

SSPE ウイルス増殖抑制効果

スタチン（ロバスタチン、フルバスタチン、アトロバスタチン、シンバスタチン）、ミリオシン及びサリドマイドはいずれも、MV に対して明らかな抗ウイルス効果を示さなかった。

D. 考察

MV 及び SSPE ウイルスの L mRNA を標的とする siRNA 発現遺伝子組換えアデノウイルスは、MV の増殖を効率よく抑制できることが明らかになった。しかし、MV の場合に比べると、SSPE ウイルスの増殖抑制効果は未だ十分とはいえ、ウイルス力価の増強あるいはウイルスベクターの検討も含めて、さらなる改良が必要と考えられた。今回作製した siRNA 発現組換えアデノウイルスについては、動物実験系で抗ウイルス効果を確認するとともに、インターフェロンやリバビリン等の抗ウイルス薬との併用療法の効果についても検討したい。

現在臨床現場で用いられているリバビリンの MV 及び SSPE ウイルスに対する抗ウイルス効果が培養細胞実験系でも確認された。しかしその効果の程度は必ずしも十分なものとはいえない。そこで、MV 及び SSPE ウイルスに対してより強い抗ウイルス効果を持つ薬剤候補を探索したが、有望な抗ウイルス薬候補を見いだすことはできなかった。さらなる探索が必要であろう。

E. 結論

MV 及び SSPE ウイルスの増殖を抑制する 3 種類の siRNA 発現遺伝子組換えアデノウイルスを作製した。このような siRNA 発現組換えウイルスは、現在有効な治療法がなく極めて予後不良の SSPE に対する新規の治療法の候補の一つであるが、実際の臨床応用にはさらなる改良が必要と考えられた。

【参考文献】

1. 野村恵子, 木村昭彦, 矢野珠巨, 他: 亜急性硬化性全脳炎に対するリバビリン治療に関する研究. プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究, 平成 17 年度総括・分担研究報告書 2006;193-197.
2. 堀田博. RNA interference による麻疹ウイルス/亜急性硬化性全脳炎(SSPE)ウイルスの増殖抑制に関する研究. プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究, 平成 17 年度総括・分担研究報告書 2006; 202-207.
3. Otaki M, Sada K, Kadoya H, Kato S, Nagano-Fujii M, Hotta H. Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. *Antiviral Res* 2006;70:105-111.
4. Hotta H, Nihei K, Abe Y, Kato S, Jiang D-P, Nagano-Fujii M, Sada K. Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE. *Microbiol Immunol* 2006;50:525-534.
5. Naka K, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Kato N. Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon- α . *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330:871-879.
6. Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 2006;44:117-125.

7. Umehara T, Sudoh M, Yasui F, Matsuda C, Hayashi Y, Chayama K, Kohara M. Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:67-73.
8. Milazzo L, Biasin M, Gatti N, Piacentini L, Niero F, Zanone Poma B, Galli M, Moroni M, Clerici M, Riva A: Thalidomide in the treatment of chronic hepatitis C unresponsive to α -interferon and ribavirin. *Am J Gastroenterol* 2006;101:399-402.
2. Hotta H, Nihei K, Abe Y, Kato S, Jiang D-P, Nagano-Fujii M, Sada K. Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE. *Microbiol Immunol* 2006;50:525-534.
3. Ohgimoto K, Ohgimoto S, Ihara T, Mizuta H, Ishido S, Ayata M, Ogura H, Hotta H: Difference in production of infectious wild-type measles and vaccine viruses in monocyte-derived dendritic cells. *Virus Res* 2007;123:1-8.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1. Otaki M, Sada K, Kadoya H, Kato S, Nagano-Fujii M, Hotta H. Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. *Antiviral Res* 2006;70:105-111.

2.学会発表

1. 扇本真治, 庵原俊昭, 加藤誠一, 綾田稔, 大谷早苗, 堀田博, 小倉壽. 麻疹ウイルス野外株とワクチン株の単球由来樹状細胞での感染性ウイルス産生の違い. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2006.11.21.

H. 知的財産権の出願・登録状況

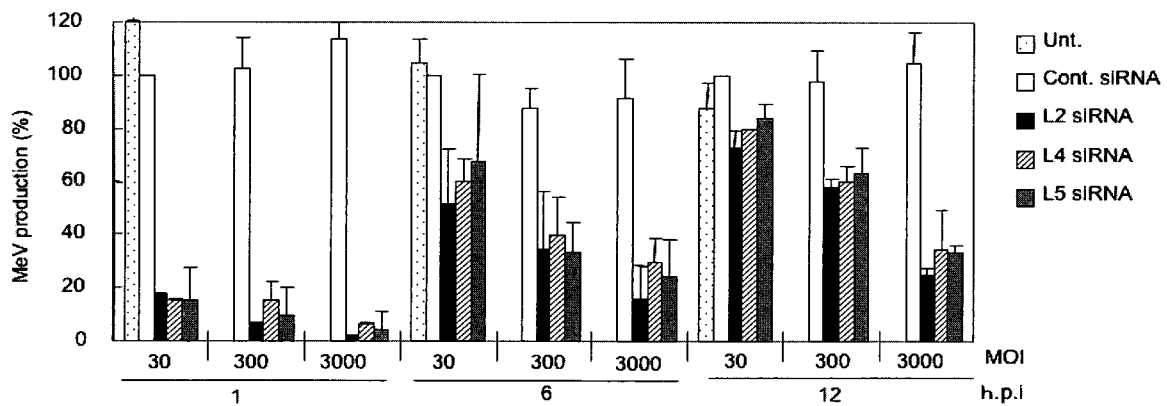
なし

Table 1.
Virus titers of siRNA-expressing recombinant adenoviruses (siRNA-rAd)

siRNA-rAV	Virus titer (ffu/ml)
MV-L2	2.9×10^8
MV-L4	1.7×10^8
MV-L5	3.3×10^8
HCV-NS3	2.5×10^7
pcPUR(-)	4.4×10^8

Fig. 1. Efficient inhibition of MV replication by siRNA-rAV

(A) MV → siRNA-rAV



(B) siRNA-rAV → MV

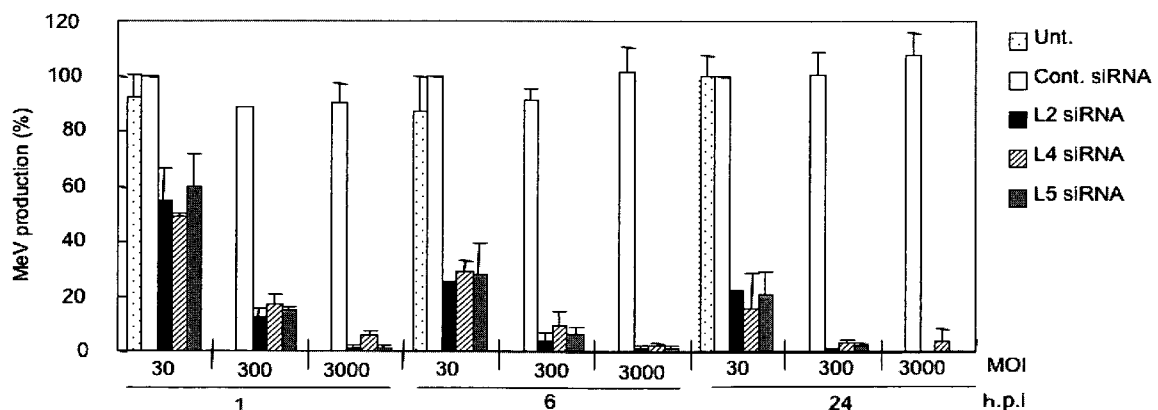
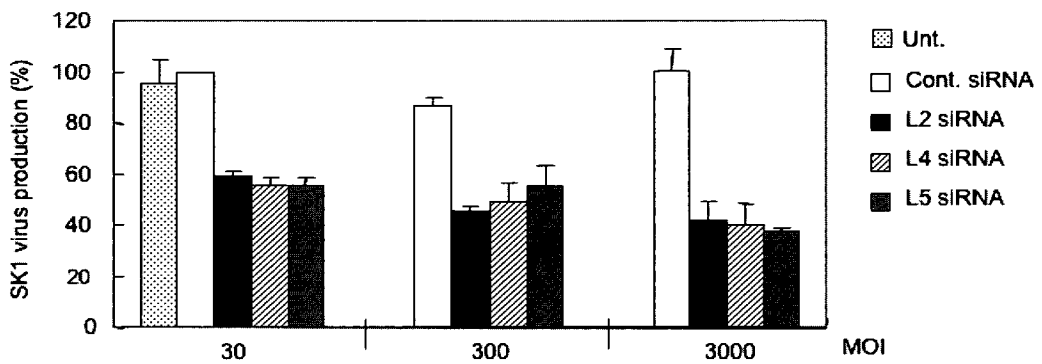


Fig. 2. Inhibition of SSPE virus replication by siRNA-rAV

(A) Coculture → siRNA-rAV



(B) siRNA-rAV → Coculture

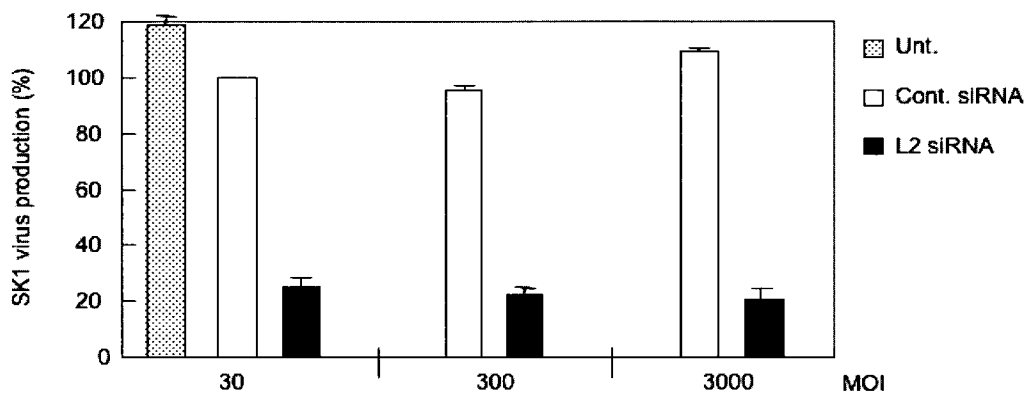


Fig. 3. Inhibition of MV replication by Ribavirin or Mizoribine

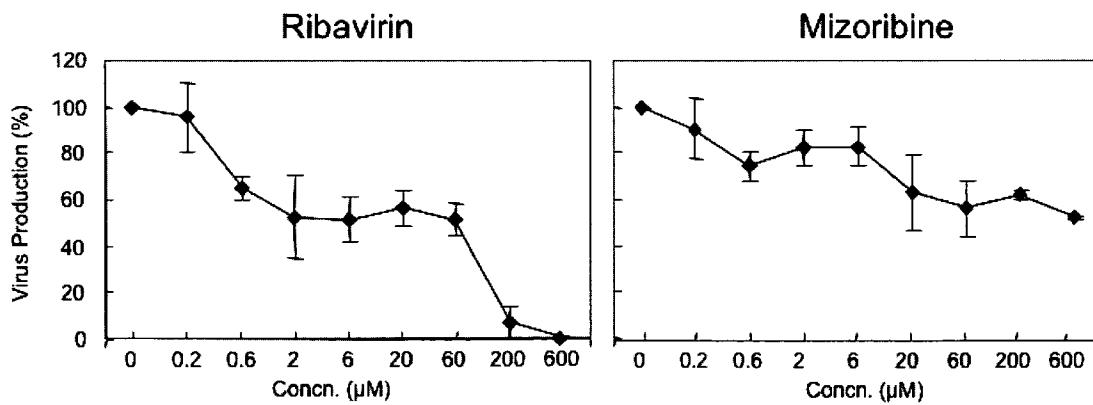
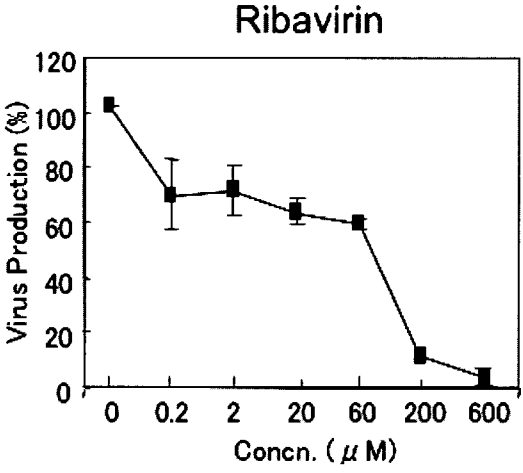


Fig. 4. Inhibition of SSPE virus replication by Ribavirin



亜急性硬化性全脳炎（SSPE）に対する siRNA による治療を目指した基礎的研究

分担研究者：細矢 光亮 福島県立医科大学小児科学講座

研究協力者：橋本 浩一 福島県立医科大学小児科学講座

研究要旨

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は、麻疹ウイルス変異株(SSPE ウイルス)の中枢神経への持続感染により、高度の認知障害、植物状態となり死に至る遅発性ウイルス感染症である。近年になり ribavirin の脳室内投与が試みられ、臨床症状が改善した症例が散見されている。しかしながら、治療を中止すると再燃がみられる。最終的に SSPE を完治させるには、ウイルスを神経組織から排除する必要がある、そのためには単独投与、あるいは既存の薬剤との併用が可能な新規薬剤の開発が望まれる。そこで、麻疹ウイルス遺伝子に対する siRNA を作成し、siRNA 単独、および ribavirin、IFN α -2b との併用によるウイルス増殖抑制効果を検討した。

(1)麻疹ウイルス N、F、L、P 遺伝子それぞれに siRNA (si-N、si-F、si-L、si-P) を作成した。(2)遺伝子導入試薬を用い VERO/SLAM 細胞に siRNA を導入し、麻疹ウイルス臨床分離株を感染後、上清のウイルス量をプラーク法で定量した。また、細胞中の麻疹ウイルス各遺伝子(N、F、L、P)の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。(3)VERO/SLAM 細胞に si-N(5nM)を導入し、ribavirin、IFN α -2b の麻疹ウイルス増殖への併用効果をプラーク法で検討した。

麻疹ウイルスの N、F、L、P 遺伝子それぞれを標的に作製した siRNA は、麻疹ウイルス臨床分離株の増殖を抑制した。特に、N 遺伝子に対する siRNA が最も有効であり、ribavirin、IFN α -2b との併用効果が認められた。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis; SSPE)は麻疹罹患後おおよそ 2~10 年の潜伏期間の後に中枢神経症状を呈し、一旦発症後は進行性に増悪し、高度の認知障害、植物状態となり死に至るスローウイルス感染症である(1)。現在まで SSPE に対し amantadine、inosiplex、interferon (IFN)、cimetidine などが試みられてきたが、有効性が証明されているのは inosiplex と IFN である。ごく最近、SSPE 発症初期の患者において ribavirin の脳室内投与により臨

床症状の改善がみられると報告がある(2)。しかし、ribavirin 投与を中止すると数ヶ月で髄液中の抗 MV 抗体価が上昇し、SSPE 症状が再燃してくる。このため、強化療法として断続的な ribavirin 投与を余儀なくされる。従って、最終的に SSPE ウイルスを神経組織から排除するためには、単独、あるいは既存の薬剤との併用可能な新規薬剤の開発が切望されている。

二本鎖 RNA (dsRNA) によってその配列特徴的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象を RNAi (RNA

interference) という。近年、ウイルス性疾患や癌、遺伝性疾患などの疾患遺伝子を標的とし、RNAi 活性を有する siRNA(short interfering RNA)を核酸医薬として応用する研究が進んでいる。

我々は siRNA の麻疹ウイルス、および SSPE ウイルスへの増殖抑制効果を検討し、さらに siRNA と IFN、あるいは ribavirin との併用効果についても検討した。

B. 研究方法

①ウイルス、細胞、培地

麻疹ウイルスは新鮮臨床分離株 (FP-1) を用い、SSPE ウイルスは SSPE 新鮮臨床分離株 (SSPE-YH-1) を用いた。細胞は VERO/SLAM 細胞 (九州大学 柳雄介教授より分与) (3)を用い、増殖培地として 8%NBS、2mM L-glutamine, 50U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 0.4mg/ml G418 加 DMEM 培地、維持培地として 2%NBS、2mM L-glutamine, 50U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 0.4mg/ml G418 加 DMEM 培地を用いた。

②siRNA

NCBI に登録されている SSPE ウイルス株のゲノム情報を基に、東京大学西郷教授、程助教授等が開発した siRNA 設計法(4)に基づいた設計プログラム (RNAi 社 Tokyo, Japan, [http:// design.rnai.jp/sidirect/index.php](http://design.rnai.jp/sidirect/index.php)) を用い、麻疹ウイルス N、F、L、P 遺伝子それぞれに siRNA (si-N、si-F、si-L、si-P) を作成した。また、陰性コントロールの siRNA (si-NC) (RNAi 社) も用意した。

③遺伝子導入および siRNA の評価

96-wells プレートに VERO/SLAM 細胞を各 well 10000 個撻き、2 日後に遺伝子導入試薬 (Lipofectamin 2000[®], Invitrogen)を用い、VERO/SLAM 細胞に siRNA を導入し、24 時間後に麻疹ウイルス(FP-1)を moi:0.1

で 1 時間吸着させ、洗浄後再び培養した。24 および 48 時間後に凍結し、融解後の上清のウイルス量をプラーク法で定量した。また、細胞中の麻疹ウイルス各遺伝子(N、F、L、P)の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。SSPE ウイルスでの検討は SSPE-YH-1 を moi:0.04 で 1 時間吸着させ、洗浄後再び培養し、24 時間後に細胞中の麻疹ウイルス各遺伝子(N、F、L、P)の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。

④siRNA と ribavirin、IFN α -2b との併用効果

VERO/SLAM 細胞に si-N (5nM)を導入し、24 時間後に ribavirin あるいは IFN α -2b 存在下で麻疹ウイルス(FP-1)を感染させ、感染 24 時間後に凍結し、融解後の上清のウイルス量をプラーク法で定量し併用効果を検討した。

⑤プラーク法

培養後、凍結融解した細胞浮遊液を 2000rpm で 5 分間遠心し、上清を 12-wells プレートに 100% 単層形成された VERO/SLAM 細胞に 1 時間室温で吸着させ、洗浄後、細胞に 0.75%メチロセルロース含維持培地を重層した。48 時間培養後、ホルマリンで固定後ヘマトキシリンエオジン染色し、その後プラークを数えた。

⑥リアルタイム PCR 法

96-wells プレートの 1 well から Isogen(NipponGeen)を用い RNA を精製し、ExScript RT reagent Kit(TaKaRa, Tokyo)を用い逆転写反応(RT)を行い、その RT 反応物を SYBR-Green 法、あるいは TaqMan 法で ABI 7000(Applied Bio Systems)を用い遺伝子の発現を定量した。SYBR-Green 法には SYBR Premix Ex Taq Perfect Real Time (TaKaRa, Tokyo)を用い、TaqMan 法には Premix Ex Taq Perfect Real Time (TaKaRa, Tokyo)を用いた。L 遺伝子、インターナルコントロールとして用いた 18S ribosomal

RNA の発現は SYBR-Green 法で定量し、各プライマー最終濃度はそれぞれ 500nM、200nM とし、初めに 95°C-10 秒を 1 サイクル、その後 95°C-5 秒、56°C-10 秒、72°C-31 秒を 40 サイクルの反応を行った。各 N、F、P 遺伝子の発現は TaqMan 法で定量し、プライマー最終濃度は 200nM、プローブ最終濃度を 100nM とし、初めに 95°C-10 秒を 1 サイクル、その後 95°C-5 秒、60°C-31 秒を 40 サイクルの反応を行った。用いたプライマー、プローブ配列を表 1 に示す。N、F 遺伝子のためのプライマーとプローブは Uhlmann らの塩基配列(5)を参考にし、L、18S 遺伝子のためのプライマーは Plumet(6)らの塩基配列を参考にした。また、P 遺伝子のためのプライマーとプローブは SSPE ウイルス Takeuchi 株(GeneBank 登録番号 NC001498) 塩基配列を参考にし、PrimerExpress (Applied Bio Systems)を用いて設計した。TaqMan 法に用いたプローブには 5'端には 6-FAM を 3'端には TAMRA の蛍光標識をした。

C. 研究結果

① 各 siRNA の麻疹ウイルス (FP-1) への増殖抑制効果

感染 24 時間後の各 siRNA のウイルス増殖への影響は、陰性コントロール siRNA (si-NC) でのプラーク数を 100%とした場合、何れの siRNA も濃度依存的にプラーク数は減少し、各 siRNA の感染性ウイルスの産生抑制効果が認められた。50%抑制濃度 (EC₅₀) は、それぞれ si-N(0.49nM)、si-F(0.58nM)、si-L (3.03nM)、si-P(1.16nM) であった (図 1)。

② 各 siRNA、20nM での FP-1 感染後 24、48 時間における麻疹ウイルス増殖抑制効果

感染 24 時間後のプラーク数は、コントロール (si-NC) に対して、si-N (3.8%)、si-F

(15.4%)、si-L (10.0%)、si-P (3.8%) であった。感染 48 時間後では、si-N(21%)、si-F(88%)、si-L(333%)、si-P(196%) であった (図 2)。感染 48 時間後の倒立顕微鏡での観察では、si-P、si-F、si-L では麻疹ウイルスによる細胞変成効果が全体的に観察されたが、si-N では一部に細胞変成効果が認められるも、健全な細胞の像が観察された (図 3) 従って、以降の FP-1 での感染実験は si-N について検討した。

③ N 遺伝子に対する siRNA の各遺伝子発現への影響

N 遺伝子に対する siRNA (si-N) は、N 遺伝子の発現を濃度依存的に抑制し、特に 4nM 以下では 5%以下にまで抑制した。他の P 遺伝子、F 遺伝子、L 遺伝子の発現も、N 遺伝子程ではないが、si-N により発現が濃度依存的に減少した (図 4)。同サンプルで行った、プラーク法でも N 遺伝子発現に伴いプラーク数が減少した (図 5)。

④ N 遺伝子に対する siRNA と ribavirin、IFN α -2b との併用効果

遺伝子導入試薬のみで前処理した VERO/SLAM 細胞での麻疹ウイルス (FP-1) の増殖は ribavirin により濃度依存的に抑制され、si-NC 前処理 VERO/SLAM 細胞でも、ほぼ同等に抑制され、ウイルス産生の 50% 抑制濃度 (EC₅₀) は、それぞれ 45.7mg/ml、54.5mg/ml であった (図 6)。同様に遺伝子導入試薬のみで前処理した VERO/SLAM 細胞での麻疹ウイルス (FP-1) の増殖は IFN α -2b により濃度依存的に抑制され、si-NC 前処理 VERO/SLAM 細胞でも、ほぼ同等に抑制され、ウイルス産生の 50% 抑制濃度 (EC₅₀) は、それぞれ 14.0 IU/ml、12.9 IU/ml であった (図 7)。si-N を導入した VERO/SLAM 細胞の麻疹ウイルス (FP-1) の増殖も、ribavirin、IFN α -2b の濃度依存的に抑制され、ウイルスの産生量は、遺伝子導入試薬のみ、si-NC に比べ著しく減少し、併用効

果が認められた(図 6, 7)。

⑤ 各 siRNA、20nM での SSPE ウイルス各遺伝子発現への影響

si-N は N 遺伝子の発現のみならず、P、F、L 遺伝子の発現を 10-20%位までに抑制した。si-P も同様に P 遺伝子の発現のみならず、N、F、L 遺伝子の発現を 10-20%位までに抑制した。si-F は F 遺伝子の発現を 20%にまで抑制したが、他の遺伝子発現の抑制は 40-70%程度であった。si-L は L 遺伝子への発現抑制効果も弱く、N、P 遺伝子への抑制効果も si-N、si-P 程でなかった。(図 8)

D. 考察

本研究では SSPE ウイルス遺伝子に対して設計した siRNA が麻疹ウイルス、SSPE ウイルスの感染細胞内での遺伝子発現を抑制し、さらに麻疹ウイルスでは感染粒子の産生を抑制することを示した。麻疹ウイルス新鮮臨床分離株(FP-1)に対する各 siRNA の EC₅₀ は数 100pM~数 nM であった(図 1)。各 siRNA 20nM で処理した VERO/SLAM 細胞での FP-1 感染後 24、48 時間における麻疹ウイルス増殖抑制効果の結果より N 遺伝子に対する siRNA(si-N)が最も効果的であり(図 2, 3)、ribavirin、IFN α -2b との併用についても si-N の併用効果が認められた(図 6)。また、si-N は N 遺伝子の発現を強力に濃度依存的に抑制した(図 5)。SSPE ウイルス(YH-1)での検討では、si-N、si-P は、それぞれ対応する遺伝子の発現のみならず、他の遺伝子の発現を 10-20%位までに抑制した(図 7)。

麻疹ウイルスはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属のウイルスで、そのゲノムはマイナス鎖の非分節型一本鎖 RNA である。ゲノムの 3'末端から順に N、P、M、F、H、L の 6 つの遺伝子が並んでいる。パラミクソウイルスの遺伝子発現は、各遺伝子の両端に位置する転写開始、介在、転写

終結配列により制御されている。それぞれの遺伝子は N、P、M、F、H、L 蛋白質をコードし、さらに P 遺伝子だけが P 蛋白以外に V、C 蛋白質をコードしている。N 蛋白質はゲノム RNA に結合しヌクレオカプシドを形成し、ポリメラーゼを構成する L、P 蛋白質とともに RNP 複合体を形成する。M 蛋白はエンベロープを裏打ちしウイルスの粒子形成に、H 蛋白、F 蛋白はエンベロープ上で、それぞれ受容体との結合、膜融合に関与する。V、C 蛋白は非構造蛋白質で抗 IFN 活性に関与すると考えられている。またウイルスを構成する蛋白としては N 蛋白が最も多く、一方 L 蛋白が最も少ない。これまで SSPE ウイルスには M、F、H 蛋白をコードする遺伝子の変異が報告されている(1)。また、我々が既に行った同じパラミクソウイルス科のウイルスである Respiratory Syncytial virus の *in vitro*、*in vivo* での siRNA の効果検討より、ウイルスの膜融合蛋白をコードする F 遺伝子に対する siRNA が最も効果的であった。以上のことから、報告されている SSPE ウイルスの Bellini 株(GeneBank 登録番号: M10456)、Baczko 株(89920)、Takeuchi 株(NC001498) のゲノム情報をもとに麻疹ウイルス N、P、F、L 遺伝子を標的遺伝子として siRNA を設計した。

設計した siRNA は何れも FP-1 感染後 24 時間での感染性ウイルス産生への抑制効果は著明であった。しかし FP-1 感染後 48 時間では抑制効果が認められたのは N 遺伝子に対する si-RNA(si-N)のみであった。さらに si-N は N 遺伝子の発現を強力に濃度依存的に抑制したが、他の P、F、L 遺伝子の発現も濃度依存的に抑制していた。ヌクレオカプシド形成に関与する N 遺伝子の発現低下が、ウイルス粒子内でのウイルスゲノム存在を不安定にし、さらに RNP 複合体形成の低下が、感染性ウイルス粒子産生を減少

させたことが、P、F、L 遺伝子の発現抑制の一因であると考えられ、さらに N 遺伝子が感染性ウイルス粒子産生に関係する責任遺伝子とも考えられる。一方、P、L 遺伝子に対する siRNA が FP-1 感染後 48 時間の感染性ウイルス産生に抑制効果が認められなかった理由として次のように考える。P、L、N 蛋白は何れも RNP 複合体形成に不可欠であるが、siRNA 濃度が 20nM でも完全に感染粒子産生を抑制することはできない。N 蛋白質が十分に発現している環境下では、P、L 蛋白の発現が少ないながらも存在すれば感染粒子産生が可能であることを示唆している。また、F 蛋白質、M 蛋白質においては、F mRNA の 5' 末端側、M mRNA の 3' 末端側の蛋白質非翻訳領域がそれぞれの蛋白質の発現を調節していることが明らかになっている(7)。N 遺伝子産物の他の遺伝子発現調節への直接的作用についての報告はない。

現在まで SSPE に対し有効性が証明されているのは inosiplex と IFN であり、さらに SSPE 発症初期の患者において ribavirin の脳室内投与により臨床症状改善の報告がある。ribavirin の経口薬、あるいは静脈よりの全身投与による治療では、その強い骨髄抑制作用のために治療中止を余儀なくされていたが、ribavirin の脳室内投与により、全身性の副作用を来すことなく髄液中の ribavirin の有効濃度を保つことが可能になった(2)。今回、si-N と IFN α -2b、ribavirin との併用効果が認められたことにより、さらに効果的な IFN α -2b、ribavirin との併用療法が可能になると思われる。

SSPE ウイルスへの siRNA の効果は各遺伝子発現への影響についての検討では、si-F が遺伝子特異的に F 遺伝子の発現を抑制した。si-N は FP-1 での感染実験の結果と同様に、N 遺伝子以外に P、F、L 遺伝子の発現も抑制した。同様の結果は si-P でも認め

られた。si-L は標的遺伝子である L 遺伝子への抑制効果も顕著ではなかった。実験に使用している SSPE ウイルス株、YH-1 の L 遺伝子の塩基配列が si-L と一致していない可能性もあり、L 遺伝子の塩基配列の決定が必要である。さらに、遺伝子発現抑制効果のみではなく、感染粒子産生への影響についての検討も必要である。

SSPE の siRNA での治療を考慮した場合、ドラッグデリバリーが問題となる。神経細胞は遺伝子導入が困難な細胞の一つである。神経系細胞への siRNA 導入にペプチドを結合した siRNA が効果を示したとの報告がある(8)。ヒト免疫不全ウイルスでは、siRNA 結合プロタミン-特異的抗体融合蛋白を用いた特定細胞への siRNA 導入も報告もある(9,10)。またウイルスベクターの利用も候補となりうると考えられる。最も重要なことは SSPE ウイルスの中枢神経での感染部位、感染細胞を明らかにすることである。感染局所への siRNA の導入を可能にし、siRNA の SSPE 治療への足掛かりとなると考えられる。

E. 結論

今回の結果より、SSPE ウイルスゲノム情報をもとに作製した siRNA が麻疹臨床分離株、さらに SSPE ウイルスにおいて遺伝子発現を抑制し、感染ウイルス粒子の産生を減少させることが示された。さらに、既存の SSPE 薬の IFN α -2b、ribavirin との併用効果が確認できた。今後、siRNA のドラッグデリバリーの問題を克服することにより新たな治療法となりうると考えられる。

[参考文献]

1. In:Fields VIROLOGY 4th ed. 1401-1441.
2. Hosoya M, Mori S, Tomoda A, et al. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration

- for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12):4631-4635.
3. Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y .Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol* 2003; 77(18): 9943-9950.
 4. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2004;32(3):936-948.
 5. Uhlmann V, Martin C M, Sheils O, et al. Potential viral pathogenic mechanism for new variant inflammatory bowel disease. *Mol Pathol* 2002;55(2):84-90.
 6. PLumet S, Gerlier D. Optimized SYBR green real-time PCR assay to quantify the absolute copy number of measles virus RNAs using gene specific primers. *J Virol Methods* 2005;128(1-2):79-87.
 7. Tahara M, Takeda M, Yanagi Y. Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol.* 2005;79(24):15218-15225.
 8. Davidson T.J, Harel S, Valerie A. Arboleda, et al. Highly Efficient Small Interfering RNA Delivery to Primary Mammalian Neurons Induces MicroRNA-Like Effects before mRNA Degradation. *J Neurosci* 2004; 24(45):10040 -10046.
 9. Song E, Zhu P, Lee SK, et al. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 2005; 23(6):709-717.
 10. Turner J.J, Jones S, Fabani M.M, et al. RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38(1):1-7.
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 リアルタイムPCRのプライマーとプローブ

	Gene	5' to 3' sequence
Primer		
N forward	N	TCA GTA GAG CGG TTG GAC CC
N reverse	N	GGC CCG GTT TCT CTG TAG CT
F forward	F	TGA CTC GTT CCA GCC ATC AA
F reverse	F	TGG GTC ATT GCA TTA AGT GCA
P forward	P	AATCTGAAAACAGCGATGTGGAT
P reverse	P	TCCCCGGTCAGTGATAGCAT
L forward	L	GTGTGAAAGCGACGAG
L reverse	L	TGTTCCACGAAGATCCT
18S forward	18S	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG
18S reverse	18S	GGACATCTAAGGGCATCACA
Probe		
N probe	N	CAA ACA GAG TCG AGG AGA AGC CAG GGA
F probe	F	CTG CAC GAG GGT AGA GAT CGC AGA ATA CAG
P probe	P	TGGCGAACCTGATACCGAGGGA

図1. 各siRNAの麻疹ウイルスへの増殖抑制効果

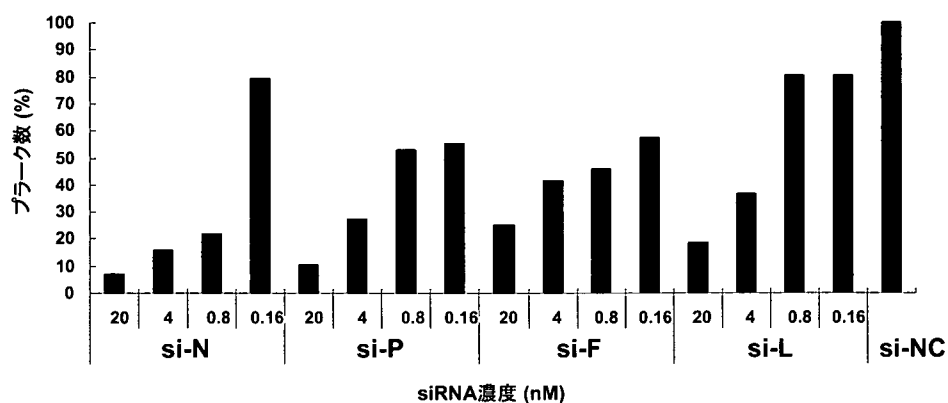


図2. 各siRNA (20nM) の感染後24、48時間におけるウイルス増殖抑制効果

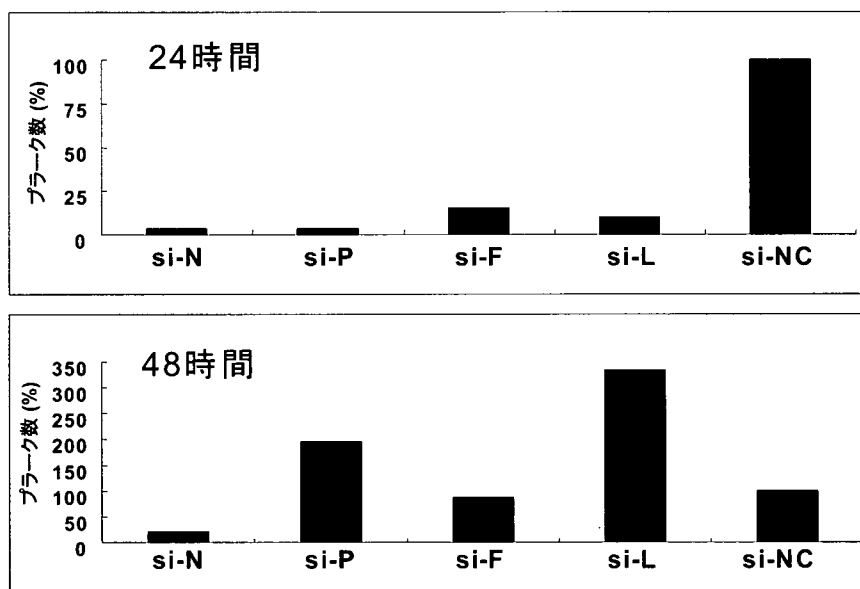


図3. siRNA処理VERO/SLAM細胞での麻疹ウイルスの細胞変成効果 (moi: 0.1 感染48時間後)

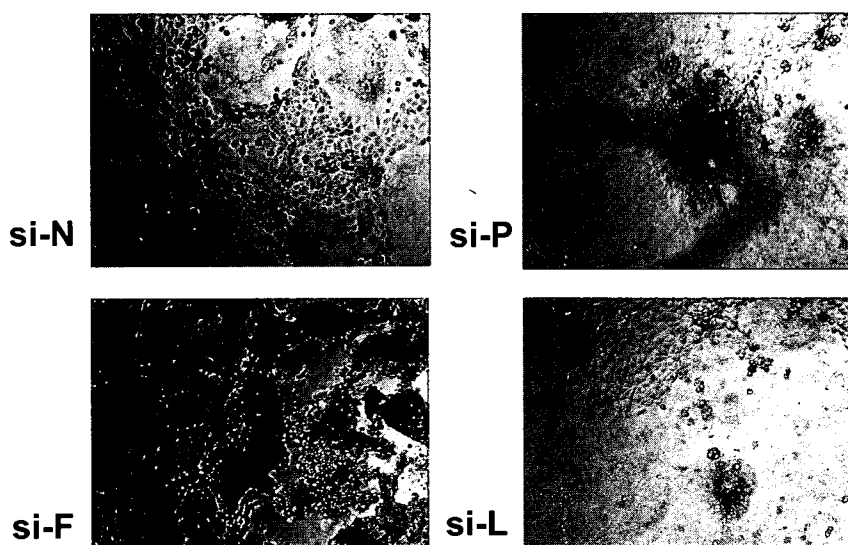


図4. N遺伝子に対するsiRNAの各遺伝子発現への影響

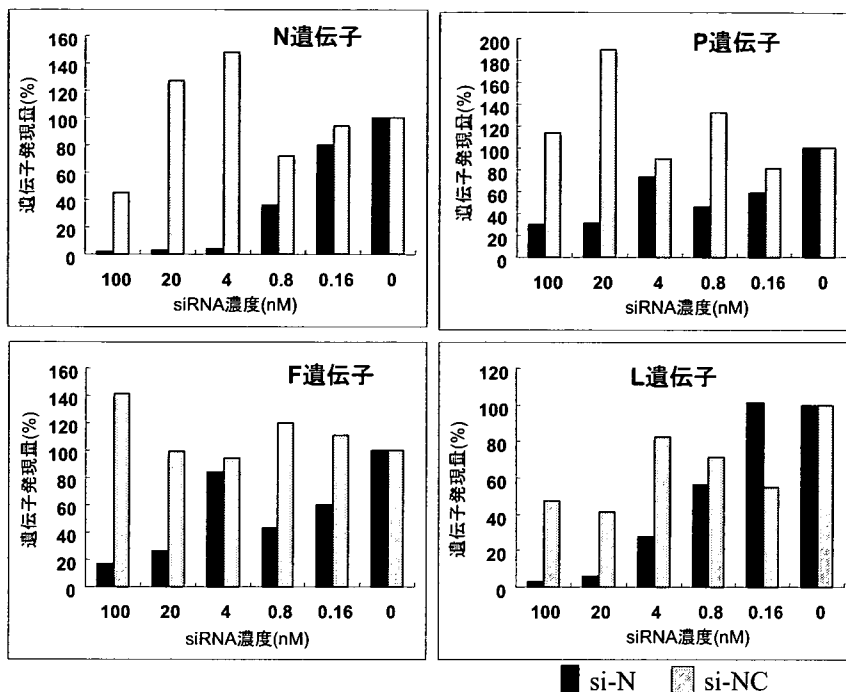


図5. N遺伝子に対するsiRNAのN遺伝子発現および麻疹ウイルス増殖への影響

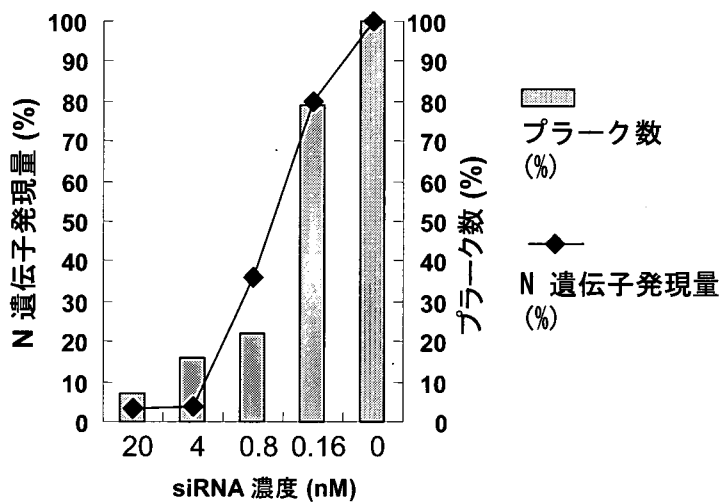


図6. N遺伝子に対するsiRNA (si-N: 5nM) と Ribavirinとの併用効果

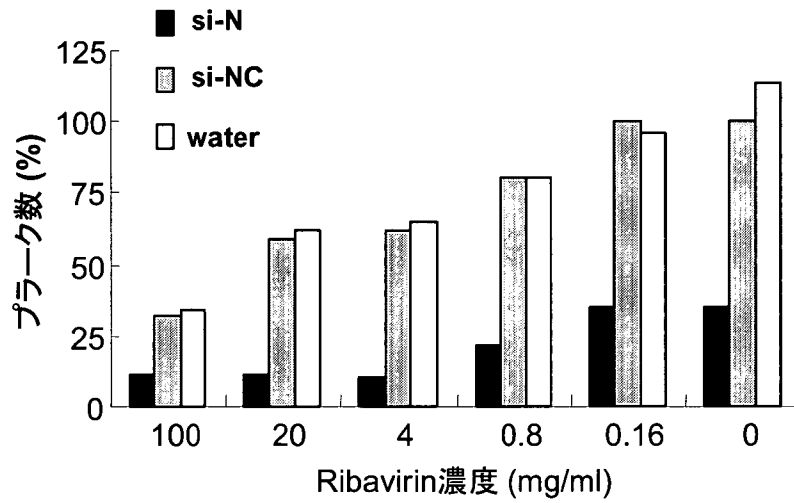


図7. N遺伝子に対するsiRNA (si-N: 5nM) と IFN α -2bとの併用効果

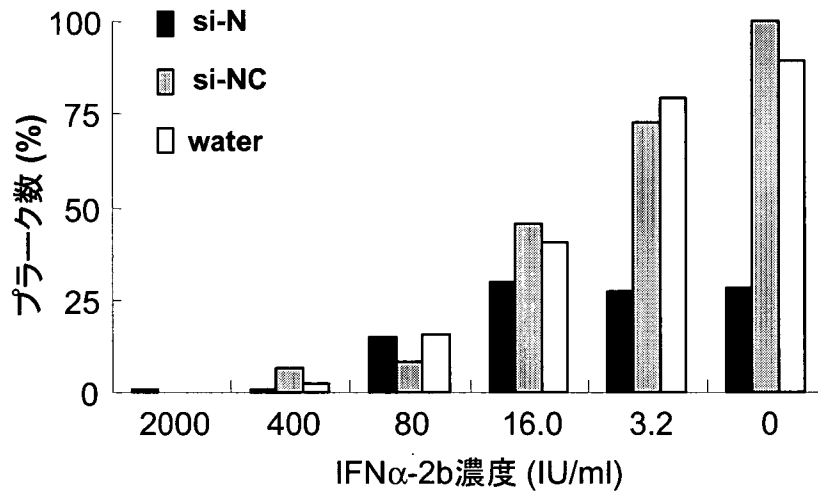
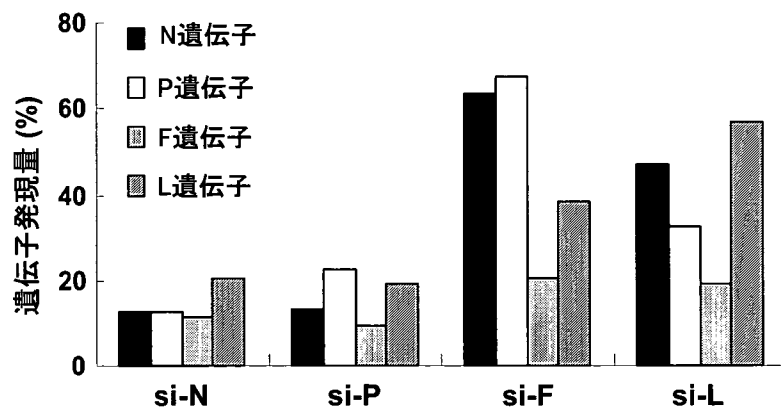


図8. 各 siRNA (20nM) のSSPEウイルス各遺伝子発現への影響



SSPE ウイルスの特徴である感染性遊離ウイルス粒子非産生性を規定する M タンパク質の単一アミノ酸点変異の同定

分担研究者：堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野

研究要旨

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の病原体である麻疹ウイルス（MV）変異株（SSPE ウイルスともよぶ）の特徴は感染性ウイルス粒子（ビリオン）を産生しないこと及び神経親和性・神経病原性を有することである。しかし、これらの性質を規定するウイルス遺伝子の変異は、明らかに同定されていない。本研究では、M タンパク質の変異が感染性ウイルス粒子非産生性を規定しているか否かについて検証した。

野生型 MV の M タンパク質に特定の単一点変異（L165P、L250P、Y282H）を導入することにより、SSPE ウイルスの M タンパク質と類似の Triton X-100 可溶性及び細胞内局在の変化を示した。さらに、感染性ウイルス粒子産生も著しく低下し、とくに L165P の単一点変異では 1/1,000 以下と検出限界近くまで低下した。すなわち、この M タンパク質の性質の変化は、SSPE ウイルスに特徴的な性状変化であると考えられた。しかし一方、SSPE-Kobe-1 株と同じ 3 ヶ所の点突然変異（L165P、L250P、Y282H のすべて）を持つ組換えウイルスは、L165P 単一点変異のものより 10 倍高い感染性ウイルス粒子産生能を示した。SSPE-Kobe-1 株は感染性ウイルス粒子を全く産生しないことから、感染性ウイルス粒子産生能の欠失には、M タンパク質以外にも他のウイルスタンパク質の変異が関与していると考えられた。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の原因である SSPE ウイルスは麻疹ウイルス（MV）の変異株である。SSPE ウイルスは感染性ウイルス粒子（ビリオン）を産生しないこと、及び、神経親和性・神経病原性を有すること、により特徴付けられている。しかし、これらの性質を規定するウイルス遺伝子の変異については、明らかに同定されていない。我々はこれまでに、SSPE 発症 6 週間後の 5 歳患児から分離した SSPE ウイルスの M タンパク質には 3 カ所の点変異（L165P、L250P、Y282H）がみられることを報告した¹⁾。本研究では、この変異が

実際に SSPE ウイルスの特徴の一つである感染性ウイルス粒子非産生性を規定しているか否かを検証することを目的とした。

B. 研究方法

1) SSPE ウイルス遺伝子の解析

我々が最近分離した SSPE ウイルス（Kobe-1 株）¹⁾ の感染細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法で増幅して得られた cDNA の塩基配列を常法により決定した。それをもとにアミノ酸配列を推定した。

2) M タンパク質発現プラスミドの作製

SSPE-Kobe-1 株及び MV 野外株（MV-IchB）の M タンパク質ならびに点突

然変異を持つ M タンパク質をそれぞれコードする cDNA を発現プラスミドにクローニングし、培養細胞に発現させた。

3) 遺伝子組換え MV の作製

遺伝子組換え MV-IchB (九州大学・柳雄介教授より分与)²⁾ の M 遺伝子に点変異を導入し、M タンパク質の単一点変異を持つ遺伝子組換え麻疹ウイルスを作製した。

4) M タンパク質の性状解析

ウイルス感染細胞を様々な可溶化剤で処理し、遠心により可溶性画分と不溶性画分に分画し、M タンパク質に対する特異抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。

M タンパク質の細胞内局在は、特異抗体を用いた蛍光抗体法により行った。

5) 培養液中の感染性遊離ウイルスの測定

B95a 細胞あるいは Vero/SLAM 細胞を用いたプラク法によった。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え MV の作製及び使用は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得た。すべてのウイルス感染実験は微生物学研究室においてバイオセーフティー指針に準拠して行った。

C. 研究結果

1) SSPE-Kobe-1 株及び MV 野外株の M タンパク質の可溶性の相違

MV 野外株 (K52 株、Edmonston 株) の M タンパク質は 0.5% Triton X-100 によりかなり可溶化されたが、SSPE-Kobe-1 株の M タンパク質はほとんど可溶化されなかった。一方、SSPE-Kobe-1 株の M タンパク質は 0.5% deoxycholate (DOC) をさらに添加することによりほぼ完全に可溶化された。(図 1)

2) プラスミドにより単独発現させた M

タンパク質の可溶性

SSPE-Kobe-1 株と MV-IchB 株の M タンパク質、及び、それらの点突然変異 M タンパク質を、発現プラスミドを用いて Vero/SLAM 細胞に発現させ、その可溶性について調べた。

MV-IchB 株の M タンパク質は、ウイルス感染で発現させた場合と同様に、0.5% Triton X-100 によりかなり可溶化された。一方、SSPE-Kobe-1 株の M タンパク質及び点突然変異 M タンパク質 (L165P、L250P、Y282H) のいずれもが、SSPE-Kobe-1 感染の場合と同様に、0.5% Triton X-100 ではほとんど可溶化されなかった。これらの変異 M タンパク質は 0.5% DOC の添加によりほぼ完全に可溶化された。(図 2)

3) SSPE-Kobe-1 株及び MV 野外株の M タンパク質の細胞内局在の相違

SSPE-Kobe-1 株と MV-IchB 株の M タンパク質、及び、それらの点突然変異 M タンパク質を、発現プラスミドを用いて Vero/SLAM 細胞に発現させ、その細胞内局在について調べた。

MV-IchB 株の M タンパク質は細胞膜に集積する傾向がみられたが、SSPE-Kobe-1 株及びキメラ型の M タンパク質はすべて、細胞膜への集積は明らかには認められなかった。(図 3)

4) M タンパク質に点突然変異を有する遺伝子組換え MV-IchB の解析

M タンパク質に点突然変異 (L165P、L250P、Y282H) を有する遺伝子組換え MV-IchB を作製した。(図 4)

上記の M タンパク質変異 MV-IchB 株は、いずれも、Vero/SLAM 細胞に明瞭な融合巨細胞を形成した。(図 5)

遺伝子組換え変異 MV-IchB の M タンパク質の可溶性は、単一点突然変異あるいは 3ヶ所変異いずれの場合でも SSPE-Kobe-1

株と同じ傾向を示した。(図 6)

遺伝子組換え変異 MV-IchB の M タンパク質の細胞内局在は、3 ヶ所変異を持つウイルスと L250P 単一点突然変異を持つウイルスで類似しており、変異を持たない MV-IchB 親株とは異なるパターンを示した。一方、L165P あるいは Y282H の単一点突然変異を持つウイルスの M タンパク質の細胞内局在はお互いに類似しており、MV-IchB 親株と 3 ヶ所変異を持つ SSPE ウイルスの中間型と考えられた。(図 7)

M タンパク質変異ウイルスの感染性ウイルス粒子形成能について比較した。L165P の単一変異を持つウイルスの感染性ウイルス粒子産生は、陽性対照である MV-IchB 株の 1/1,000 以下とごくわずかに認められるのみであった。なお、同じ条件下で、陰性対照の SSPE-Kobe-1 株では感染性ウイルス粒子産生は全く認められなかった。一方、M タンパク質に 3 ヶ所の点突然変異 (L165P、L250P、Y282H) を有するウイルスは、MV-IchB 株の 1/100 と明らかに低下したものの、L165P 単一変異ウイルスと比べると 10 倍多い感染性ウイルス粒子を産生した。(図 8)

D. 考察

野生型 MV の M タンパク質に特定の単一点変異を導入することにより、SSPE ウイルスと類似の Triton X-100 可溶性及び細胞内局在の変化を示した。これらの M タンパク質の性質の変化は、SSPE ウイルスに特徴的な性状変化であると考えられた。

一方、M タンパク質の特定の単一点変異 (L165P) により、感染性ウイルス粒子産生が MV-IchB 親株の 1/1,000 以下に低下した。しかし、SSPE-Kobe-1 株と同じ 3 ヶ所の点突然変異 (L165P、L250P、Y282H) を持つ組換えウイルスは、L165P 単一点変異のものより 10 倍高い感染性ウイルス粒

子産生能を示した。SSPE-Kobe-1 株は感染性ウイルス粒子を全く産生しないことから、感染性ウイルス粒子産生能の欠失には、M タンパク質以外にも他のウイルスタンパク質の変異が関与していると考えられた。SSPE-Kobe-1 株では、F タンパク質と H タンパク質にも特有の変異が見られる^{1,3)}。今後は、F タンパク質と H タンパク質にも変異を導入して、さらに解析を進める予定である。そして、今回解析した M タンパク質及び F タンパク質や H タンパク質の変異と神経病原性との関連についても解析を進めたい。

E. 結論

野生型 MV の M タンパク質に特定の単一点変異を導入することにより、SSPE ウイルスと類似の Triton X-100 可溶性及び細胞内局在の変化を示した。さらに、感染性ウイルス粒子産生も著しく低下した。すなわち、これらの M タンパク質の性質の変化は、SSPE ウイルスに特徴的な性状変化であると考えられた。しかし一方、感染性ウイルス粒子産生能の完全欠失には、M タンパク質以外にも他のウイルスタンパク質の変異が関与していることが考えられた。

[参考文献]

1. Hotta H, Nihei K, Abe Y, Kato S, Jiang D-P, Nagano-Fujii M, Sada K. Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE. *Microbiol Immunol* 2006;50:525-534.
2. Takeda M, Ohno S, Seki F, Hashimoto K, Miyajima N, Takeuchi K, Yanagi Y. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing

Chinese hamster ovary cells. *Virus Res* 2005;108:161-165.

3. Rima BK, Duprex WP. Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res* 2005; 111:132-147.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Otaki M, Sada K, Kadoya H, Kato S, Nagano-Fujii M, Hotta H: Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. *Antiviral Res* 2006;70:105-111.
2. Hotta H, Nihei K, Abe Y, Kato S, Jiang D-P, Nagano-Fujii M, Sada K: Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis

(SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE. *Microbiol Immunol* 2006; 50:525-534.

3. Ohgimoto K, Ohgimoto S, Ihara T, Mizuta H, Ishido S, Ayata M, Ogura H, Hotta H: Difference in production of infectious wild-type measles and vaccine viruses in monocyte-derived dendritic cells. *Virus Res* 2007;123:1-8.

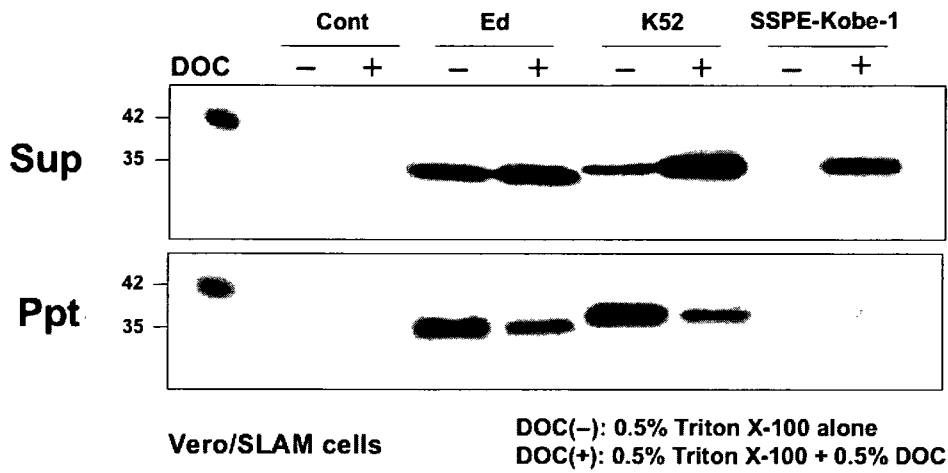
2. 学会発表

1. 扇本真治, 庵原俊昭, 加藤誠一, 綾田稔, 大谷早苗, 堀田博, 小倉壽. 麻疹ウイルス野外株とワクチン株の単球由来樹状細胞での感染性ウイルス産生の違い. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2006. 11. 21

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 1. Comparison of M protein solubility
(Virus-infected)



The M protein of SSPE-Kobe-1 was less soluble than that of wild-type MV in a buffer without deoxycholate (DOC).

Fig. 2. Comparison of M protein solubility
(Plasmid-based expression)

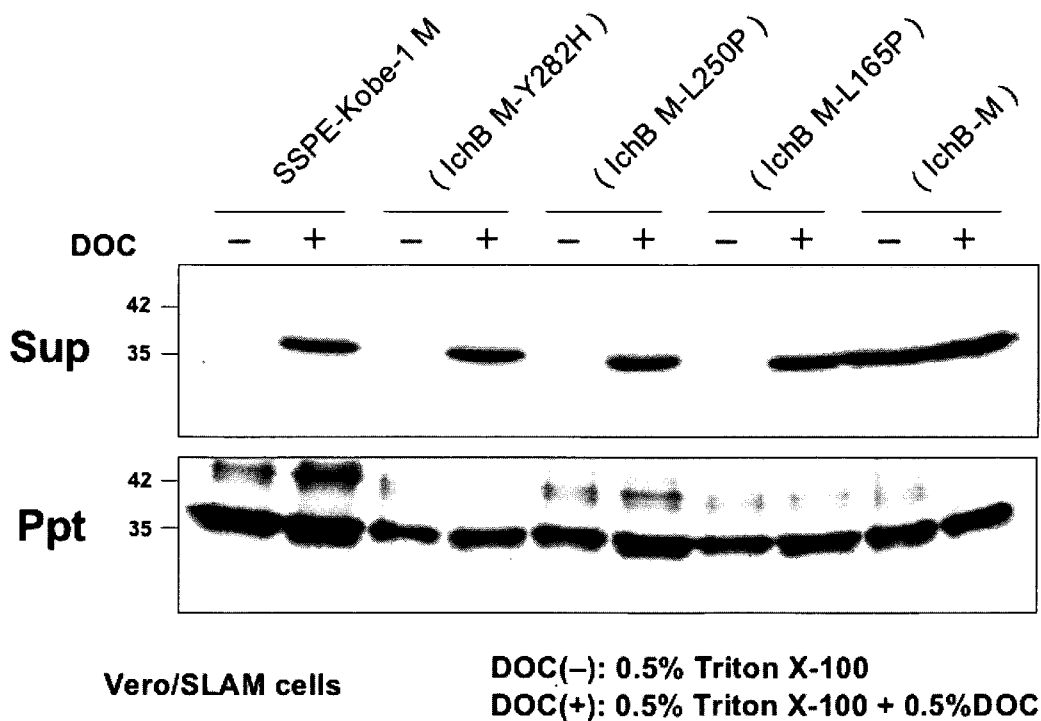


Fig. 3. Comparison of subcellular localization of M protein
(Plasmid-based expression)

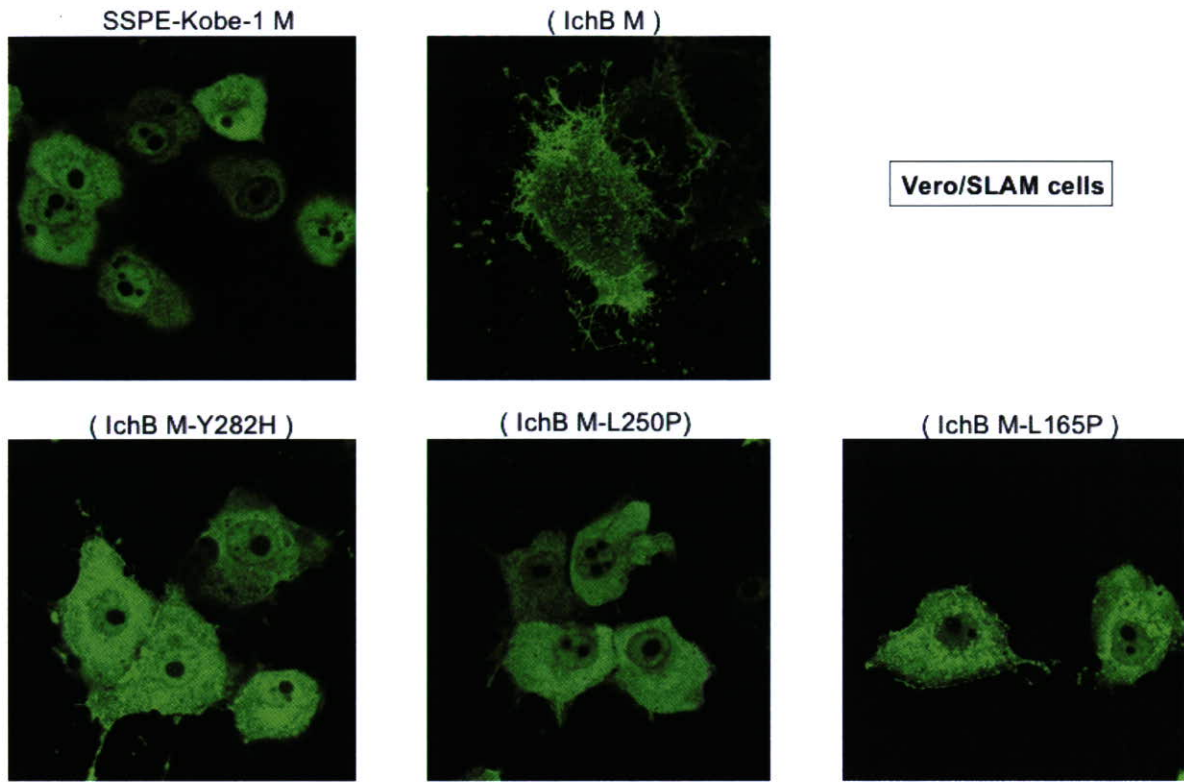


Fig. 4. Construction of recombinant MV mutants

