

郎:亜急性硬化性全脳炎 宿主側の遺伝要因. 日本臨牀 2007 ; 65 : 1467-1474.

2. 楠原浩一、吉良龍太郎、鳥巢浩幸、原 寿郎 : SSPE の発症要因 - 宿主側遺伝要因の解析 -. Neuroinfection 2008 (in press)

学会発表

1. 武本環美, 楠原浩一, 吉良龍太郎, 鳥巢浩幸, 石崎義人, 酒井康成, 原 寿郎. 亜急性硬化性全脳炎における dsRNA 認識関連分子の遺伝子多型解析. 第 48 回日本小児神経学会総会. 浦安, 2006.6.1-3.
2. 石崎義人, 由茅直子, 吉良龍太郎, 楠原浩一, 鳥巢浩幸, 原 寿郎, Pipo-Deveza JR, Silao CLT, Lukban MB, Salonga AM. PD1 と亜急性硬化性全脳炎の関連. 第 12 回日本神経感染症学会. 福岡, 2006. 10.12-13.

2) 海外

口頭発表 : 5 件

原著論文による発表 : 2 件

それ以外(レビュー等)の発表 : 0 件

そのうち主なもの

論文発表

1. Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Hara : Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays. J Neurovirol 2005 ; 11 : 299-305.
2. Pipo-Deveza JR, Kusuhara K, Silao CL, Lukban MB, Salonga AM, Sanchez BC, Kira R, Takemoto M, Torisu H, Hara T. Analysis of MxA, IL-4, and IRF-1 genes in Filipino patients with subacute sclerosing panencephalitis. Neuropediatrics 2006 ; 37 : 222-228.

学会発表

1. Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Hara T. The gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays. Experimental Biology. San Diego 2005.3.30-4.5.
 2. Ishizaki Y, Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Hara T. Association of PD-1 gene to subacute sclerosing panencephalitis. 2nd Congress of Asian Society for Pediatric Research. Yokohama, 2006.12.8-10.
 3. Pipo-Deveza JR, Kusuhara K, Silao CLT, Lukban MB, Salonga AM, Sanchez BC, Kira R, Takemoto M, Torisu H, Hara T. Analysis of MxA, IL-4, and IRF-1 genes in Filipino patients with subacute sclerosing panencephalitis. 9th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. Cebu 2007.1.24-27.
 4. Kusuhara K, Hosoya M, Tomoda A, Nomura K : New treatment for SSPE. 9th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. Cebu 2007.1.24-27.
7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
1. 特許取得
特なし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

表1 SSPE 群と正常対照群における各多型の allele 頻度

Gene	Polymorphism	Allele	Controls (%)	SSPE (%)	P value
RIGI	rs277729	T	48 (28.6)	30 (37.5)	0.16
		G	120 (71.4)	50 (62.5)	
	rs9695310	C	118 (70.2)	54 (67.5)	0.66
		G	50 (29.8)	26 (32.5)	
LGP2	rs2074158	T	129 (76.8)	64 (80.0)	0.57
		C	39 (23.2)	16 (20.0)	
MDA5	rs4664463	T	137 (81.5)	70 (87.5)	0.24
		C	31 (18.5)	10 (12.5)	

表2 SSPE 群と正常対照群における TLR3 の各多型の allele 頻度

Gene	Polymorphism	Allele	Controls (%)	SSPE (%)	P value
TLR3	-7C/A	C	130 (77.4)	60 (75.0)	0.68
		A	38 (22.6)	20 (25.0)	
	IVS3+71C/A	C	132 (78.6)	61 (76.3)	0.68
		A	36 (21.4)	19 (23.8)	
	c.1243C/T (L412F)	C (L)	122 (72.6)	47 (58.8)	0.03
		T (F)	46 (27.4)	33 (41.3)	
	c.1377C/T	C	107 (63.7)	53 (66.3)	0.69
		T	61 (36.3)	27 (33.8)	

表3 L412F と他の SNPs の連鎖不平衡解析(D'値)

	IVS3+71C/A	L412F	c.1377C/T
-7C/A	0.83	0.77	0.84
IVS3+71C/A		0.88	0.90
L412F			1.00

表4 L412F と c.1377C/T による haplotype の推定頻度

Haplotype	Controls (%)	SSPE (%)	P value
L/C	61 (36.3)	20 (25.0)	0.07
L/T	61 (36.3)	27 (33.8)	0.69
F/C	46 (27.4)	33 (41.3)	0.03

表5 SSPE 患者群と正常対照群における MxA - 88G/T および IL4 - 589C/T 多型の genotype 頻度および allele 頻度 (フィリピン人)

SNPs	Controls	SSPE	OR [95%CI]	P-value
MxA - 88G/T				
Genotype 頻度				
GG	60 (50%)	31 (52%)	1.06 [0.57, 1.98]	0.83
GT	56 (47%)	24 (40%)	0.76 [0.40, 1.42]	0.39
TT	4 (3%)	5 (8%)	2.63 [0.68, 10.20]	0.14
Total	120	60		
Allele 頻度				
G	176 (73%)	86 (72%)	0.91 [0.56, 1.50]	0.73
T	64 (27%)	34 (28%)	1.08 [0.66, 1.77]	0.73
IL4 - 589C/T				
Genotype 頻度				
CC	13 (11%)	4 (7%)	0.58 [0.18, 1.88]	0.36
CT	53 (44%)	36 (60%)	1.89 [1.01, 3.55]	0.04
TT	54 (45%)	20 (34%)	0.61 [0.32, 1.16]	0.13
Total	120	60		
Allele 頻度				
C	79 (33%)	44 (37%)	1.17 [0.74, 1.86]	0.47
T	161 (87%)	76 (64%)	0.84 [0.53, 1.34]	0.47

表6 SSPE 患者群と正常対照群における IRF1 GT リピート 多型の genotype 頻度 (フィリピン人)

	SSPE (n=60)	Controls (n=120)	P-value
IRF1 (GT)n repeat			
Allele 0 10 repeat	0 (24.5)	1 (30.3)	0.67
Allele 1 11 repeat	30 (40.5)	70 (42.1)	0.41
Allele 2 12 repeat	46 (1.0)	80 (0.0)	0.35
Allele 3 13 repeat	1 (0.0)	1 (0.0)	0.58
Allele 4 14 repeat	0 (0.0)	0 (0.0)	
Allele 5 15 repeat	18 (6.1)	25 (6.6)	0.21
Allele 6 16 repeat	8 (21.2)	12 (15.8)	0.52
Allele 7 17 repeats	17 (7.0)	44 (5.3)	0.32
Allele 8 18 repeat	0 (21.2)	6 (15.8)	0.09
Allele 9 19 repeats	0 (7.0)	1 (5.3)	0.67
Whole distribution			0.44

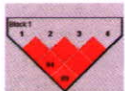
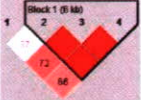
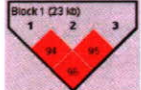
表7 SSPE 患者群と正常対照群における TLR3 c.1234 C/T (L412F) 多型の genotype 頻度および allele 頻度 (フィリピン人)

SNPs	Controls	SSPE	OR [95%CI]	P-value
TLR3 c.1234 C/T (L412F)				
Genotype 頻度				
CC (LL)	2 (3%)	21 (18%)	0.16 [0.03, 0.71]	0.007
CT (LF)	40 (87%)	51 (43%)	2.70 [1.42, 5.17]	0.002
TT (FF)	18 (30%)	48 (40%)	0.64 [0.33, 1.24]	0.19
Total	60	120		
Allele 頻度				
C (L)	93 (73%)	44 (72%)	0.91 [0.58, 1.43]	0.70
T (F)	147 (27%)	76 (28%)	1.09 [0.69, 1.72]	0.70

表8 抑制性副刺激分子およびその関連分子の遺伝子多型の minor allele 頻度 (日本人)

