

ポリオウイルスの体内動態と宿主機能

Dissemination mechanism of poliovirus

野本 明男 (nomoto akio)

東京大学・大学院医学系研究科・特任教授



研究の概要

ポリオウイルスは経口感染し消化管で増殖後、血流に入り、血液脳関門を透過して中枢神経系に侵入する。そこで、主に運動神経細胞に感染し、その機能を破壊する。骨格筋から神経軸索を逆行性に輸送され中枢神経系にいたる経路も知られている。このようなポリオウイルスの体内動態メカニズムの解明を行う。

研究分野：医歯薬学

科研ひの分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、感染症、生体分子、脳神経疾患、病理学

1. 研究開始当初の背景

ヒトのポリオウイルス (PV) 受容体 (hPVR) を持つトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、サルに替わる PV の感染モデル動物として利用できるようになっていた。事実、体内伝播経路もヒトの場合と同様であった。しかし、この Tg マウスは、サル同様に経口感染に対しては、非常に抵抗性であった。

2. 研究の目的

Tg マウスで経口感染が成立しない理由を明らかにし、血液脳関門 (BBB) 透過機構や逆行性軸索輸送の分子機構を解明すること、さらに、神経細胞が持つ PV 抵抗性のメカニズムも合わせて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1型インターフェロン受容体の KO マウスと上記 Tg マウスから、PV 感受性マウスを作製する (麻酔器)。BBB 透過に必要な分子を同定するためにマウス脳血管内皮細胞の表面物質と PV の相互作用を調べる (マルチラベルカウンター)。逆行性軸索輸送に関与するメカニズムおよび輸送前と輸送後の PV の動態を初代培養の運動神経を使い検討する (マイクロピペットプレー)。神経細胞の PV 抵抗性については、各種の変異ウイルスを作製し、神経細胞変性に関与する PV の遺伝子を同定する (マスターサイクラー)。

4. これまでの成果

hPVR を持つ Tg マウスは、PV の感染モデルとして有用である。しかしながら、経口感染の効率が非常に悪く、真にヒト型マウスとは言えない。そこで、Tg マウスの消化管に適応した PV 変異株を得た。しかし、この変異株を安定して維持することは困難であった。そこで、血流中から中枢神経系に移行しやすい変異株を得る方針を立て、ある程度移行しやすい変異株を得、そのゲノム構造を解析した。その結果、キャプシド蛋白質 VP1 のウイルス粒子表面に位置するペプチドの一部が変化していることを見出した。この変異が BBB 透過に関与しているかは今後の課題である。

BBB 透過機構には、hPVR は関与していない。そこで hPVR を持たないマウス脳血管内皮細胞をトランスウェル上で培養し、in vitro BBB モデルを作製、PV の透過実験を行った。その際、種々の物質を加えて PV の透過阻害を観察した。その結果、トランスフェリンが PV と競合し、また両者はマウス脳血管内皮細胞の同じエンドソームに取り込まれることも判明した。このように、PV はトランスフェリン受容体を利用して BBB を透過しているとの可能性が示された。そこで、PV とトランスフェリン受容体との結合実験の結果、両者は結合することを明らかにした。さらに、両者の結合に関与するトランスフェリン上のペプチドを同定した。現在、PV 粒子表面の結合に関与するペプチドを探索している。

PV の逆行性軸索輸送に関しては、ダイニンが関与する早い軸索輸送であることを明らかにしていた。すなわち、骨格筋の接種した PV は、神経シナプスで hPVR 依存的にエン

ドサイトーシスにより取り込まれる。PVを持つエンドソームは、エンドソームの外側に存在するhPVRの細胞質ドメイン上にはダイニン複合体サブユニットへの結合モチーフがあり、そこを介してダイニン複合体に結合。マイクロチューブルに沿って逆行性に動くダイニンにより運ばれるというものである。本研究では、その輸送系に加え、遅い輸送系も存在し、PV輸送に関与しており、さらにhPVRを介さない逆行性輸送の存在もあることを、*in vivo*, *in vitro* の系を駆使して証明した。

また、逆行性軸索輸送中のPVは、感染性粒子であるが、神経細胞体に到着すると、そこでhPVR依存的なウイルス複製が開始される。この複製開始の細胞内の部位や複製開始のメカニズムは全く知られていない。このメカニズムを解明するために、神経の細胞体とシナプス側を分離して培養できる培養装置の開発を行った。現在、Tgマウスからの運動神経細胞の初代培養細胞の分離培養に成功したところである。

神経細胞にPVを感染させ、2時間後に感染防御抗体を添加すると、PVはクリアランスされ、神経細胞は継代可能となる。添加抗体の働きは、複数回の感染を阻止したことにある可能性を検討した。すなわち1回感染のみ起こるPVの欠陥干渉(DI)粒子の感染実験を行った。その結果、神経細胞は抵抗性をしめしたが、コントロールとして使用したHeLa細胞には激しい細胞変性効果が現れた。DI粒子感染によってもPVの2A蛋白質は発現する。したがって、神経細胞は2Aに対し抵抗性であることが判明した。神経細胞がPVの一回の感染に対し抵抗性をもつのは、このためではないかと考えられる。そこで、神経細胞にDI粒子を複数回感染させ、細胞変性効果を観察した。予想に反し、細胞変性は生じなかった。そこで、DI粒子に欠けているキャプシド蛋白質領域を発現するワクシニアウイルスを使用し、神経細胞への感染実験を行ったところ、コントロールのワクシニアウイルスに比べ、明らかに細胞変性が強く現れた。神経細胞はPVのキャプシド蛋白質により、損傷を受ける可能性が示された。

PVを使用した、発現ベクターはキャプシド蛋白質領域を外来mRNAと置換するので、神経細胞を標的とする場合、安全性の高いベクターとなると予想される。

5. 今後の計画

PVのBBB透過メカニズムを詳細に明らかにする。PV上の結合に関与するペプチドは、中枢神経系に薬物を運ぶ際のタグとして使用できる可能性がある。

分離培養系を用いて、PVをシナプス側に感染させ、逆行性に細胞体まで運ばれたエンドソームが破壊され、PVのuncoatingが生じ、複製が開始される分子メカニズムを解明する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)
(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

(1) Seii Ohka, Hiroko Igarashi, Noriyo Nagata, Mai Sakai, Satoshi Koike, Tomonori Nochi, Hiroshi Kiyono, & **Akio Nomoto**. Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. *J. Virol.*, 81(15): 7902-7912, 2007

(2) **Akio Nomoto**. Molecular aspect of poliovirus pathogenesis. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 83: 266-275, 2007

(3) Seii Ohka, Mai Sakai, S. Bohnert, Hiroko Igarashi, K. Deinhardt, G. Schiavo, & **Akio Nomoto**. Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *J. Virol.*, in press