

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

平成17～19年度 総合研究報告書

平成20年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

難治性疾患克服研究事業
「特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究」班
班員名簿（平成17-19年度）

佐多徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部長
生田 和良	大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野	教授
近藤 一博	東京慈恵会医科大学医学部・微生物学講座第一	教授
山谷 睦雄	東北大学病院・老年科	准教授
中島 淳	横浜市立大学医学部・分子消化管内科	准教授
荒川 宜親	国立感染症研究所・細菌第二部	部長
結城 伸泰	独協医科大学・神経内科学	准教授
渡邊 浩	久留米大学医学部・感染医学講座	教授
川端 寛樹	国立感染症研究所・細菌第二部	室長
鈴木 和男	千葉大学大学院医学研究院・発生医学講座	特任教授
宮崎 義継	国立感染症研究所・生物活性物質部	部長
渋谷 和俊	東邦大学医学部附属大森病院・病理学講座	教授
岸本 壽男	国立感染症研究所・ウイルス第一部	室長

目 次

I. 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究班

総合研究報告書（平成 17-19 年度） 1

主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所 感染病理部）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 7

I. 総合研究報告書

総合研究報告書

主任研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部 部長

研究要旨 特定疾患を引き起こす病原体および発症機序を明らかにすることにより、発症の予防あるいは効果的な治療法の開発に結び付けることを目的として研究を行った。主な成果として、ヒトヘルペスウイルス 6 潜伏感染とクローン病、鬱症状との関連を明らかにしたこと、ボルナ病ウイルス感染による神経変性機序を解明したこと、100 種類以上のウイルスを網羅的に検出する定量的 PCR を開発したこと、真菌感染による原発性肺高血圧症あるいは難治性血管炎の動物モデルを作成したことなどがあげられる。さらに慢性肺気腫あるいは呼吸不全、自己免疫性肝炎、マイコプラズマと特定疾患、ギラン・バレー症候群、不明神経疾患と微生物感染の関連につき検討を行い、いくつかの重要な知見が得られた。

分担研究者：

生田和良 大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野教授
近藤一博 東京慈恵会医科大学医学部微生物講座第一教授
山谷睦雄 東北大学病院老年科准教授
中島 淳 横浜市立大学医学部消化器内科准教授
荒川宜親 国立感染症研究所細菌第二部部長
渡邊 浩 久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門教授
川端寛樹 国立感染症研究所細菌第一部室長
渋谷和俊 東邦大学医学部付属大森病院病理学講座教授
岸本壽男 国立感染症研究所ウイルス第一部室長
宮崎義継 平成 19 年度、国立感染症研究所生物活性物質部 部長
鈴木和男 平成 17-18 年度、国立感染症研究所生物活性物質部 部長
結城伸泰 平成 17-18 年度、独協医科大学神経内科学 准教授

ない。特定疾患の原因としてウイルスや細菌のような微生物、あるいはそれら微生物の産物が引き金となり自己免疫疾患が惹起されることや、微生物の潜伏・持続感染、再活性化により疾患が誘発される可能性が考えられる。また、既知の微生物以外にもこれまで同定されていない、未知の病原体が関与する可能性もある。当研究班では臨床研究班と密接に連携をとり、特定疾患を引き起こす病原体を同定し、その発症機序を明らかにすることで、発症の予防あるいは効果的な治療法の開発に結び付けることを目的としてきた。研究課題は特定疾患とウイルスの関与（佐多）、神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染（生田）、神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明（近藤）、慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染（山谷）、自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与（中島）、マイコプラズマと IgA 腎症、慢性呼吸器疾患など難治性特定疾患との関連性（荒川）、難治性気道感染症における細菌感染（渡辺）、ライム病ボレリアと不明神経疾患（川端）、難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子（鈴木、宮崎）、真菌感染と特定疾患（渋谷）、クラミジア・リケッチアと特定疾患の関連（岸本）、ギラン・バレー症候群の発症に関わるカンピロバクター遺伝子（結城）であり、研究課題ごとに検

A. 研究目的

特定疾患（いわゆる“難病”）と定義される疾患の大部分は原因不明であり、原因療法ができ

討を行った。

B. 研究方法

それぞれの研究目的に応じ、臨床検体を用いた研究、実験動物を用いた試験管外実験、および培養細胞等を用いた試験管内実験を行った。詳細は各年度の分担研究報告書を参照。

(倫理面への配慮)

臨床検体を扱う場合は、患者からインフォームドコンセントが得られ、また、採取施設、研究施設の研究倫理委員会の承認を得た上で行われた。検体収集、実験実施などについては研究倫理委員会で承認されたプロトコールに基づいて行われた。臨床検体を用いた場合は研究の過程において患者個人の特定ができないよう取扱い、実験結果は公刊するが個人が識別される情報は一切公表しないよう配慮した。動物実験においては各施設の動物実験委員会の、組換え DNA 実験は同様に各施設の組換え DNA 委員会の承認を得てから行った。また、微生物の感染実験については各施設で定めるバイオセーフティーに関する規則に従って行われた。

C. 研究結果

特定疾患とウイルスの関与： duplex real time PCR を使用し、96 ウェルプレート上で約 100 種類のウイルスを同時検出する、簡便で高感度なウイルス網羅的定量的 PCR を開発した。小児劇症肝炎例 9 例につきウイルスを網羅的に検索したが原因ウイルスといえるものは同定されなかった。ウイルス網羅的定量的 PCR は特定疾患などの原因不明疾患の原因ウイルス解明に有力なツールになるものと期待される。また、小児劇症肝炎は未知のウイルスかウイルス以外の要因が関与していることが示唆された。(佐多)

神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染： ボルナ病ウイルス(BDV)持続感染ラット脳におけるアストロサイト特異的蛋白質 S100B の発現低下がおこること、ストレス負荷により神経細胞死が誘導されることを明らかにした。また、BDV P 発現トランスジェニックマウス (P-Tg) を作成し、小脳におけるプルキンエ細胞の脱落、グルタミン酸トランスポーターGLAST と神経栄養因子 GDNF の発現低下、大脳皮質におけ

る DAAO の発現低下を観察した。BDV 持続感染グリア細胞において、D 型アミノ酸酸化酵素 (DAAO) の発現亢進を認めた。BDV P 蛋白質と相同性を有するガブーンバイパー毒腺由来の cDNA (BGHP3) を同定し、BDV P と BGHP3 間で保存されているアミノ酸配列から、ボルナ様ウイルスを広く検出できる degenerative PCR プライマーを設計した。また、ヒトゲノム内に BDV N 抗原に類似する内在性遺伝子を発見した。(生田)

神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明： ヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6)の新たな潜伏感染特異的遺伝子とこれにコードされる蛋白質を同定した。この遺伝子および蛋白質は、HHV-6 が潜伏感染から再活性化へ移行する中間段階で特に発現するもので、ストレス・疲労などの刺激によって発現が促進された。この性質は、クローン病やうつ病がストレス・疲労で発症・増悪するという性質と良く一致していた。また、この潜伏感染特異的蛋白質に対する抗体が、クローン病患者とうつ症状を呈する患者で特異的に検出されることを見いだした。このことから、HHV-6 潜伏感染蛋白質がクローン病の重症化や、合併症としてのうつ症状の発症に関与することが示唆された。さらに、この潜伏感染特異的蛋白質が、クローン病の病変部位と、精神症状を呈した HHV-6 脳炎患者の脳組織で発現していることを見いだした。この潜伏感染遺伝子を脳内グリア細胞で発現させたマウスは、躁うつ病様の行動異常を呈した。これは、この遺伝子がうつ病や躁鬱病などの感情障害の原因遺伝子となり得ることを示した。(近藤)

慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染：

1) ライノウイルス、RSウイルス、A 香港型インフルエンザウイルス感染に対する呼吸不全治療薬の $\beta 2$ 刺激薬、去痰薬の L-カルボシステイン(CC)、マクロライドの感染抑制効果と炎症惹起物質(IL-1, IL-8 等)放出抑制効果を明らかにした。

2) 吸入ステロイド、プロトンポンプ阻害薬、去痰薬 L-カルボシステインの肺気腫増悪 (=呼吸不全) および風邪抑制効果 (プロトンポンプ阻害薬、L-カルボシステイン) を明らかにした。臨床で使用される医薬品のウイルス感染抑制効果を細胞研究で証明し、臨床効果も明ら

かにした。(山谷)

自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与: 自己免疫性肝炎の発症に関するウイルスの関与を近年急速に進歩してきた遺伝子発現の網羅的解析により同定することを行ってきたが、現段階では自己免疫性肝炎に特異的に発現している遺伝子は、いくつかの候補は上がったものの特定するにはいたっていない。2006年春に発表された新しい肝炎の原因と思われるNV-Fも自己免疫性肝炎や原発性胆汁性肝硬変などとも関与は認められなかった。さらに網羅的手法にてウイルスの関与を検討するために、multiplex multivirus real time PCRを用いて自己免疫性肝炎や原発性胆汁性肝硬変に関与すると思われるウイルス感染の有無を検討したが発症に関与するウイルスの同定には至っていない。更なる発症初期の患者組織のサンプルが必要であるが現段階では、原因微生物の同定は達成されておらず検索中である。しかし最適な方法の検討は整理されつつあると思われる(中島)

マイコプラズマとIgA腎症、慢性呼吸器疾患など難治性特定疾患との関連性: マイコプラズマ感染者における抗リン脂質抗体価を測定したところ、健常人との比較において、*M. pneumoniae*感染者においては抗カルジオリピン抗体価の上昇ならびに抗フォスファチジルセリン抗体価の上昇が、また*M. hominis*感染者群においては抗フォスファチジルセリン抗体価の上昇が認められた。経後脚膝蓋関節腔内*M. fermentans*生菌投与ウサギ13羽中1羽において、滑膜上皮細胞の多層化、上皮直下への形質細胞浸潤、リンパ球集ぞくが病理学的に認められた。抗ガラクトース欠損IgG抗体の一過性上昇も認められた。(荒川)

難治性気道感染症における細菌感染:

1) Nontypeable *Haemophilus influenzae* と *H. influenzae* type b のバイオフィーム産生に関する比較研究—莢膜とバイオフィーム発現の関連。Microtiter biofilm assay, 走査型電子顕微鏡およびconfocal laser scanning microscopyによる観察で、多くの *H. influenzae* type b (Hib) は Nontypeable *Haemophilus influenzae* に比べバイオフィーム形成能は乏しく、Hibにおいては莢膜の脱落がバイオフィーム形成能に関与して

いる可能性が高いものと考えられた。

2) Nontypeable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィームに対する抗生物質の抑制効果に関する研究。 β -lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) 株では β -lactamase-negative ampicillin-susceptible (BLNAS) 株に比べ、低濃度の抗生物質の存在下でバイオフィームの産生が高まる傾向がみられた。ampicillin や cefaclor では薬剤の濃度を上げても BLNAS 株、BLNAR 株ともにバイオフィームの抑制効果はみられなかったが、erythromycin や levofloxacin では濃度依存性のバイオフィームの抑制効果が認められた。

3) Nontypeable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィームに対する抗生物質の効果に関する研究。Microtiter biofilm assay では BLNAR 株に対し、ampicillin, cefotaxime, erythromycin, clarithromycin では 10 MIC でもバイオフィームの抑制効果はみられなかったが、levofloxacin は 1 MIC 以上、gatifloxacin は 0.1 MIC 以上で抑制効果がみられた。continuous flow cell chamber を用いた検討ではバイオフィームの性状には抗生物質間の違いはみられなかったが、gatifloxacin は 1 MIC で優位な菌量の減少がみられ、10 MIC では菌の生育は認めなかった。LVFX, GFLX はバイオフィームの中に浸透し、バイオフィーム内の菌を殺菌する効果が高いことが示唆された。(渡辺)

ライム病ボレリアと不明神経疾患: ライム病抗体の検索において、偽陽性の除外が最大の課題であった。そこで、1) 組換え抗原による試験法で、2) OspC による偽陽性を除外出来る判定基準を採用し、かつ、3) 抗体検査上の特異性を考慮に入れた Point 制による判定法を採用し、国内多発性硬化症 (MS) 患者におけるライム病抗体陽性率を調査した。また、髄液中の病原体 DNA も検索した。この結果、(1) MS 患者群での抗ボレリア抗体陽性率は 11.1% であった。MS におけるライム病の関与が否定的である米国で行われた血清疫学調査結果(陽性率=6.7%)に近似する一方、ライム病による MS 発症が推定されている欧州での調査結果(陽性率=14.2-38.5%)より低値であった。(2) 本試験法により、ライム病患者群は MS 群および健常者群と有意の差が見られた。一方 MS 群と健常者

群での有意差は見られなかった。(3) ペア血清による IgG 抗体の変動は見られない。(4) 病原体 DNA は患者髄液から見出されなかった。

(川端)

難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子：

Candida albicans 由来 CAWS (*C. albicans* water-soluble mannan complex) が誘発する血管炎のモデルの再現性を確認し、血管炎が活性化好中球や好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) と関連することを以下の通り示した。

1) CAWS 投与初期の炎症誘導機構について、投与直後 10 分から、末梢血好中球数の増加、血漿中 complement3 の減少、IL-1 β 、IL-12、MIP-2、G-CSF、ICAM-1 の増加を認め、マウス心起始部大動脈では組織傷害のマーカーである ICAM-1 の遊離と mRNA 発現が増加していた。顕著な変動があった IL-12 の p40 を共有する IL-23 と、その作用の下流にあるとされる IL-17 の発現を *in vivo* で解析した結果、ANCA は早期に肺および腎糸球体に好中球とともに集積し、IL-23 と IL-17 レベルは増加した。

2) *In vitro* における CAWS 刺激による好中球機能解析では、活性酸素産生および myeloperoxidase (MPO) 放出能の充進、IL-6 産生を認めた。また、CAWS および MPO 抗体をマウスに投与すると IL-17、IL-23 が増加し、好中球は肺および腎糸球体に集積していた。*in vitro* における検討から、好中球が IL-17、IL-23 を産生していることが示唆された。

3) CAWS の生成条件による血管炎誘導能の違いとして、27 $^{\circ}$ C、pH5.2 の培養条件では激しい冠状動脈炎が誘導されたのに比し、27 $^{\circ}$ C、pH7 の培養では血管炎を誘導しなかった。DBA/2 マウス腹腔にこれらの CAWS を投与した場合、前者では生存率が低下したが、後者の CAWS では対照と同等の生存率を示した。上記の結果と、*C. albicans* 由来の血管炎誘導分子 CAWS が mannose-protein を主成分とすることから、CAWS の血管炎惹起活性の強度が *C. albicans* の mannan の構造によって制御されていることが示唆された。そこで、血管炎を惹起する特異的なマンナン構造を特定することを目的として、*C. albicans* の mannosyl-transferase

をコードすると予測される 14 の候補遺伝子を破壊した変異株を作成し 5 つの遺伝子変異株について検討した。破壊した native gene を増幅するプライマーにより増幅されない株をスクリーニングした。更に、異所性に遺伝子片が導入されていないことを確認し、一候補遺伝子あたり 4 株以上の破壊株をえた。それぞれの遺伝子を破壊した変異株を CA1995、CA3803、CA4394、CA5572、CA6692 とし親株を対照として使用した。CA4394 を破壊した株ではすべて、他の破壊株や親株と比較して菌糸の形成能が低下していた。それぞれの変異株由来 CAWS によるサイトカイン誘導能を、親株を比較対照とし、陽性対照には LPS を使用し検討した。急性感染相のサイトカインとして TNF- α と IL-6 を測定したが、J774 細胞とマウス腹腔マクロファージにおける誘導能は、親株と有意な差は認められなかった。(平成 17-18 年度 鈴木、平成 19 年度 宮崎)

真菌感染と特定疾患：

1) ヒトの居住環境内に存在する真菌である *Stachybotrys chartarum* の分生子をマウスに経気管的に反復投与することで、高い再現性をもってヒト原発性肺高血圧症に極めて類似した肺動脈病変を作成し得た。

2) 単回投与でもマウスに頻度は低いながら肺動脈病変が形成された。

3) 本モデルの肺動脈の変化は、中・内膜の対称性細胞線維性肥厚であり、肺全体にびまん性に分布し、末梢より中枢に向かって拡大する傾向を示す。

4) 本モデルでは、右心室の拡大および肺動脈圧の上昇を確認し得た。

5) *Stachybotrys chartarum* の中でも trichothecene 産生株の分生子接種により、高度の肺動脈病変を形成することから、本モデルにおける肺動脈の変化に真菌由来の生物活性物質の関与が示唆された。

6) *Stachybotrys chartarum* 有する肺動脈病変誘発活性には、メタノールにより除去または不活性化などの影響を受ける物質が関与している可能性が示唆された。

7) 環境内に多く存在する *Cladosporium* 属および *Penicillium* 属の真菌をマウスに反復投与したところ、同様の実験条件では、両菌種とも

マウスに肺動脈病変形成を惹起しなかった。
8) これまでに分担研究者の施設で家族の同意を得て剖検・保存されたヒト特発性肺高血圧症例の肺組織を用いて真菌関連遺伝子の検索を行い、本疾患と居住環境内真菌との関係を調査する予定である。(渋谷)

クラミジア・リケッチアと特定疾患：

1) 眼の悪性リンパ腫 (orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma :MALToma) からオウム病クラミジア遺伝子の検出と抗体価の調査をしたが、すべて陰性で、関連を示唆する結果は認められなかった。

2) 慢性疲労症候群(CFS)、ならびに CFS 類似疾患患者からの Q 熱コクシエラの検出と血清抗体を約 80 例で検討したが、すべて陰性で、関連を示唆する結果は認められなかった。

3) 国内多発性硬化症(MS)症例において、血清疫学的に、また髄液中の病原体検出結果から、肺炎クラミジア急性感染や初感染が MS の増悪因子になる可能性については否定できないが、肺炎クラミジア感染と MS 発症の因果関係を示唆する結果は得られなかった。(岸本)

ギラン・バレー症候群の発症に関わるカンピロバクター遺伝子：

ギラン・バレー症候群 (GBS) 株の 68%がクラス A で、腸炎株 (103 株中 17%) と比べ有意に高頻度であった。クラス A 遺伝子座には GM1/GD1a 様 LOS 合成に必要な糖転移酵素がすべて含まれ、クラス A 株の多くは GM1 様 LOS (79%) や GD1a 様 LOS (76%) を有し、クラス A 株が分離された患者血中には抗 GM1/GD1a 抗体が高頻度に検出された。ロジスティック回帰分析でも、HS:19 型とクラス A 遺伝子座が GBS 発症の危険因子であることが確認された。GBS の各臨床亜型から分離された株の多くは、血清型 HS:2/HS:4-complex で、クラス A/B LOS 合成酵素遺伝子座と *cst-II* (Asn51) を有していた。抗体プローブ法で LOS 上に GQ1b エピトープを検出した。質量分析で、ピッカースタッフ脳幹脳炎および急性外眼筋麻痺患者からの分離株に、GD1c 様 LOS を検出した。これら亜型症例において、分離菌株 LOS はそれぞれの患者血清 IgG と強い反応性を示したのに対し、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP) 症例においては、菌体 LOS と患者血中 IgG/IgM と

の反応性はみられなかった。(平成 17-18 年度、結城)

D. 考察

微生物にはその種類ごとに様々な感染様式が存在するが、おおまかには微生物が盛んに増殖する増殖感染と、感染したのちに微生物はほとんど増殖せずに症状も起こさない、潜伏持続感染に分けられる。急性期の感染症の多くは微生物の増殖感染により誘導され、一般にいう感染症はこのタイプが多い。一方で微生物が潜伏持続感染した場合は症状が出るのが少なく、慢性化するか、無症状のままである。これまでの研究から、多くの特定疾患がウイルスや細菌、真菌の急性感染症である可能性は低く、微生物が関与する可能性としてはウイルスの潜伏持続感染が関与するか、あるいは微生物の産生するタンパクや毒素が間接的に疾患を引き起こす可能性が考えられる。当研究班では特定疾患にこうした微生物の直接、間接的な関与があるかどうかを検索してきたが、研究成果では微生物の潜伏持続感染と特定疾患の関与を示唆するデータが得られた。すなわち、神経、精神疾患と HHV-6 および BDV の感染の関与を指摘した研究である。HHV-6 はほとんどのヒトが感染している常在ウイルスであり、その潜伏感染と疾患との関連はこれまで明らかにされていない。HHV-6 の潜伏感染遺伝子、タンパクが同定されたことで、今後、様々な疾患との関連、特にクローン病、鬱症状との関連が明らかにされていくことに期待したい。BDV 感染による神経変性の関連が分子レベル、動物実験レベルで明らかになった点も意義は大きい。ヒトにおける BDV 感染の検索は十分とはいえないので、今後の成果を待ちたい。

慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染、難治性気道感染症とバイオフィルムの研究では臨床的な成果が得られており、現場での応用が期待される。とくに、 β 2 刺激薬、去痰薬の L-カルボシステインやマクロライドが呼吸器系のウイルス感染を抑制するとの研究成果は臨床、有用であると同時に、炎症惹起物質 (IL-1, IL-8 等) 放出抑制効果をその機序として報告されていることは科学的にも興味深い知

見である。

特定疾患とある特定の微生物感染を明快に否定することも当研究班が果たすべき重要な役割の一面である。ウイルスを網羅的に検出する定量的 PCR が開発されたことで、特定疾患の原因ウイルスが同定されることはもちろんのこと、一方で疾患と多くのウイルスとの関連性を否定することができる有力なツールとしても働くことが期待される。自己免疫性肝炎、劇症肝炎、MS などでは特定の微生物の関連を否定する結果が得られているが、こうしたデータを積み上げることも本研究の重要な成果である。

さらにはいくつかの動物モデルが作成されたことも今後の研究の発展が期待される成果である。HHV-6 や BDV のトランスジェニックマウスは神経変性疾患のモデルとして有用であろう。また、*Stachybotrys chartarum* が誘発する原発性肺高血圧症のマウスモデル、CAWS が誘発する難治性血管炎のマウスモデルはその発症機序を解明する上で有力なツールとなることが期待される。

E. 結論

特定疾患と微生物感染につき、HHV-6 潜伏感染とクローン病、鬱症状との関連が示唆されるデータを得たこと、BDV 感染による神経変性機序の解明を行ったこと、100 種類のウイルスを検出する網羅的定量的 PCR の系の開発したことなどの成果を得た。さらに慢性肺気腫、自己免疫性肝炎、抗リン脂質抗体症候群、難治性気道感染症とバイオフィーム、難治性血管炎、原発性肺高血圧症、MS、ギラン・バレー症候群などと微生物感染の関連につき検討を行い、いくつかの重要な知見が得られた。

F. 健康危険情報

各分担者の報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

巻末を参照。

2. 学会発表

各年度の分担研究報告書の項を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

各年度の分担研究報告書の項を参照。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果に関する刊行一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashita M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Watanabe Y, Lee BJ, Tsuji S, Ikuta K, Tomonaga K	Persistent borna disease virus infection confers instability of HSP70 mRNA in glial cells during heat stress.	J Virol	79	2033-2041	2005
Matsunaga H, Tanaka S, Sasao F, Nishino Y, Takeda M, Tomonaga K, Ikuta K, Amino N	Detection by radioligand assay of antibodies against Borna disease virus in patients with various psychiatric disorders.	Clin Diagn Lab Immunol	12	671-676	2005
Takemoto M, Koike M, Mori Y, Yonemoto S, Sasamoto Y, Kondo K, Uchiyama Y, Yamanishi K	Human herpesvirus 6 open reading frame U14 protein and cellular p53 interact with each other and are contained in the virion.	J Virol	79	13037-13046	2005
Sasaki T, Yamaya M, Yasuda H, Inoue D, Yamada M, Kubo H, Nishimura H, Sasaki H	The proton pump inhibitor lansoprazole inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells.	Eur J Pharmacol	509	201-210	2005
Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K, Ebihara S, Sasaki T, Okinaga S, Inoue D, Asada M, Nemoto M, Sasaki H	Increased arterial carboxyhemoglobin concentrations in chronic obstructive pulmonary disease.	Am J Respir Crit Care Med	171	1246-1251	2005
Asada M, Yamaya M, Ebihara S, Yasuda H, Tomita N, Kubo H, Sasaki H.	Interleukin-1beta gene polymorphisms associated with COPD.	Chest	128	1072-1073	2005
Takahashi H, Ebihara S, Okazaki T, Asada M, Sasaki H, Yamaya M	A comparison of the effects of unfractionated heparin, dalteparin and danaparoid on vascular endothelial growth factor-induced tumour angiogenesis and heparanase activity.	Br J Pharmacol	146	333-343	2005

Yasuda H, Suzuki T, Zayasu K, Ishizuka S, Kubo H, Sasaki T, Nishimura H, Sekizawa K, Yamaya M	Inflammatory and bronchospastic factors in asthma exacerbations caused by upper respiratory tract infections.	Tohoku J Exp Med	207	109-118	2005
Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong Ple T, Anh NT, Huong VT, Phuong HV, Thi NT, Suu PT, Nguyet NT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, Oishi K.	Comparative molecular analysis of Haemophilus influenzae isolates from young children with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam.	J Clin Microbiol	43	2474-2476	2005
Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H	Quantitative analysis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in KSHV-associated diseases.	J Infect Dis	193	773-782	2006
Yanai H, Kobayashi T, Hayashi Y, Watanabe Y, Ohtaki N, Zhang G, de la Torre JC, Ikuta K, Tomonaga K	A methionine-rich domain mediates CRM1-dependent nuclear export activity of Borna disease virus phosphoprotein.	J Virol	80	1121-1129	2006
Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Yamada M, Suzuki T, Sasaki H	Carbocysteine inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells.	Eur Respir J	28	51-58	2006
Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Koike S, Hirata K, Yuki N	Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barre syndrome after Campylobacter jejuni enteritis.	J Infect Dis	193	547-555	2006
Hamano Y, Tsukamoto K, Abe M, Sun GD, Zhang D, Fujii H, Matsuoka S, Tanaka M, Ishida-Okawara A, Tachikawa H, Nishimura H, Tokunaka K, Hirose S, Suzuki K	Genetic dissection of vasculitis, myeloperoxidase-specific antineutrophil cytoplasmic autoantibody production, and related traits in spontaneous crescentic glomerulonephritis-forming/Kinjoh mice.	J Immunol	176	3662-3673	2006
Yumura W, Itabashi M, Ishida-Okawara A, Tomizawa K, Yamashita J, Kaneshiro Y, Nihei H, Suzuki K.	A novel mouse model for MPO-ANCA-associated glomerulonephritis.	Microbiol Immunol	50	149-157	2006

Yanagisawa Y, Sato Y, Asahi-Ozaki Y, Ito E, Honma R, Imai J, Kanno T, Kano M, Akiyama H, Sata T, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Watanabe S, Katano H	Effusion and solid lymphomas have distinctive gene and protein expression profiles in an animal model of primary effusion lymphoma.	J Pathol	209	464-473	2006
Kanno T, Sato Y, Sata T, Katano H	Expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded K10/10.1 protein in tissues and its interaction with poly(A)-binding protein.	Virology	352	100-109	2006
Abe Y, Matsubara D, Gatanaga H, Oka S, Kimura S, Sasao Y, Saitoh K, Fujii T, Sato Y, Sata T, Katano H	Distinct expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded proteins in Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease.	Pathol Int	56	617-624	2006
Yamaya M, Suzuki T, Ishizawa K, Sasaki T, Yasuda H, Inoue D, Kubo H, Nakayama K, Nishimura N, Sekizawa K	COPD and macrolide.	JMAJ	49	158-166	2006
Nakayama K, Kikuchi A, Yasuda H, Ebihara S, Sasaki T, Ebihara T, Yamaya M	Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and the decline in lung function in Japanese male subjects.	Thorax	61	921	2006
Qin L, Watanabe H, Yoshimine H, Guio H, Watanabe K, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Kudoh S, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T, Mizota T, Oishi K	Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of Streptococcus pneumoniae isolated from patients with community-acquired pneumonia and molecular analysis of multidrug-resistant serotype 19F and 23F pneumococci in Japan.	Epidemiol Infect	2	1-7	2006
Watanabe Y, Ibrahim MS, Hagiwara K, Okamoto M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Hayashi Y, Taniyama H, Ikuta K, Tomonaga K	Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility.	Microbes Infect	9	417-427	2007

Ishida-Okawara A, Nagi-Miura, N, Oharaseki T, Takahashi K, Okumura A, Tachikawa H, Kashiwamura S, Okamura H, Ohno N, Okada H, Ward PA, Suzuki K	Neutrophil activation and induced by <i>C. albicans</i> water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS).	Exp Mol Pathol	82	220-226	2007
Ohtaki N, Kamitani W, Watanabe Y, Hayashi Y, Yanai H, Ikuta K, Tomonaga K	Downregulation of an astrocyte-derived inflammatory protein, S100B, reduces vascular inflammatory responses in brains persistently infected with Borna disease virus.	J Virol	81	5940-5948	2007
Yamaya M, Sasaki T, Yasuda H, Inoue D, Suzuki T, Asada M, Yoshida M, Seki T, Iwasaki K, Nishimura H, Nakayama K	Hochu-ekki-to inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells.	BrJ Pharmacol	150	702-710	2007
Nakajima A, Wada K	Life style-related diseases of the digestive system: from molecular mechanisms to therapeutic strategies: preface.	J Pharmacol Sci	105	127-128	2007
Yoneda M, Saito S, Ikeda T, Fujita K, Mawatari H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Akiyama T, Takahashi H, Abe Y, Kubota K, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Nakajima A	Hepatitis C virus directly associates with insulin resistance independent of the visceral fat area in nonobese and nondiabetic patients.	J Viral Hepat	14	600-607	2007
Koyama J, Ahmed K, Zhao J, Saito M, Onizuka S, Oma K, Watanabe K, Watanabe H, Oishi K	Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable <i>haemophilus influenzae</i> in a mouse model.	Tohoku J Exp Med	211	63-74	2007
Saito K, Ito T, Asashima N, Ohno M, Nagai R, Fujita H, Koizumi N, Takano A, Watanabe H, Kawabata H	Case report: <i>Borrelia valaisiana</i> infection in a Japanese man associated with traveling to foreign countries.	Am J Trop Med Hyg	77	1124-1127	2007

Kaji C, Watanabe K, Apicella MA, Watanabe H	Antimicrobial Effect of Fluoroquinolones for the Eradication of Nontypeable Haemophilus Influenzae Isolates within Biofilms.	Tohoku J Exp Med	214	121-128	2008
---	--	------------------	-----	---------	------

Persistent Borna Disease Virus Infection Confers Instability of HSP70 mRNA in Glial Cells during Heat Stress

Makiko Yamashita, Wataru Kamitani, Hideyuki Yanai, Naohiro Ohtaki, Yohei Watanabe, Byeong-Jae Lee, Shoutaro Tsuji, Kazuyoshi Ikuta, and Keizo Tomonaga*

Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita Osaka, Japan

Received 5 July 2004/Accepted 6 October 2004

Borna disease virus (BDV) is a highly neurotropic RNA virus that causes neurological disorders in many vertebrate species. Although BDV readily establishes lasting persistence, persistently infected cells maintain an apparently normal cell phenotype in terms of morphology, viability, and proliferation. In this study, to understand the regulation of stress responses in BDV infection, we investigated the expression of heat shock proteins (HSPs) in glial cells persistently infected with BDV. Interestingly, we found that BDV persistence did not upregulate HSP70 expression even in cells treated with heat stress. Furthermore, BDV-infected glial cells exhibited rapid rounding and detachment from the culture plate under various stressful conditions. Immunofluorescence analysis demonstrated that heat stress rapidly disrupts the cell cytoskeleton only in persistently infected cells, suggesting a lack of thermotolerance. Intriguingly, we found that although persistently infected glial cells expressed HSP70 mRNA after heat stress, its expression rapidly disappeared during the recovery period. These observations indicated that persistent BDV infection may affect the stability of HSP70 mRNA. Finally, we found that the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is expressed at a constant level in persistently infected cells with or without heat shock. Considering the interrelationship between HSP70 and PKR production, our data suggest that BDV infection disturbs the cellular stress responses to abolish antiviral activities and maintain persistence.

Borna disease virus (BDV) is a neurotropic virus that belongs to the *Mononegavirales* order. Natural BDV infections have been found in a wide variety of vertebrates, suggesting that the host range of this virus probably includes all warm-blooded animals (17, 22). BDV infects the central nervous system (CNS) of many animal species and causes behavioral disturbances reminiscent of autism, schizophrenia, and mood disorders (17, 38, 41, 50). Thus, studies on this virus provide an important paradigm for the mechanisms by which viral infection induces neurobehavioral disorders.

BDV shows noncytopathic replication and long-lasting persistence in both cultured and animal brain cells (10, 51). In immunocompetent rats infected with BDV, a marked immune-mediated meningoencephalitis consistent with classical Borna disease is observed to induce severe neurological disturbances (41, 48). In this model, BDV commonly evades host immune responses after the acute infection phase and establishes life-long persistence, leading to movement disorders (17, 37, 48). On the other hand, neonatal rats infected with BDV develop a tolerant persistent infection without signs of Borna disease or encephalitis (17, 37). Neonatal infection of animals, however, causes neuroanatomical alterations in the developing CNS, especially in the cerebellum and hippocampus, and induces serious neurobehavioral abnormalities (12, 17, 43). These observations have revealed that BDV can directly induce neuronal damage without an immune-mediated mechanism and also

suggested that establishment of a persistent infection in the CNS may be critical for the neuropathogenesis of this virus.

Recent studies have suggested that BDV could modify the microenvironment of infected cells. Hans et al. reported that persistent BDV infection constitutively activated the mitogen-activated protein kinase pathway but efficiently blocked nuclear translocation of activated extracellular signal-regulated kinase (ERK) in PC12 cells (15). Furthermore, we have demonstrated that BDV phosphoprotein (P) specifically interacts with a multifunctional protein, HMGB1 (high-mobility group box 1 protein), and interferes with its functions in persistently infected neural cells (19, 54). More recently, interaction between BDV nucleoprotein (N) and the Cdc2-cyclin B1 complex has been reported to induce decelerated proliferation of infected rat fibroblast cells (36). These findings suggest that although BDV infection appears to be noncytolytic, persistent infection might widely induce functional fragility in infected CNS cells, leading to neurological abnormalities.

Virus infections can induce cellular stress responses, which include the expression of stress response proteins, such as heat shock proteins (HSPs) (21, 44). HSPs mainly work as molecular chaperons and are involved in many biological processes, such as thermotolerance, prevention of misfolding of nascent polypeptides, transmembrane protein transport, nuclear protein transport, and cell viability (24). It has been shown that these stress response proteins are involved not only in cellular maintenance in an infectious environment but also in antiviral action. It has been demonstrated that induction of large HSPs, most notably HSP70, gives rise to antiviral activity during various viral infections, such as influenza virus (35), rhinovirus (8), and human immunodeficiency virus (42). Furthermore, HSPs can induce innate and adaptive immune responses by partici-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita Osaka 565-0871, Japan. Phone: 81-6-6879-8308. Fax: 81-6-6879-8310. E-mail: tomonaga@biken.osaka-u.ac.jp.

pating in antigen presentation and eliminate virus-infected cells (46). In a mouse model of persistent infection with measles virus, it has been demonstrated that elevated levels of HSP promote cell-mediated viral clearance from the infected CNS (30). On the other hand, many viruses have been shown to use HSPs to stimulate viral entry, transcription, nuclear translocation, and virion formation (3, 7, 14, 26), indicating that HSPs also play roles in the accomplishment of the viral life cycle in targeted host cells. These properties of stress-induced proteins suggest that the regulation of HSPs in infected cells could be critical to the maintenance of viral survival, probably including persistent infection.

This study was thus undertaken to investigate the regulation of stress responses in cells persistently infected with BDV. We demonstrated that persistently infected glial cells are indistinguishable from uninfected parent cells in the expression of large HSPs, as well as in cell morphology and proliferation. Interestingly, we found that heat stress followed by recovery fails to induce HSP70 expression in persistently infected cells. Furthermore, these cells showed rapid rounding and detachment from the culture plate under heat shock stress and oxidative conditions. Immunofluorescence analysis demonstrated that BDV infection easily degrades the actin cytoskeleton and focal adhesion complexes at the lamellipodia with heat shock, supporting the lack of thermotolerance of persistently BDV-infected glial cells. Intriguingly, we found that although infected cells expressed HSP70 mRNA on heating as quickly as did uninfected controls, the mRNA rapidly disappeared during the period of recovery. These results suggested that the persistence of BDV may affect the stability of HSP70 mRNA under stressful conditions. We also demonstrated constant expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) in infected cells with or without heat shock. Together with the interrelationship between HSP70 and PKR production, we discuss the implications of the regulation of stress responses in cells persistently infected with BDV.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and viruses. The C6 rat glioma cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. The OL cell line, derived from a human oligodendroglioma, was grown in high-glucose (4.5%) DMEM supplemented with 10% FCS. Cells were passaged every 3 days. Two cell lines were infected with BDV, Hc/80 (9) and huP2hr (29), and after 10 to 30 passages we used these cell lines as persistently infected cells. They were maintained under the same conditions as the parental cell lines. These cells produced infectious BDV.

Primary cortical glial cells were isolated from Lewis rats (SLC, Shizuoka, Japan). Briefly, the brains were gently removed from their skulls and placed in a phosphate-buffered saline (PBS)-filled petri dish on ice. The cortexes were then dissected, dissociated by mechanical trituration, and digested with 2.5% trypsin in PBS plus 5% glucose. DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.) was added to a final concentration of 0.01%, and the mixture was incubated for 20 min at 37°C. After the addition of 35% heat-inactivated horse serum, the suspension was centrifuged at 800 × *g* for 3 min. After resuspension in DMEM-Ham's F-12 (1:1) mixed medium, cells were seeded and grown in high-glucose (4.5%) DMEM supplemented with 10% FCS. After 1 to 2 weeks, numerous astrocytes and microglia, as well as oligodendrocytes, were present in cultures, as judged by morphology.

Stress treatments. Before experiments, cells (6 × 10⁵) were seeded in 60-mm-diameter culture plates. Semiconfluent cultures were heat shocked at 44°C for 0.5 to 1 h. After the heat shock, the cells were allowed to recover for various times at 37°C. Oxidative stress was administered by incubating the cells with 10 μM hydrogen peroxide for 0.5 h. After being washed with PBS, the cells were

allowed to recover from the treatment for 24 h in normal medium at 37°C. For morphological analysis, cells were visualized under a phase-contrast microscope (Nikon Co., Tokyo, Japan) at various intervals.

Cell viability assays. After heat shock, floating cells were carefully collected and quantified. Floating cells were stained with 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich), and numbers of viable and nonviable cells were estimated. For statistical analysis, the data were expressed as the mean plus the standard error. Comparisons of two groups were performed by Student's *t* test with Statcel software (OMS Publishing Inc., Tokyo, Japan).

Detection of stress-related proteins. Following stress treatments, the cells were washed with cold PBS and then lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 4 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na₂VO₃, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After centrifugation (15,000 × *g* for 5 min at 4°C), the soluble fraction was subjected to further analysis. Equal amounts of the proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, Mass.). The membranes were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) and then incubated for 2 h with the following primary antibodies: mouse anti-HSP90 (SPA-830; Stressgen Biotechnologies, Inc., San Diego, Calif.), mouse anti-HSP70 (SPA-810; Stressgen), rat anti-HSC70 (SPA-815; Stressgen), mouse anti-HSP60 (SPA-806; Stressgen), mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Chemicon International, Temecula, Calif.), rabbit anti-PKR (D-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif.), rabbit anti-phosphorylated PKR (Calbiochem, La Jolla, Calif.), or rabbit anti-BDV P and N in TTBS at 37°C. After three washes in TTBS, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) were applied for 1 h at 37°C. The membranes were washed three times in TTBS, incubated in commercial enhanced chemiluminescence reagent (ECL Western blotting kit; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), and exposed to X-ray film. The intensity of each reactive band was quantified with NIH Image software.

Immunofluorescence staining. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min. The fixed cells were permeabilized with PBS containing 0.5% Triton X-100 for 5 min and incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer consisting of PBS with 10% FCS. Subsequent antibody incubations were also performed with the blocking buffer. The cells were incubated with anti-focal adhesion kinase (FAK) monoclonal antibody (Transduction Lab, Lexington, Ky.) overnight at 4°C. Subsequently, the cells were washed with PBS three times and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h at room temperature. For detection of filamentous actin (F-actin), rhodamine-phalloidin was mixed with the second antibody solution. After three washes with PBS, the cells were examined with an epifluorescence microscope (Nikon Co.).

Semiquantitative RT-PCR of HSP70 mRNA. Total cellular RNA was extracted with TRIzol reagent in accordance with the manufacturer's (Invitrogen, San Diego, Calif.) directions. First-strand cDNAs were synthesized from aliquots of 1 μg of total RNA with the Superscript reverse transcription (RT)-PCR system (GIBCO/BRL, Rockville, Md.). The resulting cDNAs were used as templates for PCR amplification with the primers HSP70 forward (5'-GAG TCC TAC GCC TTC AAT ATG AAG-3') and HSP70 reverse (5'-CAT CAA GAG TCT GTC TCT AGC CAA-3'). PCR was performed with a total volume of 25 μl containing 2 μl of cDNA and 1.25 U of *Taq* polymerase (KlenTaq LA; Sigma-Aldrich). Serial dilutions of positive controls were amplified at 20, 25, 30, and 35 cycles to determine the optimal number of amplification cycles that produces a linear relationship between the input RNA and PCR product. The reaction mixture was preincubated at 94°C for 5 min and then subjected to 30 cycles of PCR at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. As a control for the input RNA, levels of GAPDH (forward primer, 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'; reverse primer, 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3') were assayed. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. Gels were stained with ethidium bromide. Images of agarose gels were captured electronically, and the pixels were inverted. The intensity of each band was quantified with NIH Image software.

Stability of HSP70 mRNA. Following heat shock treatment, cells were treated with actinomycin D (10 μg/ml) to globally inhibit transcription, and mRNA levels were subsequently measured in a time course after exposure to the drug for 12 h. Total cellular RNAs were extracted as described above. Aliquots of 20 μg of total RNA were electrophoresed through a 1% agarose gel containing 2.2% formaldehyde and transferred onto nylon membrane (Hybond N+; Amersham) with 20× SSC (1× SSC is 150 mM NaCl plus 15 mM sodium citrate, pH 7). After being baked at 80°C for 2 h, the membrane was hybridized with an [³²P]dCTP-labeled probe specific for rat HSP70 in a buffer containing 5× SSC, 50% form-

amide, 0.1% SDS, 5× Denhardt's solution, and 10 µg of yeast tRNA at 42°C overnight. Rat HSP70-specific probe was synthesized with the 3' end of the rat HSP70 gene as the template by the Random Prime Labeling System in accordance with the manufacturer's (Amersham Pharmacia Biotech) directions. After washing in 0.1× SSC-0.1% SDS at 50°C for 1 h, the specific signals were recorded on X-ray film at -80°C.

RESULTS

BDV infection cannot induce HSP expression in glial cell lines. To understand the regulation of stress responses during BDV persistence, we first investigated the expression of HSPs in two glial cell lines persistently infected with BDV. The C6 and OL cell lines were infected with BDV, and after 10 to 30 passages we used these cell lines (C6/BDV and OL/BDV) as persistently infected cells. Previous studies clearly demonstrated that cell lines persistently infected with BDV show apparently normal morphology and cell viability (22, 51). We confirmed that the persistently infected glial cells were morphologically normal and showed no abnormality in proliferation, although almost 100% of the cells expressed BDV antigens (Fig. 1A and B). To analyze the steady-state levels of HSPs in the cell lines, we performed Western immunoblotting with antibodies against large HSPs, including HSP90, HSP70, HSC70, and HSP60. As shown in Fig. 1C, the persistently infected cells expressed HSPs at levels comparable to those of uninfected cell lines, although we could not detect the expression of HSP70 in uninfected or infected C6 cells. As reported previously (31, 45), large HSPs, such as HSP60, HSC70, and HSP90, were constantly expressed in the cells under normal culture conditions. In addition, acutely BDV-infected cells also showed no differences in HSP expression from the uninfected cells (data not shown). This observation demonstrated that BDV infection cannot upregulate HSP expression in glial cell lines.

Persistently infected cells fail to express HSP70 during heat stress. We next investigated whether heat stress followed by recovery can induce the expression of HSPs in persistently infected cells. The cell lines were exposed to a heat stress of 44°C for 1 h with recovery at 37°C, and samples were collected 0, 3, 6, and 12 h after heat treatment. Equivalent amounts of proteins were electrophoresed and reacted with antibodies to HSPs. As shown in Fig. 2, activation of HSP70 gradually occurred and peaked at 12 and 3 h after heat treatment in uninfected C6 and OL cells, respectively. HSP90 expression also appeared to be slightly upregulated in uninfected C6 cells with a peak at 6 h after heat stress (Fig. 2A). Interestingly, only weak expression of HSP70 was detected in persistently infected C6 cells from 6 h after heat treatment (Fig. 2A). On the other hand, no upregulation of HSP70 expression was seen in BDV-infected OL cells during the observation period (Fig. 2B). In addition, activation of BDV N and P expression was not observed in persistently infected cells during the stress response (Fig. 2B). We repeated this experiment at least six times and obtained similar results each time. These results revealed that heat stress induces HSP70 expression less well in glial cells persistently infected with BDV.

Morphological disruptions of BDV-infected cells by stress treatments. Previous study has demonstrated that large HSPs, including HSP70, interact with different cytoskeletal components (20). HSP70 appeared to bind mostly to the microtubule

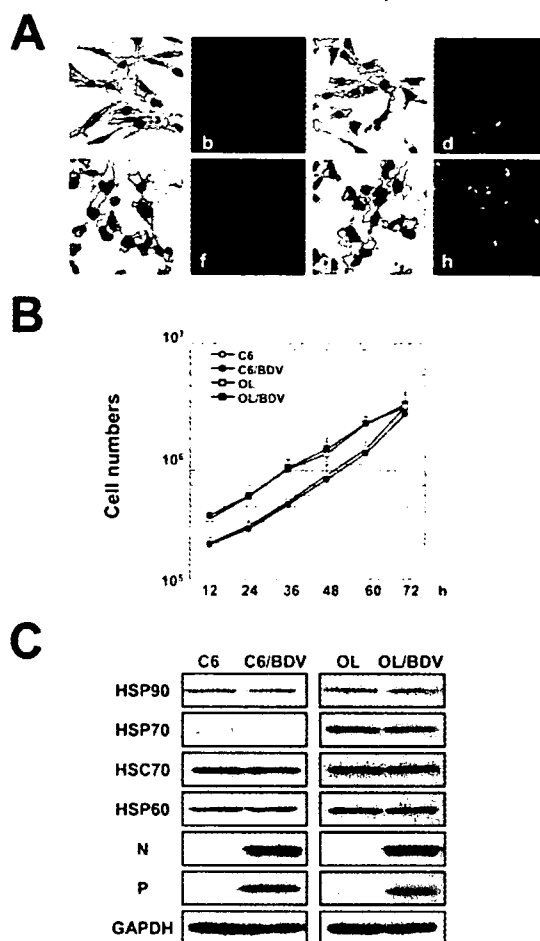


FIG. 1. HSP expression in persistently BDV-infected glial cells. (A) Morphology and BDV antigen expression in persistently BDV-infected glial cell lines. The C6 (a to d) and OL (e to h) cell lines were grown under normal culture conditions. Subpanels: a, b, e, and f, uninfected; c, d, g, and h, persistently infected. The cells were fixed and stained with hematoxylin. BDV antigen was detected by immunofluorescence assay with an anti-P polyclonal antibody. (B) Proliferation of persistently infected glial cells. Cells (2×10^5) were seeded in 60-mm-diameter culture plates, and their proliferation was evaluated every 12 h. (C) Expression of large HSPs in persistently infected cell lines. Cells were lysed, and equal amounts of protein were subjected to Western blot analysis with antibodies against HSP90, HSP70, HSC70, HSP60, and BDV P and N. The GAPDH control shows that each lane contains approximately the same amount of protein. Data from one experiment representative of three independent tests are shown.

network and centrosome to play roles in the morphological stabilization of cells during stress responses (20). To understand the effects of a lack of HSP70 induction in cells persistently infected with BDV, therefore, we analyzed the morphological changes in these cells in stressful situations, such as during heat shock and under oxidative conditions. As shown in Fig. 3A, the stressors apparently caused cell rounding in the persistently infected glial cell lines. The rounding was observed within 0.5 h after heat treatment. In contrast, the stressors produced only minimal changes in the morphology of uninfected cells (Fig. 3A). Other types of stress, such as UV treat-

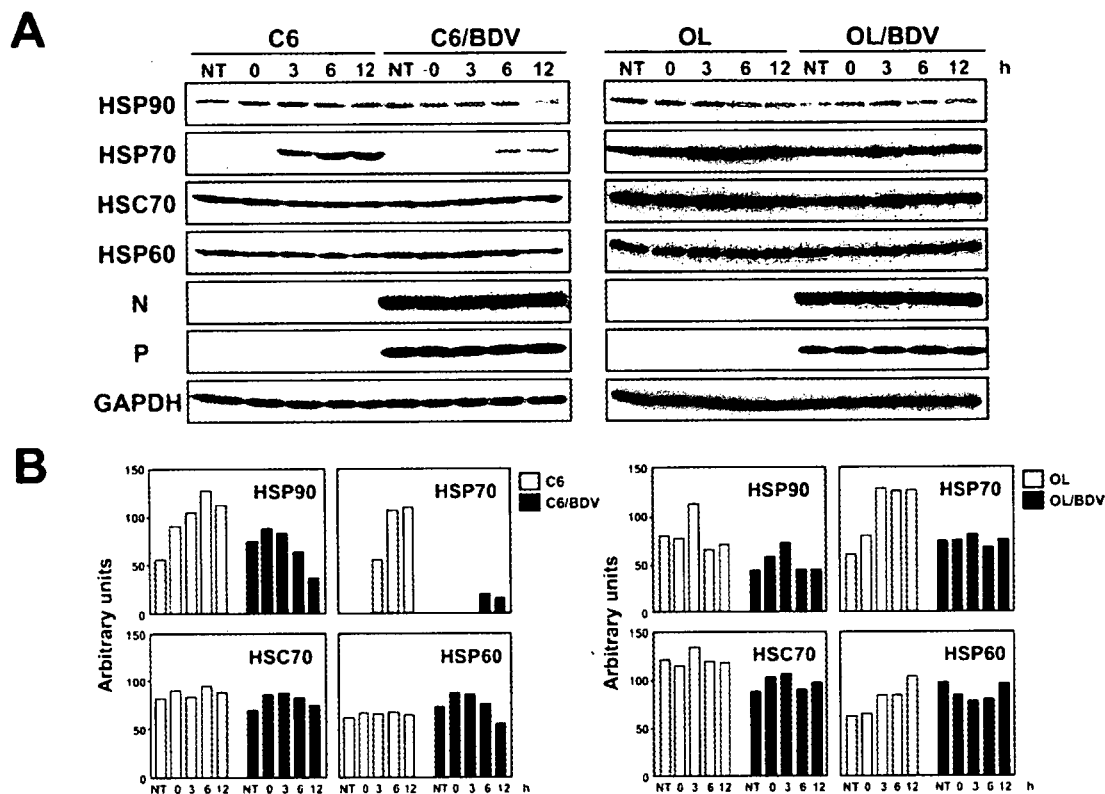


FIG. 2. BDV infection inhibits HSP70 expression induced by heat shock in glial cells. (A) C6 and OL cells were exposed to heat shock at 44°C and allowed to recover at 37°C for different periods. Cells were harvested at the indicated times during the recovery period. Nontreated control cells (NT) were maintained at 37°C and harvested together with heat-stressed cells. After being washed with ice-cold PBS, the cells were lysed and separated by SDS-PAGE (10% acrylamide). Western blot analysis was carried out as described in Materials and Methods. Data from one experiment representative of six independent tests are shown. (B) For quantitative analysis of HSP expression, band intensities were determined with NIH Image software. Values were normalized to GAPDH levels.

ment and serum starvation, also induced cell rounding during the recovery period (data not shown).

Recent studies have shown that HSP70 interacts with FAK, which is a tyrosine kinase, and inhibits the degeneration of FAK to prevent apoptosis (23). FAK is associated with the focal adhesion complex, which is the site of cellular interactions with the extracellular matrix, and plays important roles in integrin-mediated cell adhesion and microtubule stabilization (32). Thus, we next examined whether the rapid rounding and detachment from the culture plate of persistently infected cells resulted from disruptions of the actin cytoskeleton and focal adhesion complex formation in the cells. C6 and C6/BDV cells were exposed to heat stress, and changes in F-actin and focal adhesion complexes were visualized by immunofluorescence staining with rhodamine-phalloidin and anti-FAK antibody, respectively. In uninfected C6 cells, the actin cytoskeleton and focal adhesion complexes were well maintained following heat stress (Fig. 3B and C) whereas heat stress rapidly induced F-actin degeneration in persistently infected C6 cells (Fig. 3B). Furthermore, in C6/BDV cells, the focal adhesion complexes were shown to disappear at the lamellipodia within 1 h after the stress (Fig. 3C). These observations supported a lack of HSP expression in the infected cells and also suggested a sup-

pression of thermotolerance in persistently BDV-infected cells.

Figure 3D shows the total numbers of cells detached from plastic tissue culture dishes by heat treatment. As expected, the floating cell number was significantly higher in persistently infected cells than in uninfected cells. However, interestingly, trypan blue exclusion revealed that more than 85% of the cells floating after heat stress were viable at 1.5 h of recovery in persistently BDV-infected cells (Fig. 3E). In contrast, only 40% of the floating cells remained viable in the uninfected control (Fig. 3E). Upon being replated in a fresh culture dish, infected cells could adhere to the surface within 1 to 2 days and grew normally (data not shown). These results suggested that despite a lack of HSP70 induction, BDV-infected C6 cells are relatively resistant to death from heat shock.

Altered expression of HSP70 in BDV-infected rat primary glial cells during heat shock. To understand whether the disturbances found in BDV-infected cultured glial cells is also applicable to an *in vivo* situation, we also investigated stress responses of rat primary glial cells infected with BDV. At 19 days after infection, primary cells were 75% positive for BDV antigen, with apparently normal morphology and cell viability (Fig. 4A). We exposed primary glial cell cultures to a heat