Polymorphism	Allele 頻度 Ctrl/SSPE	P-value	Polymorphism	Allele 頻度 Ctrl/SSPE	P-value
CTLA4			BTLA		
rs733618 I/C	42.0/47.5	0.47	rs2705534 G/T	21.0/23.8	0.61
rs231775 G/T	32.0/38.8	0.37	rs9288953 C/T	45.0/53.8	0.26
rs231779 A/G	42.0/46.3	0.58	rs2171513 I/C	29.0/31.3	0.98
rs3087243 A/G	30.0/36.4	0.40	PDI		
CD80			rs4656739 G/A	36.0/53.8	<u>0.007</u>
rs2228017 I/C	29.0/25.0	0.51	rs4656740 C/T	35.0/48.8	0.062
CD86			rs4978592 G/A	35.0/55.0	<u>0.007</u>
rs1129055 G/A	37.0/31.3	0.40	rs2227982 C/T	34.0/53.8	<u>0.017</u>
HVEM			PDL1		
rs1886730 A/G	46.0/46.3	0.98	rs822342 I/C	43.2/43.8	0.93
rs2234161 I/C	51.0/50.0	0.98	rs2297137 A/G	50.0/52.5	0.74
rs2234167 A/G	5.0/5.0	0.98	PDL2		
			rs48532780 A/G	6.9/13.8	0.12
			rs16923189 G/A	27.0/23.8	0.62

表9 PD1, CTLA, BTLA 遺伝子の推定ハプロタイプ頻度 (日本人)

	推定ハプロタイプ頻度			
	Control	SSPE	P-value	
PD1				
GCGC	33.0	48.7	0.022	
ATAT	62.0	42.5	0.009	
CTLA4				
ATG	32.0	38.7	0.35	
GCA	30.0	36.2	0.37	
GTG	26.0	15.0	0.07	
GCG	12.0	10.0	0.67	
BTLA				
CTT	53.9	44.9	0.23	
TCG	19.9	23.7	0.54	
CCT	16.0	23.9	0.19	

Haploview vresion 3.32で解析

表10 フィリピン人での検討

表10a PD1遺伝子多型のminor allele 頻度

Polymorphism	Allele 頻度 Ctrl/SSPE	P-value
rs4656740 C/T	62.9/67.5	0.38
rs4978592 G/A	75.4/79.2	0.42
rs2227982 C/T	71.4/71.7	0.91

表10b PD1遺伝子多型の推定ハプロタイプ頻度

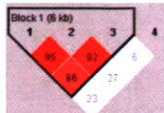
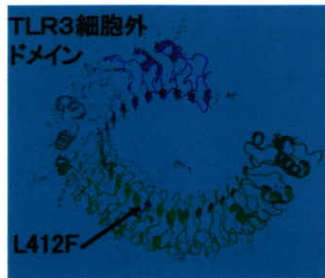
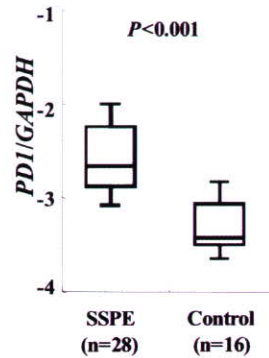
	推定ハプロタイプ頻度			
	Control	SSPE	P-value	
GCG	52.8	66.7	0.011	
ATG	19.0	11.7	0.07	
ATA	15.0	18.3	0.18	

図1 TLR3 の立体構造



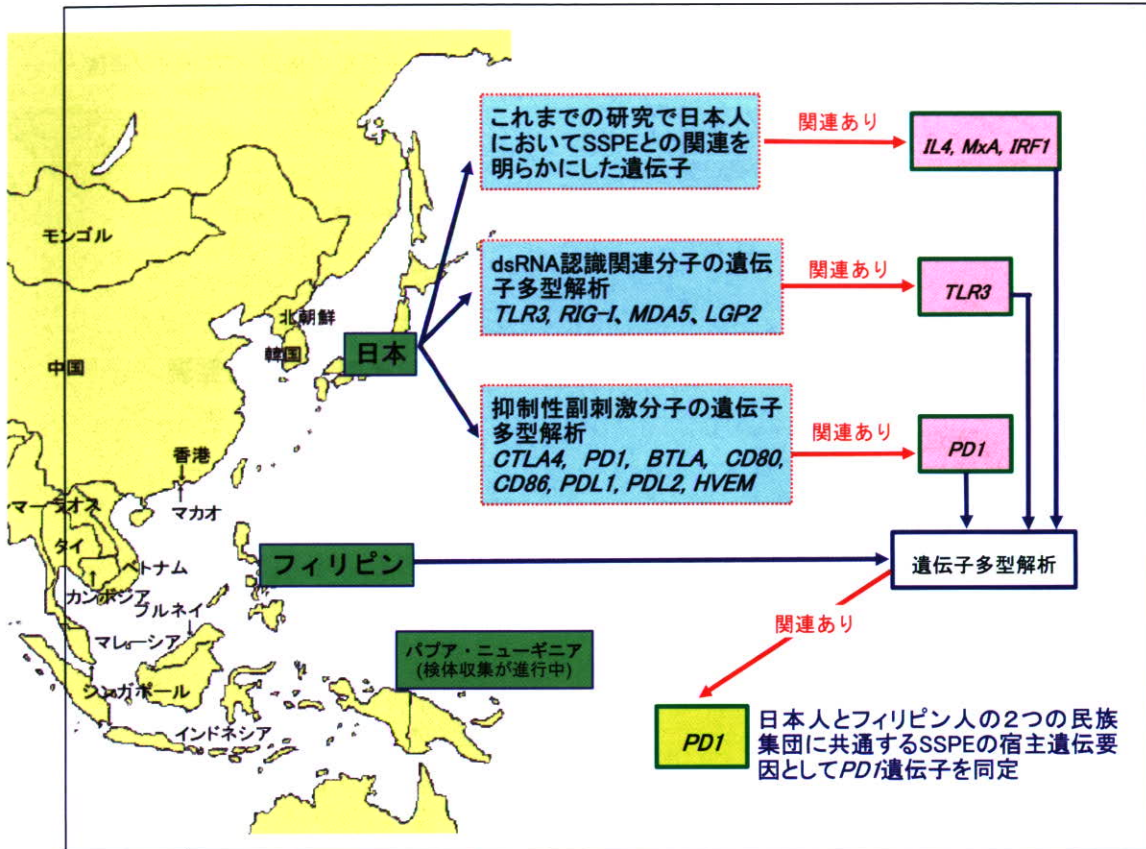
Dr. Davies (NIH)による

図2 末梢血単核球でのPD1発現



日本人およびフィリピン人における SSPEの宿主遺伝要因の解析

分担研究者 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野(小児科)楠原浩一



これまでの研究で日本人においてSSPEとの関連を見出した3つの遺伝子多型(*MxA*-88G/T、*IL4* -589C/T、*IRF1* GT repeat)に加えて、今回の研究で行った dsRNAの認識分子、抑制性副刺激分子およびその関連分子の遺伝子多型解析によって新たに関連が見出された2つの遺伝子(*TLR3*、*PD1*)についてフィリピン人での検討を行ったところ、*PD1*の3つの遺伝子多型で構成されるハプロタイプの頻度にSSPE群と対照群の間で有意差をみとめた。この結果、日本人とフィリピン人の2つの民族集団に共通するSSPEの宿主遺伝要因として*PD1*遺伝子が同定された。

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

1. 研究目的

本研究は下記の①と②の2項目を目的とした。

- ① 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は、麻疹ウイルスの変異株が中枢神経系に長期持続感染することによっておこる極めて予後不良の遅発性ウイルス感染症である。その原因である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未だ同定されていない。我々はこれまでに、SSPE発症6週間後の5歳患児からSSPEウイルス(SSPE-Kobe-1株)を分離し、ウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。その結果、SSPE-Kobe-1株は他のSSPEウイルス分離株に比べて変異数が少ないことがわかった。これを利用して、本研究では、SSPEウイルス新鮮分離株の性状解析を通して、本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遺伝子変異を、組換え麻疹ウイルスを用いたリバーシジェネティクス法により同定することを主たる目的の一つとした。
- ② 一方、現在行われているSSPEの治療法(インターフェロンとイノシプレックス或いはリバビリンの併用療法)はある程度の有効性は認められているが未だ十分ではなく、より効果的な新規抗ウイルス治療法の開発が求められている。small interfering RNA(siRNA)によるRNA interference(RNAi)は、宿主の生体防御機構の一つとして重要な役割を持つことが明らかになってきており、多くの種類のウイルス増殖

を抑制することが報告されている。本研究ではSSPEウイルスの増殖を効果的に抑制するsiRNAを用いた治療法開発のための基礎データを得ることをも目的とした。

2. 研究方法

- ① SSPEウイルス新鮮分離株の性状と遺伝子解析
 - a) SSPEウイルス遺伝子の解析：SSPE-Kobe-1株感染細胞から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。
 - b) Mタンパク質発現プラスミドの作製：SSPE-Kobe-1株及び麻疹ウイルス野外株(MV-IchB)のMタンパク質ならびに点変異を持つ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。
 - c) 遺伝子組換え麻疹ウイルスの作製：遺伝子組換え麻疹ウイルス株(P(+))MV323；九州大学・柳雄介教授より分与)に様々な変異を導入し、変異遺伝子組換え麻疹ウイルスを作製した。
 - d) ウイルスタンパク質の性状解析：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、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。ウイルス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調べた。
 - e) 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(柳雄介教授より分与)を用いたプ

ラク法によった。

② SSPE ウイルス増殖抑制法の開発

- a) 合成 siRNA と siRNA 発現プラスミド及び siRNA 発現遺伝子組換えアデノウイルス：麻疹ウイルスの L mRNA 塩基配列の alignment 解析により、siRNA の標的としての条件に適合する配列を選定した。それらの塩基配列に対応するセンス及びアンチセンスの合成 RNA オリゴヌクレオチドを作製し、両者を常法によりアニーリングさせて合成 siRNA を作製した。なお、3'末端の配列は UU のかわりに TT にした。

siRNA 発現プラスミドの構築は既報の方法により、センス及びアンチセンスの合成 DNA オリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、siRNA 発現ベクター pcPUR+U6i (東京大学大学院工学系研究科・多比良和誠教授より分与) の U6i プロモーター下流にクローニングした。

上記の siRNA 発現ベクターの siRNA 発現カセットをシャトルベクターにクローニングし、市販の遺伝子組換えアデノウイルス作製キット (AdMax™ Adenovirus Vector Creation Kit ; Microbix Biosystems Inc.) を用いて、プロトコールに従って siRNA 発現組換えアデノウイルスを作製した。

- b) ウイルスと細胞培養

SSPE ウイルスは SSPE-Kobe-1 株 (genotype D3) を、麻疹ウイルスは新鮮分離株 K52 株 (genotype D3) と T8 株 (genotype D5)、及び実験室継代株 Edmonston 株 (genotype A) を用いた。SSPE ウイルス及び麻疹ウイルスの培養には B95a 細胞及び Vero/SLAM 細胞を用いた。

(倫理面の配慮)

遺伝子組換え麻疹ウイルス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。

3. 研究結果及び考察

① SSPE ウイルス新鮮分離株の性状と遺伝子解析

- a) M タンパク質の可溶性の解析：麻疹ウイルス野生株 (Edmonston 株、K52 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ず、0.5% deoxycholate (DOC) をさらに添加することにより、ようやく可溶化された (図 1)。

M タンパク質に点突然変異 (L165P、L250P、Y282H) を導入した遺伝子組換え麻疹ウイルス株 (図 2) の M タンパク質は SSPE-Kobe-1 株の M タンパク質と同様の可溶性パターンを示した (図 3)。

- b) M タンパク質の細胞内局在の解析：麻疹ウイルス野生株 (IchB) の M タンパク質は細胞膜に集積したが、SSPE-Kobe-1 株及び変異 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ず、細胞内にび漫性に存在した (図 4)。

- c) M タンパク質変異遺伝子組換え麻疹ウイルスの増殖能の解析：M タンパク質変異麻疹ウイルス株はいずれも明瞭な融合巨細胞を形成した (図 5)。これらの変異ウイルスの感染性遊離ウイルス粒子産生は約 100pfu/ml 以下であり、陽性対照である野生株 (MV323-IchB) の約 1/300 ~ 1/1,000 と著しく低かった (図 6)。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 (<5 pfu/ml)。一方、細胞内ウイルスタンパク質の合成は各ウイルス株いずれもほぼ同程度であった。(図 6)

SSPE-Kobe-1 株と同じ 3 ヶ所の点突然変異 (L165P、L250P、Y282H) を持つ組換え麻疹ウイルスは、感染性ウイルス粒子産生能が著しく低下するものの、SSPE-Kobe-1 株のように完全に消失することはなかった。このことから、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可能性が考えられた。そこで、SSPE ウイルスに特徴的な F タンパク質 C 末端領域のフレームシフト変異を、上記の M タンパク質変異組換え麻疹ウイルスに導入したところ、感染性ウイルス粒子産生能がほぼ完全に消失した (10~20pfu/ml)。この成績より、M タンパク質と F タンパク質の変異が、SSPE ウイルスの感染性ウイルス粒子非産生能を規定していると考えられた。

② SSPE ウイルス増殖抑制法の開発の検討

a) siRNA による麻疹ウイルス増殖の抑制：SSPE ウイルスの親株である麻疹ウイルス (K52 株) を用いて、8 種類の合成 siRNA (図 7) のウイルス増殖抑制効果を調べた。その結果、3 種類の siRNA (MV-L2、MV-L4 及び MV-L5) が非常に効率よく麻疹ウイルスの増殖を抑制することがわかった (図 8)。

また、siRNA を発現する pcPUR+U6i 由来発現プラスミドのうち 3 種類 (MV-L2、MV-L4 及び MV-L5) がいずれも、麻疹ウイルス増殖を著しく抑制した (図 9)。

さらに、siRNA (MV-L2、MV-L4

あるいは MV-L5) 発現遺伝子組換えアデノウイルスも、多重感染効率 (m.o.i) 依存性に、麻疹ウイルスの増殖を効率よく抑制した (図 10)。

b) siRNA による SSPE ウイルス増殖の抑制：

合成 MV-L2 siRNA は SSPE ウイルスの細胞内増殖と細胞間伝播を著しく抑制した (図 11A)。同様に、pcPUR+U6i 発現プラスミド由来 MV-L2 siRNA も SSPE ウイルスの増殖を顕著に抑制した (図 11B)。

また、3 種類の siRNA (MV-L2、MV-L4 及び MV-L5) を個別に発現する遺伝子組換えアデノウイルスは、m.o.i 依存性に、SSPE-Kobe-1 株の増殖を抑制した (図 12)。麻疹ウイルスの場合と同様に、siRNA 発現組換えアデノウイルスを SSPE ウイルス継代前に接種しておくほうがより効果的であった。

麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの L タンパク質は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼで、ウイルス RNA 合成に不可欠であり、しかも全ての麻疹ウイルスタンパク質の中で最も発現量が少ない。従って、L タンパク質をコードする L mRNA は、SSPE ウイルス増殖抑制のための RNAi 戦略において格好の標的である。また、これらの siRNA の細胞障害性はほとんど認められないことも確認している。この siRNA を用いた治療法は SSPE に対する新規治療法の有力候補の一つと考えられる。今後、siRNA を中枢神経細胞により効率よく導入する drug delivery 法の確立や動物実験系での安全性と有効性の検討を行うとともに、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する予定である。

4. 評価

1) 達成度について

① SSPE ウイルス新鮮分離株の性状と遺伝子解析

SSPE ウイルスの2つの主要な特徴である感染性遊離ウイルス非産生性と神経病原性のうち、前者を規定する因子として、Mタンパク質とFタンパク質の特定の変異を同定したことにより、当初の目的の一つは概ね達成したといえる。神経病原性については、Hタンパク質のC末端の特定の変異に的を絞り、遺伝子組換え麻疹ウイルスを作製中である。これまでMタンパク質やFタンパク質の性状の詳細な解析をもあわせて実施してきたことを考慮すると、研究計画の達成度は十分と判断する。

② SSPE ウイルス増殖抑制法の開発の検討

SSPE ウイルスの増殖を顕著に抑制する合成 siRNA の開発、及び効果的なプラスミドによる発現系ならびに siRNA 発現組換えアデノウイルスを作製した。現時点では培養細胞を用いた実験系による検討のみであるが、達成度は十分であると判断する。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

① SSPE ウイルス新鮮分離株の性状と遺伝子解析

SSPE ウイルスに特有の性状を規定する遺伝子変異を同定できたことは、学術的意義が大きい。

② SSPE ウイルス増殖抑制法の開発の検討

培養細胞系ではあるが、siRNA による SSPE ウイルス増殖抑制法を開発できたことは、極めて予後不良で現在有効な治療法がない SSPE に対する新規の治療戦略の開発につながる可能性があり、社会的意義は大きい。

3) 今後の展望

① SSPE ウイルス新鮮分離株の性状と遺伝

子解析

Hタンパク質C末端の特定の変異を導入した遺伝子組換え麻疹ウイルスを作製し、幼若ハムスター(または幼若マウス)を用いて神経病原性の検討を行う。これにより、神経病原性を規定する遺伝子変異を同定できる可能性が大きい。

② SSPE ウイルス増殖抑制法の開発の検討

siRNA による SSPE ウイルス増殖抑制法を動物実験系にも応用してその安全性と有用性を確立し、新規の SSPE 治療戦略の開発につなげる。

4) 研究内容の効率性について

① SSPE ウイルス新鮮分離株の性状と遺伝子解析

② SSPE ウイルス増殖抑制法の開発の検討

上記①、②いずれも、予算規模を考慮して、効率性は十分であると判断する。

5. 結論

① SSPE ウイルス新鮮分離株の性状と遺伝子解析

麻疹ウイルス野生株のMタンパク質に特定の単一点変異を導入すると、SSPE ウイルスと類似の可溶性及び細胞内局在の変化を示し、感染性ウイルス粒子産生能も著しく低下した。さらにFタンパク質のC末端領域フレームシフト変異を導入すると、感染性ウイルス粒子産生能がほぼ完全に消失した。これらの結果より、上記のMタンパク質及びFタンパク質の変異は、SSPE ウイルスに特徴的な性状変化の一つを規定していると考えられた。

② SSPE ウイルス増殖抑制法の開発の検討

SSPE ウイルスの増殖を顕著に抑制する合成 siRNA とその発現プラスミド及び siRNA 発現遺伝子組換えアデノウイルスを開発した。これらの siRNA は、現在有効な治療法がなく極めて予後不良の疾患である SSPE に対する新規の治療法の一つとなり得ると考えられる。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：5件

原著論文による発表：0件

それ以外(レビュー等)の発表：1件

そのうち主なもの

論文発表(レビュー等)

1. 堀田 博, 姜 大鵬, 長野基子. 原因ウイルスと発症機構. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 日本臨床 2007 ; 65(8) : 1475-1480.

学会発表

1. 大瀧桃子, 長野基子, 角矢博保, 加藤誠一, 野村有紀, 定 清直, 堀田 博. siRNA による SSPE ウイルス増殖抑制法開発の基礎的検討. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2005.11.20
2. 加藤誠一, 長野基子, 大瀧桃子, 扇本真治, 定清 直, 堀田 博. 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)発症後早期に分離された SSPE ウイルスのゲノム構造とウイルス性状の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2005.11.21.
3. 大瀧桃子, 長野基子, 角矢博保, 加藤誠一, 瀧川有紀, 定 清直, 堀田 博. siRNA による麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの増殖抑制. 第 58 回日本細菌学会関西支部総会, 神戸, 2005.10.29
4. 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
5. 姜 大鵬, 長野基子, 堀田 博. SSPE ウイルス M 蛋白のアミノ酸変異による M 蛋白の可溶性と細胞内局在及び遊離ウイルス粒子産生への影響の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007.10.22

2) 海外

口頭発表：0件

原著論文による発表：4件

それ以外(レビュー等)の発表：0件

そのうち主なもの

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.
4. Otaki M, Jiang D-P, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Hotta H. Generation of Recombinant Adenovirus Expressing siRNA against the L mRNA of Measles Virus and Subacute Sclerosing Panencephalitis Virus. Microbiol Immunol. 2007 ; 51(10) : 985-991.

学会発表

特になし

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

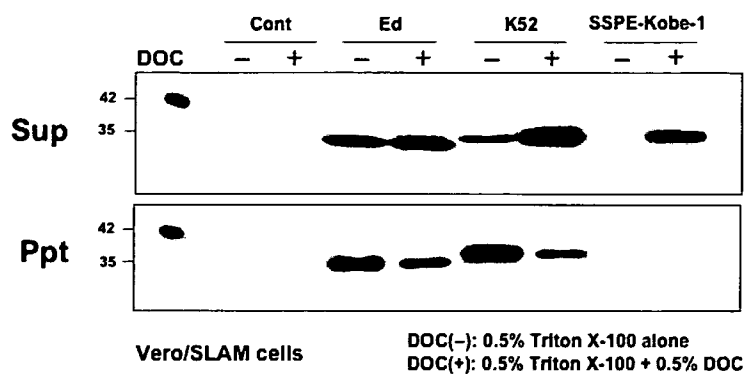


図1 麻疹ウイルス/SSPEウイルスのMタンパク質の可溶性の解析

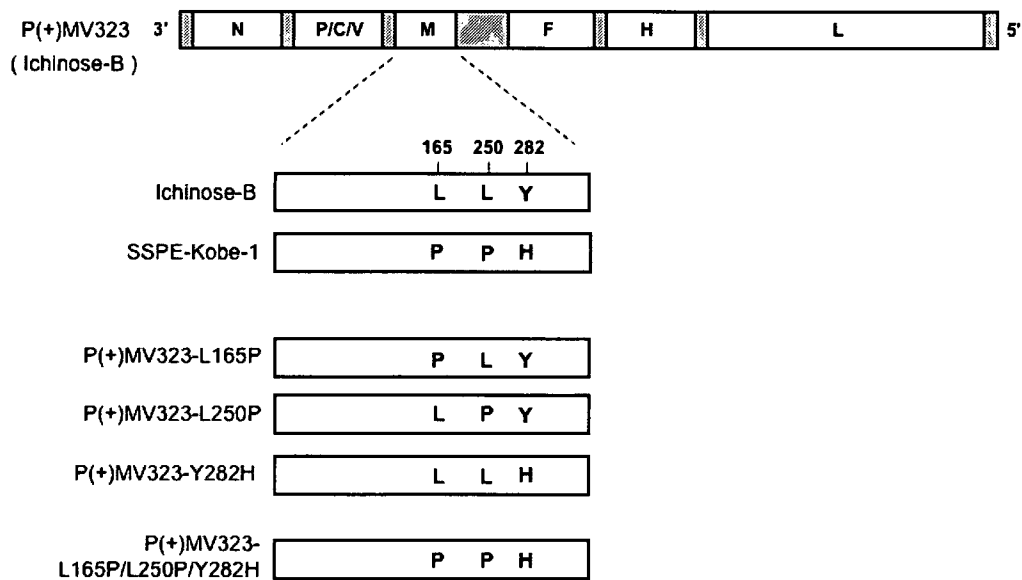


図2 Mタンパク質変異遺伝子組換え麻疹ウイルスの作製

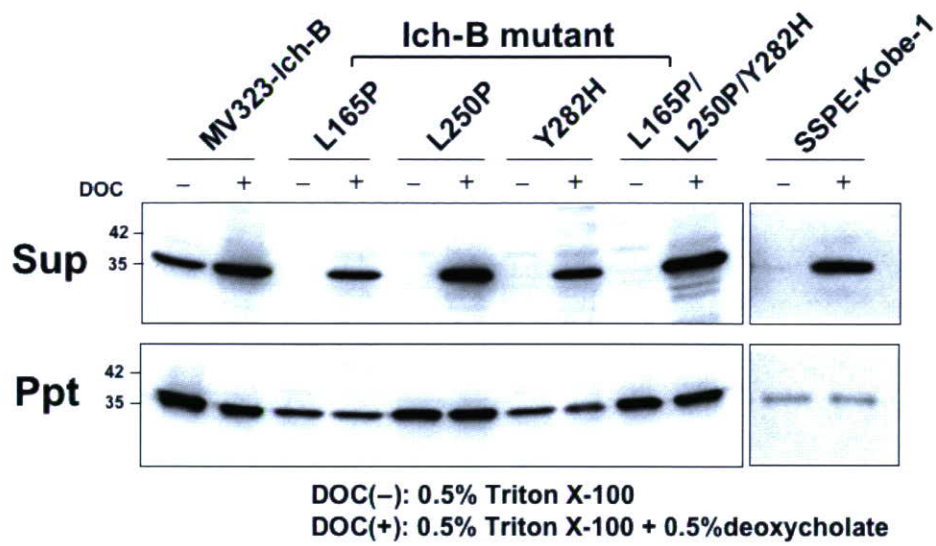


図3 Mタンパク質の可溶性

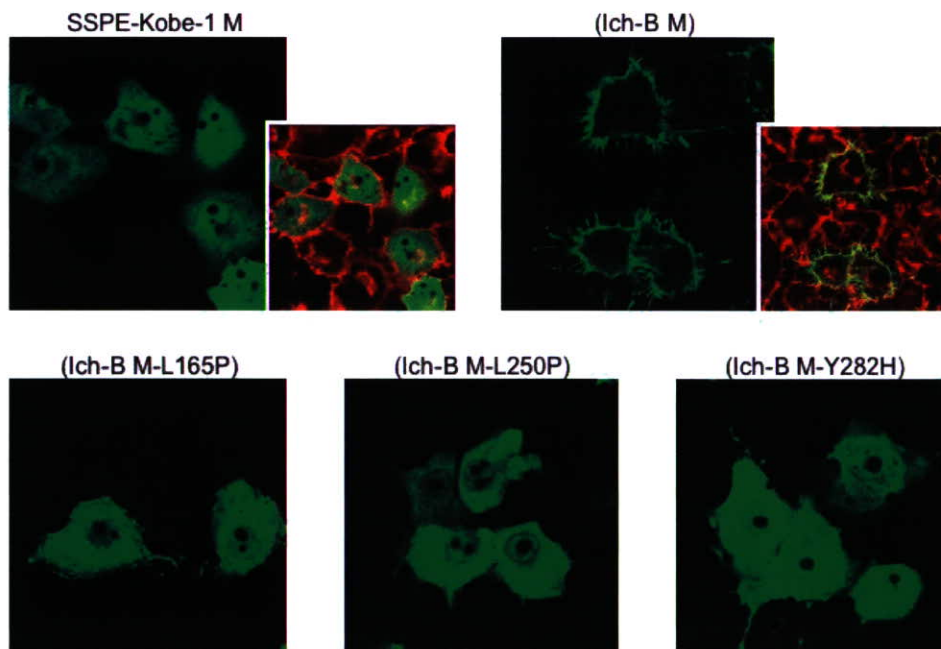


図4 Mタンパク質の細胞内局在

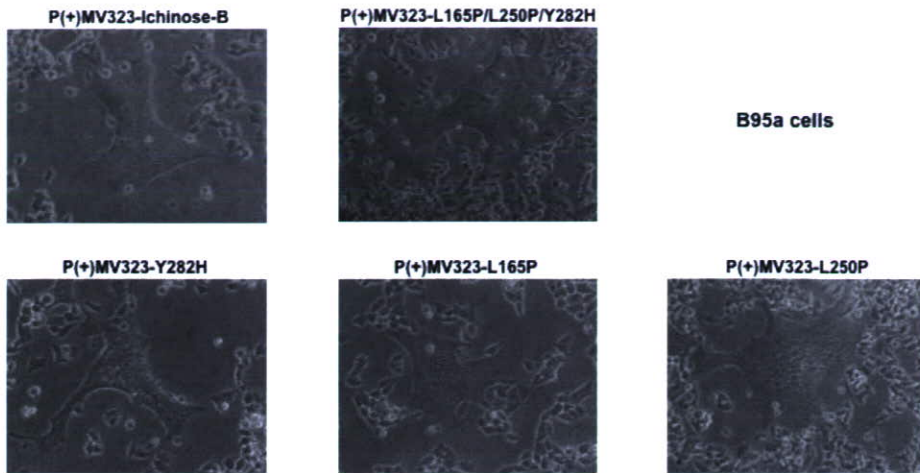


図5 遺伝子組換え麻疹ウイルスによる融合巨細胞の形成

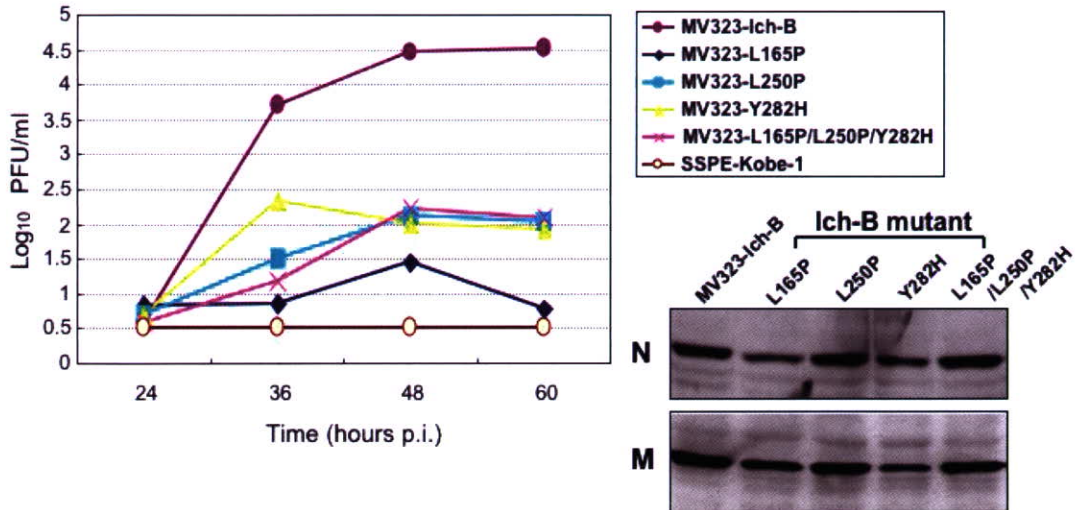
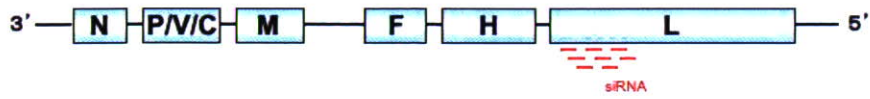


図6 Mタンパク質変異組換え麻疹ウイルスの感染性遊離ウイルス産生能



siRNA sequence

L1	5'-guu cac cua gau agc ccg aua TT-3'
L2	5'-gaa cau caa gca ccg ccu aaa TT-3'
L3	5'-gcu uag gag uua ucc ggc uua TT-3'
L4	5'-gga aga ucc gug agc ucc uaa TT-3'
L5	5'-gga cau caa gga gaa aau uau TT-3'
L6	5'-gga gga gac aca cac cug uau TT-3'
L31	5'-guc caa gcu uag gag uua ucc TT-3'
L32	5'-uca gga uuu auu uaa cau aca TT-3'

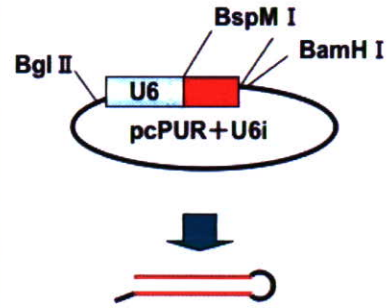


図7 麻疹ウイルス/SSPEウイルスの遺伝子構造とsiRNA配列

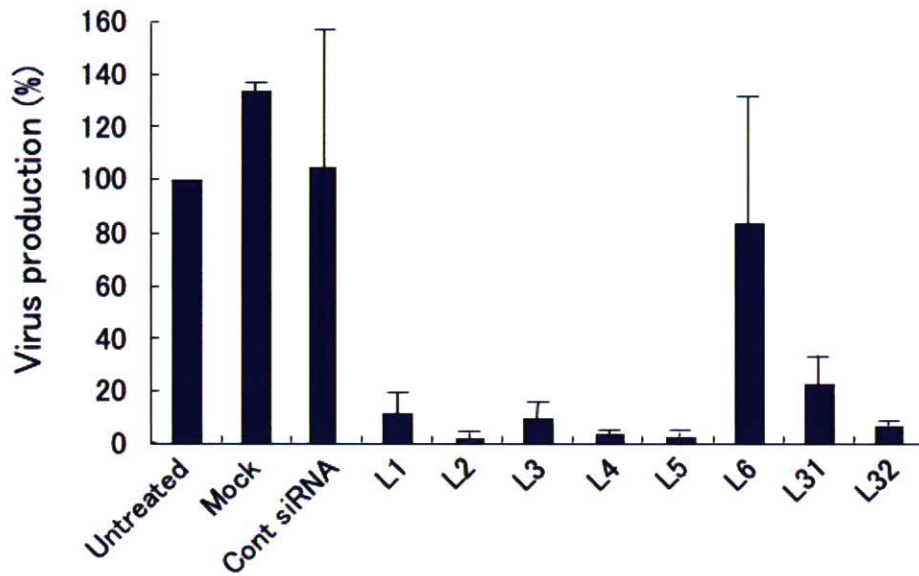


図8 合成siRNAの麻疹ウイルスK52株(D3)増殖抑制効果

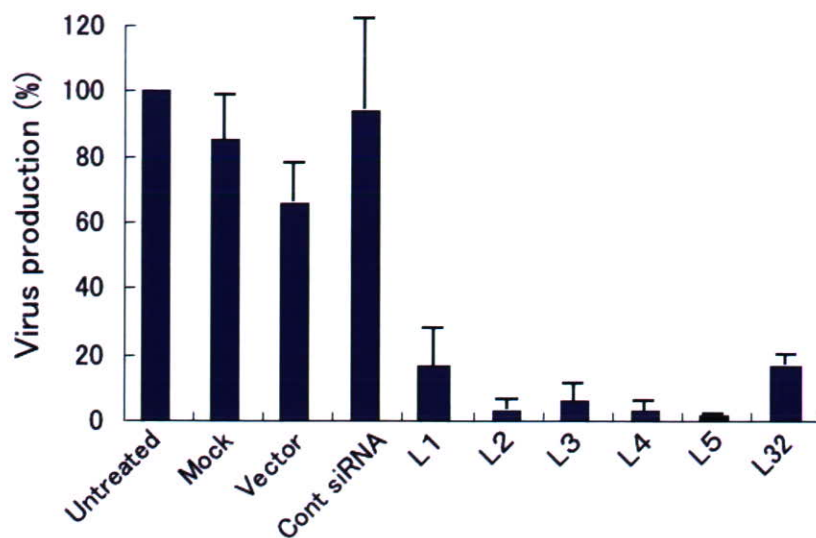


図9 pcPUR由来siRNAの麻疹ウイルスK52株(D3)増殖抑制効果

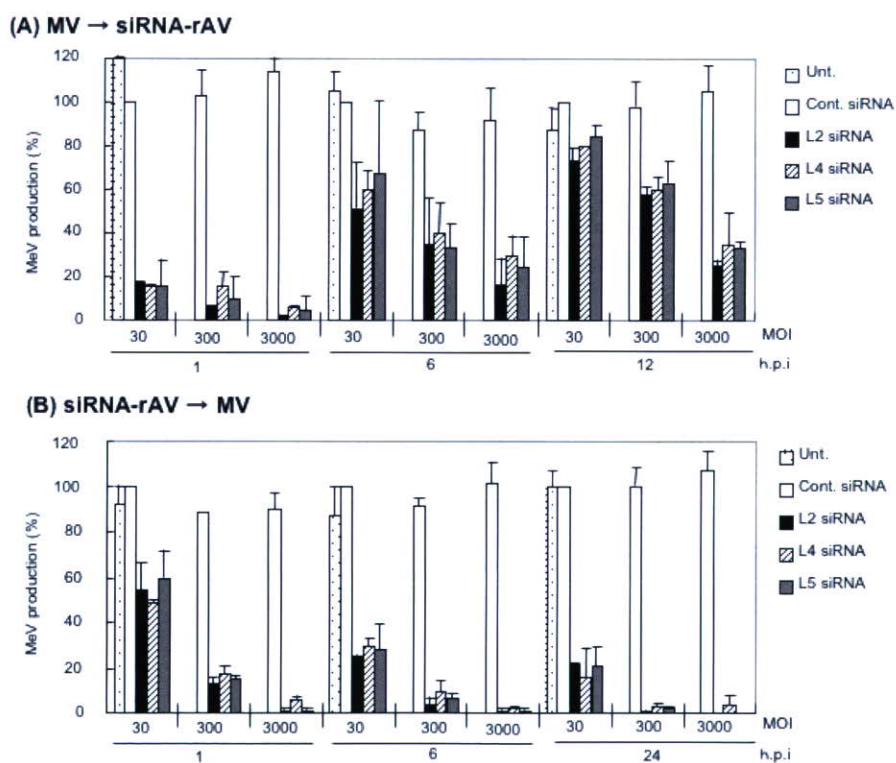


図10 siRNA発現組換えアデノウイルスの麻疹ウイルスK52株(D3)増殖抑制効果

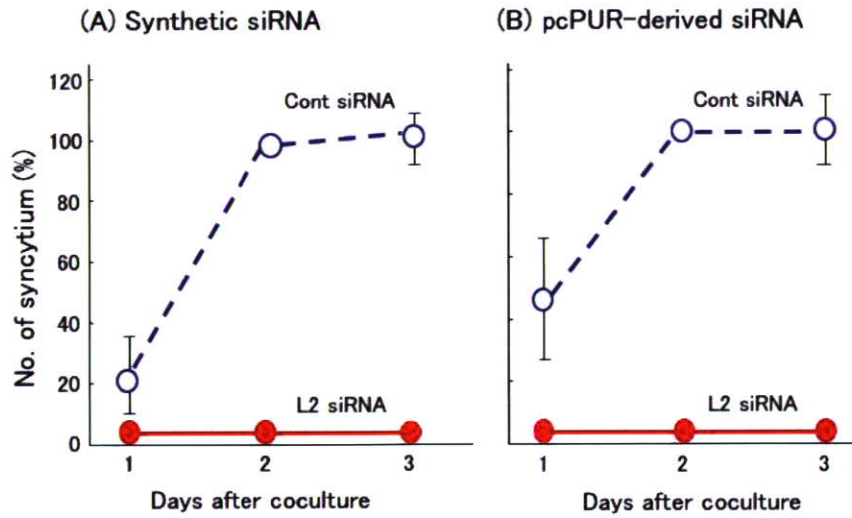
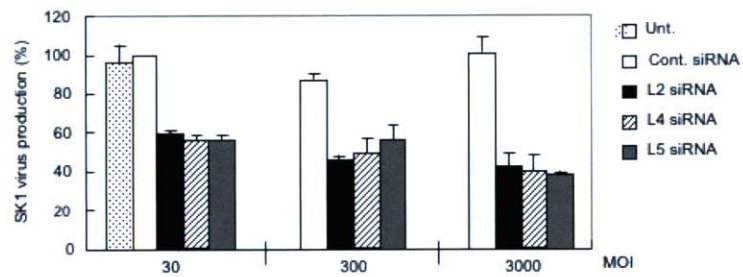


図11 合成siRNA及びpcPUR由来siRNAのSSPEウイルス増殖抑制効果

(A) Coculture → siRNA-rAV



(B) siRNA-rAV → Coculture

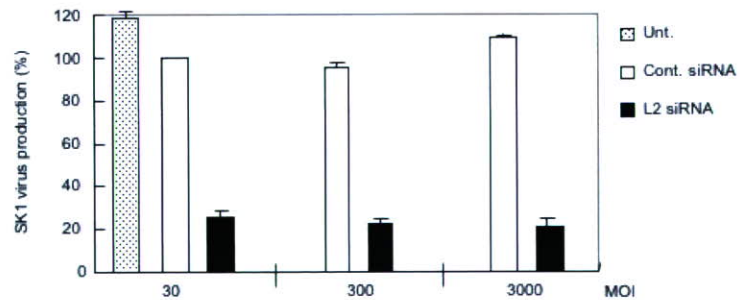
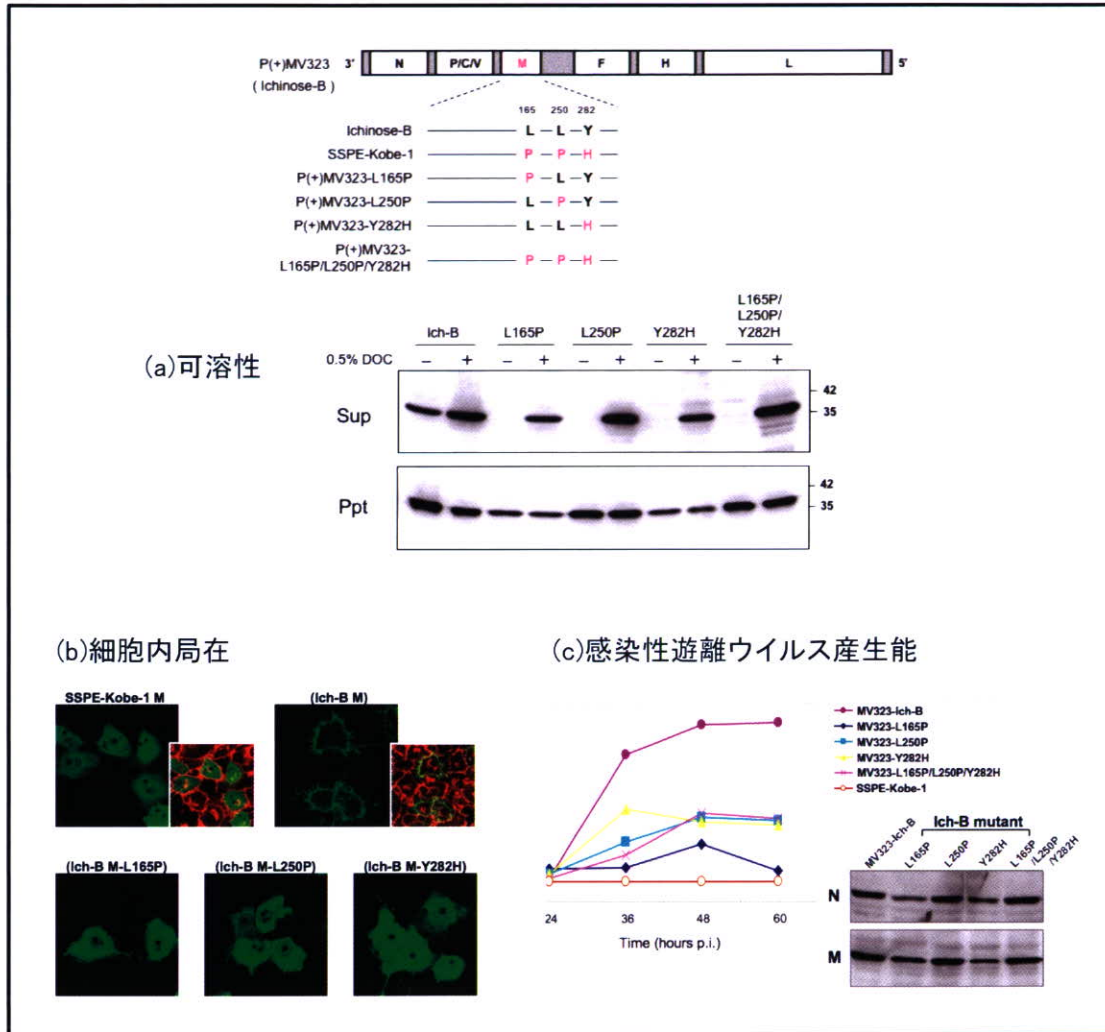


図12 siRNA発現組換えアデノウイルスのSSPEウイルス増殖抑制効果

① SSPEウイルスのMタンパク質の可溶性、細胞内局在及び感染性遊離ウイルス粒子産生能を規定する変異の同定

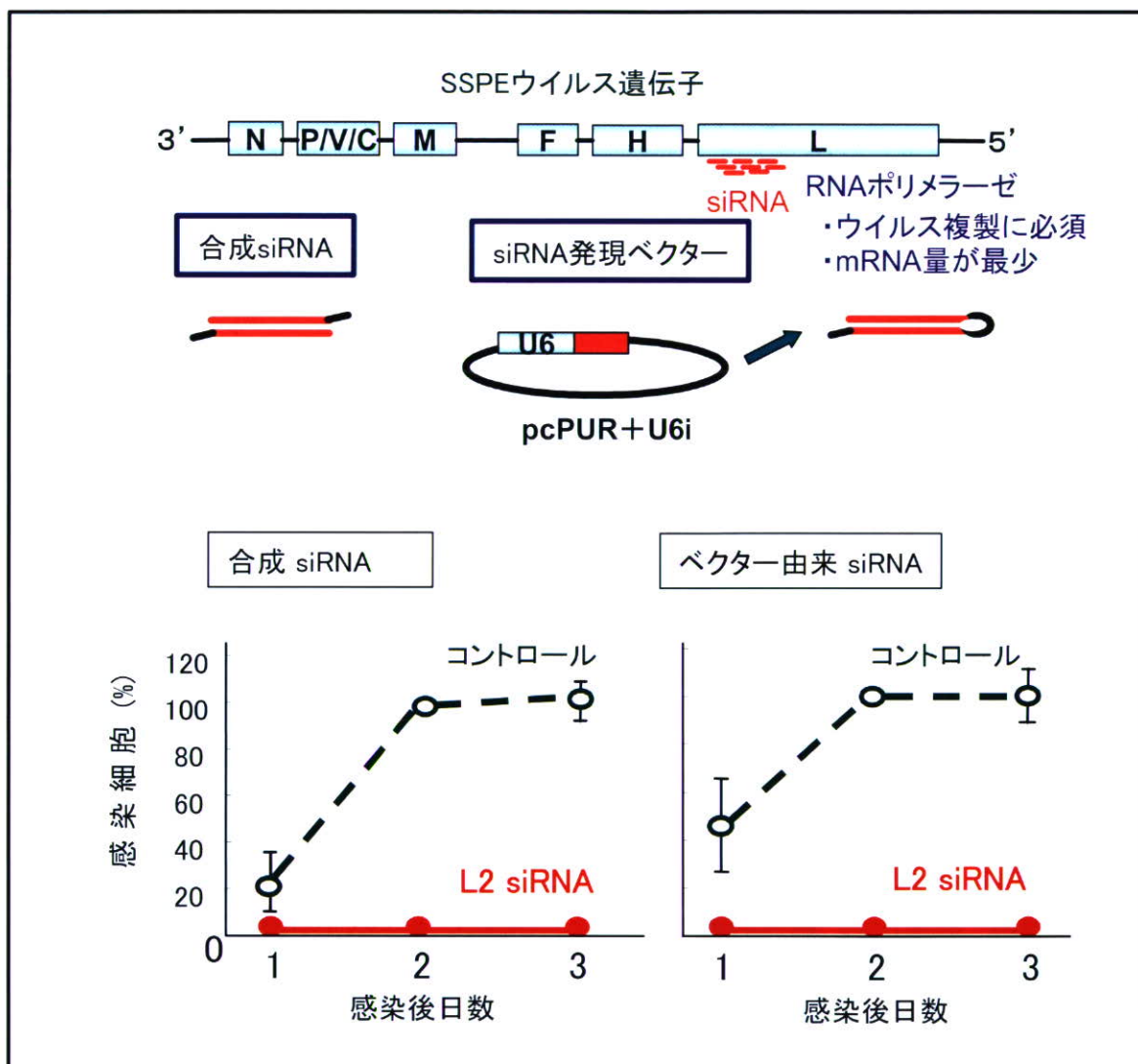
分担研究者: 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・堀田博



SSPEウイルスのMタンパク質の特定の amino 酸点変異は、Mタンパク質の(a)可溶性と(b)細胞内局在を変化させ、(c)感染性遊離ウイルス産生能を著しく低下させる。これらMタンパク質の変異はSSPEウイルスの特徴的な性状の変化に直接関与している。

② siRNAによるSSPEウイルスの増殖抑制

分担研究者：神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・堀田博



SSPEウイルスのL mRNAを標的とした合成siRNA及びその発現プラスミドは、効果的かつ特異的に同ウイルスの増殖を抑制する。今回我々が開発したsiRNAは、現在有効な治療法のない致死性疾患であるSSPEに対する新規の治療法の一つになり得ると考えられる。

分担研究者：網 康至 国立感染症研究所 動物管理室

1. 研究目的

麻疹ウイルスの脳内における持続感染が SSPE 発症要因のひとつであると考えられている。末梢から脳内へのウイルス伝播には、cell to cell の感染が主体であると考えられ、脳内へのウイルス伝播が感染細胞の脳内移行によるものとするれば、通常ではその機会が少なく、ウイルスの持続感染がまれにしか起らない要因であると考えられる。脳内に感染細胞を接種することにより、脳内標的細胞への感染機会を増加させた場合、持続的な感染が成立するか否かを検討することを目的とし、感受性動物であるカンクイザルを用いて実験を行ったところ、そのうち 1 頭において、脳内への持続感染が強く示唆される個体を得た。この個体について長期間の臨床観察を行い、SSPE 発症要因の解析を目的とする。

2. 研究方法

カンクイザル 5 頭に麻疹ウイルス HL-MoBr 3 株 10^5 TCID₅₀ を経鼻接種し、感染 7 日後に末梢血より分離した単核球 10^6 個を、同一個体の 3 頭の大脳視床に接種、2 頭には対照として培養液を接種し臨床症状の観察を行った。試験群の内 1 頭において、脳脊髄液中に麻疹ウイルス中和抗体価を認め、その個体について、継続して臨床観察を行うとともに、経時的に末梢血液、脳脊髄液を採材し、抗麻疹ウイルス中和抗体価の測定、末梢血単核球からウイルス分離、IgG 及びアルブミン量の測定 (IgG Index)、EIA 抗体価測定、ウェスタンブロッティング法による麻疹ウイルスタンパクに対する反応性の解析を行うと共に、末梢血リンパ球を麻疹ウイルス特異的に刺激し、CD8(+) 細胞における γ IFN 産生細胞率を

Flowcytometry で解析し、それを指標として特異的細胞性免疫の推移について観察を行った。(倫理面の配慮)

本実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

3. 研究結果及び考察

脳脊髄液中に麻疹ウイルス中和抗体価が認められた感染自己細胞を視床に接種した 1 頭のカンクイザルについては、他のサルが減少傾向を示すのに対して、血液中の中和抗体価が持続的に高値に維持された。感染後 105 週において、麻疹ウイルス特異的刺激に対する CD8(+) 細胞における γ IFN 産生細胞率は、他のサルに比べて高値を示し、持続的に抗原刺激を受けているものと考えられ、中枢神経内での麻疹ウイルス持続感染が強く示唆された。この間、この個体における脳脊髄液中の IgG は増加傾向を示したが、SSPE 患者で特徴的な IgG Index の上昇は認められず、また、この個体に特徴的な麻疹ウイルスに対する反応性も認められていない。また、SSPE に特徴的な臨床症状であるミオクローヌスも観察されていない。

現在、血清中中和抗体価は、低下することなく持続的に高値を示しているが、麻疹ウイルス特異的刺激に対する CD8(+) 細胞における γ IFN 産生細胞率については減少傾向にあり、感染 205 週では、対照群のサルとほぼ同じ値を示し、感染約 250 週では有意な産生細胞はいずれの個体においても認められなくなった。

持続感染の直接的証明がなされていないが、高い血清中和抗体価、脳脊髄液中に認められる麻疹ウイルス中和抗体などから、麻疹ウイ

ルスの持続感染成立を強く示唆するものと考えられる。このことは、中枢神経内における麻疹ウイルスの持続感染には、発症時になんらかの原因により感染細胞が脳血液関門を通過し中枢神経に感染を成立させることが要因の一つであることを意味する。通常 SSPE の発症は、疫学的調査から麻疹罹患から平均 6 年とされており、現在約 5 年を経過しているこの個体については、今後、SSPE 発症の有無についてさらに観察をつづける必要があるものと考えられる。また、SSPE 患者では、麻疹ウイルスに対する細胞性免疫能が低下しているとの報告があり、その意味で、CD8 (+)細胞における γ IFN 産生細胞率の低下と消失は興味深い結果である。

4. 評価

1) 達成度について

カニクイザルにおいて麻疹ウイルスの中枢神経における持続感染が強く示唆される個体を作成できた事は、研究の方向性が意味のあるものであると考えられる。SSPE の発症までの臨床経過を考えると、持続感染と SSPE の関係については、なおその解析に時間を要するが、発症までの臨床検査結果は、発症前の臨床データであると想定すると、これについても早期診断法の開発にとって意義があると考えられる。しかし、早期に再現性試験を行う必要性があると考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

病原性麻疹ウイルスを用いた、サル類における中枢神経への麻疹ウイルス持続感染モデルはなく、新規性があると考えられる。また、霊長類を用いた SSPE モデル動物は、その性状から考えて、現在すすめられている新規治療方法や、早期診断法の検討、発症要因の解析に重要な役割を果たすものと考えられる。

3) 今後の展望

早期の再現性試験の実施、ウイルス持続感

染の直接的証明を行い、モデル作出の効率化を行うことが重要と考えられる。

4) 研究内容の効率性について

実験動物として霊長類を用いるため、新たな計画には実証を踏まえることがもとめられ、かつ、遅発性ウイルス感染であることを考慮すると、現在のところ、これ以上の効率化が図れないのが実状と考えられる。

5. 結論

麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、感染自己単核細胞を同一個体の視床に接種したカニクイザル 2 頭のうちの 1 頭は、約 5 年間、持続的に脳脊髄液中にウイルス中和抗体を検出し、持続的な血清中の高中和抗体価の維持し、中枢神経内における麻疹ウイルスの持続感染の可能性を示唆する。特異的細胞性免疫は、認められなくなり報告されている SSPE 患者の免疫学的状態と類似し、発症の可能性を示唆する。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：0 件

原著論文による発表：0 件

それ以外(レビュー等)の発表：1 件

そのうち主なもの

論文発表

1. 網 康至. SSPE モデル動物開発の試み
日本臨床. 2007 65 : 1506-12.

2) 海外

口頭発表：0 件

原著論文による発表：3 件

それ以外(レビュー等)の発表：0 件

そのうち主なもの

論文発表

1. Sato H, Kobune F, Ami Y, Yoneda M, Kai C. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys.