

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
ワクチンの品質確保のための国家検定制度の抜本的改正に関する研究

分担研究報告書

日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に関与する炎症性サイトカインの解析

研究分担者	倉根 一郎	国立感染症研究所	副所長
研究協力者	林 昌宏	国立感染症研究所	ウイルス第一部第三室長
	山口 幸恵	国立感染症研究所	ウイルス第一部第三室
	伊藤(高山)睦代	国立感染症研究所	ウイルス第一部主任研究官
	垣内 五月	国立感染症研究所	ウイルス第一部第三室
	堀谷まどか	国立感染症研究所	ウイルス第一部第三室
	田島 茂	国立感染症研究所	ウイルス第一部主任研究官
	高崎 智彦	国立感染症研究所	ウイルス第一部第二室長
	渡邊 治雄	国立感染症研究所	所長
	西條 政幸	国立感染症研究所	ウイルス第一部長

研究要旨：高い神経侵襲性を有する日本脳炎ウイルス JaTH160 株感染群のマウスは、感染 5 日後より脳内でウイルス増殖が確認され、ウイルス増殖が確認された脳では、MMP-3 およびその上流の IL-6 の mRNA 発現レベルが上昇していた。この発現上昇は脳内に限られており、血液中では見られなかった。日本脳炎発症には脳内での MMP-3 発現が重要であり、神経侵襲性決定には脳内での IL-6 発現が関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス(JEV)は致死的な日本脳炎の原因ウイルスである。その多くは不顕性感染であるが、ひとたび発症すると未だ治療法はない。蚊によって媒介される JEV は末梢で増殖し、血流に乗って移動、血液脳関門 (BBB) を介して脳へと侵入することで、脳炎を発症すると考えられている。しかしながら、BBB を介した脳への侵入機構は明らかになっていない。そこで本研究の目的は、日本脳炎の発症機構の解明を行

うため、日本脳炎ウイルスの脳への侵入機構を解明することである。

本研究において我々が特に注目しているのがマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) -3 及び MMP-9 である。MMP-3 は線維芽細胞や血管内皮細胞から分泌されるマトロプロテアーゼである。MMP-3 は血液脳関門の一部である基底膜を構成するコラーゲンを含む多くの基質を分解することで注目されている。MMP-9 は活性化された T 細胞から産生され、gap 結合などを構成

するコラーゲンを分解するメタロプロテアーゼである。BBBはこのgap結合とtight結合からなりMMP-9はこの結合を壊すことで、近縁のウエストナイルウイルス(WNV)のBBB侵入に関与することが報告されている。そこで我々はJEVの脳への侵入機構におけるMMP-3及びMMP-9の役割を解析するため、ウイルスが脳へ侵入するとき、MMP-3及びMMP-9がどのタイミングで発現し、BBBに損傷を与えるのかをJEV JaTH160株およびNakayama株を用いて検討した。

B. 研究方法

ウイルス：JEV JaTH160株およびNakayama株をアフリカミドリザル腎臓細胞由来Vero細胞を用いて増殖し、力価測定を行い、使用するまで-80℃に保存した。

マウス：FVB/NJ系統の4週齢のマウス()を用いてJEV攻撃試験を行った。

感染実験：マウスに 3.3×10^3 PFU (JaTH160株の1LD50相当)のJaTH160とNakayama株をそれぞれ腹腔内接種した。感染0, 1, 3, 5, 7, 10日後に血液と脳を採取し、RNAを抽出した。RT-PCRで各サンプルにおけるウイルス動態および、MMP-3, MMP-9および炎症性サイトカインIL-6, IL-1, TNF- α のmRNA発現レベルを測定、比較した。

C. 研究結果

マウスにおけるウイルス動態：JEV JaTH160株およびNakayama株を 3.3×10^3 PFUマウス腹腔内接種し、0, 1, 3, 5,

7, 10日後に血液および脳組織を採取した。JaTH160株摂取群では接種9日後にJEVの発症が認められたが、Nakayama株接種群では特異的症状は認められなかった。得られた血液および脳からそれぞれRNAを抽出し、マウスの体内におけるウイルス動態を調べた。その結果、ウイルス血症がJaTH160株接種1日後に観察された。接種5日後には脳内でのウイルス増殖が観察された。しかしながら、Nakayama株感染群ではウイルス血症が観察されず、脳においては、接種7日後にウイルスRNAが観察された。

マウス脳内におけるMMP-3および

MMP-9の発現量：次にマウス脳内におけるMMP3およびMMP9のmRNA量の動態を定量リアルタイムRT-PCR(qRT-PCR)法を用いて観察した。このときインターナルコントロールとしてGAPDHのmRNA量を測定した。その結果、JaTH160株感染マウスにおいてはMMP-3のmRNA量の上昇がJEV感染5日後から観察された。またMMP-9の発現量に変化は認められなかった。Nakayama株接種群においてはMMP-3およびMMP-9の発現量に変化は認められなかった。以上の結果より、JEVの脳への侵入および脳炎発症においてMMP-3が関与する可能性が示唆された。

マウス脳内における炎症性サイトカインの

発現量：MMP-3の発現に関与することが報告されている炎症性サイトカインの内、IL-6, TNF- α , IL-1 β のmRNA発現量をqRT-PCR法を用いて検討した。その結果JEV JaTH160株感染3日後にIL-6の上昇

が観察された。また、TNF- α および IL-1 β の mRNA 量の上昇が感染 5 日後から観察された JaTH160 株接種群において IL-6 の発現上昇は MMP-3 の発現上昇より前に認められたが、TNF- α と IL-1 β の発現上昇は MMP-3 の発現上昇とほぼ同時であった。したがって、JaTH160 株接種群においては IL-6 の発現上昇が MMP-3 の発現上昇に關与する可能性が考えられた。ところで Nakayama 株接種群では脳における炎症性サイトカインの発現量の有意な上昇は認められなかった。

D. 考察

JEV JaTH160 株は 1959 年に死亡患者から分離され、成熟マウスで継代された分離株であり、脳内接種および腹腔内接種のいずれの場合も強毒性を示すウイルス株である。また、Nakayama 株は 1935 年に死亡患者から分離され、乳のみマウス脳で継代されたウイルス株であり、ワクチン株である。Nakayama 株は神経毒性は高いが、神経侵襲性が野生株と比較して低下していることが知られている。本研究において我々は JEV の脳内への侵入過程を解明するために異なる神経侵襲性を有す 2 つの株を用いてそれぞれのウイルスのマウス腹腔内接種時の MMP-3 及び MMP-9 の発現と BBB の損傷および病原性を比較検討することにより JEV の脳への侵入機構における MMP-3 及び MMP-9 の役割を検討した。その結果 JaTH160 株感染群のマウスでは、脳内のウイルス増殖、MMP-3 の mRNA の発現上昇、および MMP-3 に關連する炎症性サイ

トカインの mRNA の発現上昇が観察されたが、神経侵襲性が低い Nakayama 株感染群のマウスでは脳内でのウイルス増殖に加えて MMP-3 および炎症性サイトカインの mRNA の発現上昇は観察されなかった。また、Nakayama 株接種群においては抹消血中のウイルス量も低く、炎症性サイトカインの mRNA の発現上昇も見られなかった。

以上の結果より、日本脳炎の発症には脳内での MMP-3 の発現上昇が關与し、神経侵襲性決定にはその上流にある炎症性サイトカイン IL-6 が關与する可能性が示唆された。

E. 結論

本研究において JEV JaTH160 株の腹腔内接種におけるウイルスの神経侵襲性過程においては脳内での MMP-3 の発現上昇が關与し、神経侵襲性決定にはその上流にある炎症性サイトカイン IL-6 が關与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takayama-Ito M, Nakamichi K, Kinoshita H, Kakiuchi S, **Kurane I**, Saijo M, Lim CK. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals* 42:42-7, 2014

2. 学会発表

1) 山口幸恵, 林昌宏, 伊藤(高山)睦代,

- 垣内五月,堀谷まどか,田島茂,高崎智彦, **倉根一郎**,渡邊治雄,西條政幸.日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に関する炎症性サイトカインの解析.第62回日本ウイルス学会学術集会.横浜,2014年11月10-12日.
- 2) Moi ML,白石健二,網康至,宮田幸長,林昌宏,須崎百合子,北浦孝一,西條政幸,鈴木隆二, **倉根一郎**,高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development.第62回日本ウイルス学会学術集会.横浜,2014年11月10-12日.
- 3) 齋藤悠香, Moi ML,竹下望,林昌宏,司馬肇,細野邦明,西條政幸, **倉根一郎**,高崎智彦. Fc R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン被接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討.第62回日本ウイルス学会学術集会.横浜,2014年11月10-12日.
3. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし