な変化、特に CPE は観察されなかったが、ERA を接種した JAWSII 細胞は、72 時間後から細胞の樹状化が目立つようになり、120 時間後では対照と比べその差は明瞭となった(図 2)。

蛍光抗体染色法による観察では、CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞では、RV N 蛋白を発現した細胞はほとんど観察されなかった。

ロ) FACScan と共焦点レーザー顕微鏡による RV N 蛋白の確認

図 3 は抗 RV N モノクローナル抗体を用いて染色された JAWSII 細胞の蛍光強度である。CVS を接種した JAWSII 細胞では蛍光強度の移動は観察されないが、ERA 感染 JAWSII 細胞では弱くはあるが N 蛋白の細胞内での発現が確認された。同様に共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、ERA 接種 JAWSII 細胞で数視野に 1 ~ 2 個の陽性細胞が観察されたのみで、CVS 接種 JAWSII 細胞、非感染 JAWSII 細胞では蛍光は確認できなかった(図 4)。

ハ) RV 特異的転写物の検出

図5はRV接種後 JAWSII 細胞内のウイルス特異的転写産物の経時的变化である。

ERA を接種された JAWSII 細胞では、ウイルス特異的 mRNA が経時的に検出されたが、CVS を接種した場合は JAWSII 細胞内でウイルスの増殖は起こっていないことが示された。

ニ) JAWSII 培養上清中の子孫ウイルス産生量の測定

CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中における感染性粒子量は、コントロール (JAWSII 細胞を含まずウイルスだけをインキュベートした場合) と比較して速やかに減衰し、培養上清中には子孫ウイルスの産生は認められなかった。(図6)

2) ウイルス接種による JAWSII 細胞表面での抗原提示関連分子の発現の観察

図7に示すごとく MHC class I 分子は、ウイルス接種により発現の増強が認められた。ERA 接種での発現増強は CVS のそれより明らかに強かった。ERA 接種では MHC class II 分子の発現も増強していたが、CVS ではほとんど変化は無かった。CD40 と CCR7 はいずれのウイルスの接種においても JAWSII での発現の増強は認められなかった。

3) 樹状細胞培養上清中の TNF- α 、IFN- α および IFN- β 産生

ERA を接種した JAWSII 細胞では、24 時間、72 時間後のいずれでも非常

に高い TNF- α 産生が培養上清中で認められ、これは moi 依存性であった。一方、CVS 接種の場合は対照と比べると TNF- α の産生は確認されたが、その程度は ERA に比べ低かった(図8)。

さらに同様にして、培養上清中の I 型インターフェロンの産生量を測定した。図9はいずれも 24 時間後の培養上清中の IFN- α および IFN- β の産生量であるが、TNF- α の産生の場合と同様に、ERA 接種のほうが CVS 接種に比べより強く I 型インターフェロンの産生を促し、それは moi 依存性であった。

D. 考察

RV の強毒株と弱毒株における免疫反応の違いは、以前よりマウスまたは神経細胞を使った実験で報告がなされているが、ウイルスに暴露され感染が成立した直後、初期に応答すると考えられている樹状細胞に対する反応性についての検討はこれまでに報告はない。近年 HIV やデングウイルスが樹状細胞の DC-SIGN などの表面分子を介して感染し、DC の中で複製・増殖が起こることが報告されており、HIV に関しては、一度樹状細胞に感染する事により、細胞指向性がより強く決定され CD4+T 細胞に感染しやすくなるという報告もある。これらのことから、ウイルス感染に際して樹状細胞の反応性の検討を行うことはその後の感染の広がりや宿主免疫応答を決定づける上で重要であると考えられる。よって今回我々は RV が体内に侵入した際、早期にどのような免疫反応が誘導されているのかを予測するのを目的に、マウス樹状細胞を用い *in vitro* でその反応性の検討を行った。

今回の検討で RV 接種 72 時間後、ERA を接種した細胞と CVS を接種した細胞には、明らかな形態の変化（樹状化、細胞の固着性の増加）の違いが認められた。間接蛍光抗体法と FACSscan を用いて細胞を染色して観察すると、RV N 蛋白がごくわずかに ERA 接種の場合にのみ検出された。しかし RV G 蛋白は確認されなかった。さらに培養上清中には感染性を有するウイルス粒子の産生は全く認められなかった。これらのことより、ERA は JAWSII 細胞に接種すると、mRNA の合成からウイルス蛋白の合成が一時的に進行するが、それは N 蛋白の発現にとどまり、その後のウイルス構成蛋白の合成から、ウイルスゲノムの複製、さらには progeny virus の産生までにはいたらず、abortive infection の感染様式をとっていると考えられた。しかし ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中には高い濃度の TNF- α 、IFN- α および IFN- β が検出された。またウイルスを接種した後の JAWSII 細胞表面分子の観察では、上記の結果を裏付けるように、ERA 株は JAWSII 細胞を強力に刺激し、これにより MHC class I 分子の発現増強と、MHC class II 分子の発現が若干ながらも増強されたことは、ERA 株が骨髄系樹状細胞をより効果的に賦活し、以後の獲得免疫応答への橋渡しをしていることが推察された。一方 CVS を接種した場合は、細胞内でのウイルス mRNA の合成も N 蛋白の発現も検出できず、まったく感染が進行していなかった。

これらの結果より、RV は樹状細胞に接種しても細胞内で積極的な「感染」はほとんど起こらず、飲作用または貪食によって樹状細胞内に侵入し、ウイルスの株によっては (ERA などの弱毒株の場合) 1

段階増殖のみ起こして、不稔感染に終わる可能性が示唆された。しかし、その際に強力なサイトカインの誘導は認められ、このことがその後の獲得免疫応答に引き継がれることが十分に予想される。さらにウイルス粒子が JAWSII 細胞に貪食されることにより、おそらくは TLR などを介したサイトカイン産生の経路が活性化されるものと考えられる。しかしながらその応答性はウイルスの株によって異なっており ERA の方が樹状細胞をより強力に賦活化していると考えられた。これらのウイルス側からのメカニズムを今後解析していく予定である。

E. 結論

ERA と CVS の樹状細胞に対する反応性は大きく異なる事が明らかになった。樹状細胞はウイルスの末梢感染において重要な役割を持っている事が推測できることより、この反応性の違いは、致死性病態を誘導する強毒株と、致死性病原性の減衰した弱毒株の病態形成機序を解明するヒントに成り得ると考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsu S., K. Gotoh, T. Yamashiro, J. Yamagata, K. Shin, T. Fujioka, A. Nishizono : Transfer of Antigen-Pulsed Dendritic Cells Induces Specific T-Cell Proliferation and a Therapeutic Effect against Long-Term *Helicobacter pylori* Infection in Mice. *Infection and Immunity* 74(2),