

氏名(本(国)籍)	山岡理子(千葉県)
主指導教員名	岐阜大学 教授 杉山 誠
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第410号
学位授与年月日	平成26年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序に関する研究
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 鈴木宏志 副査 帯広畜産大学 教授 横山直明 副査 岩手大学 教授 村上賢二 副査 東京農工大学 教授 水谷哲也 副査 岐阜大学 教授 杉山 誠

学位論文の内容の要旨

狂犬病は致死的な感染症であるが、感染後直ちにワクチンを接種することにより、発症を防ぐことが可能な疾病である(暴露後予防法)。しかし、感染の状況、予防措置までの時間等により、発症を阻止することができない狂犬病の事例も報告されている。狂犬病ウイルスは感染動物の咬傷部位から末梢組織に侵入し、付近の末梢神経を介して脊髄を上行し、脳で増殖して感染動物を発症させる。しかし、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序に関しては未だに不明な点が多い。特に、ウイルスが神経系へ侵入する最初のステップである、末梢神経への感染機序については、極めて情報が少ない。筋肉細胞は末梢組織におけるウイルス感染部位であるが、同細胞でのウイルス増殖が末梢神経への感染に重要であるかについては結論が出ていない。また、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性にG蛋白質の機能が重要であることが報告されている一方で、G蛋白質以外のウイルス蛋白質の関与も示唆されているが、その詳細は不明である。

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株及び同株を鶏胚線維芽細胞で馴化させた Ni-CE 株は、脳内接種によりマウスを発症させる。一方、両株を筋肉内接種した場合、西ヶ原株はマウスを発症させるのに対し、Ni-CE 株は発症させない。このように、両株の中枢神経侵入性には明瞭な違いが認められることから、同機序の解明のためのモデルになると考えられた。そこで本研究では、狂犬病ウイルスの中枢神経侵入機序の解明を目標とし、マウスにおける中枢神経侵入性の異なる西ヶ原株と Ni-CE 株の比較解析を行った。

第一章では、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いに関連するウイルス遺伝子の特定を行った。Ni-CE 株の N, P, M, G あるいは L 遺伝子を、西ヶ原株由来のそれぞれの遺伝子で置換した 5 種類のキメラウイルス株 [CE(NiN)株, CE(NiP)株, CE(NiM)株, CE(NiG)株及び CE(NiL)株] を作出し、各キメラ株をマウス的大腿筋に接種した。その結果、各株接種マウス群の発症率は、それぞれ 40%, 80%, 0%, 40%及び 0%であり、Ni-CE 株のゲノム

に西ヶ原株の P 遺伝子を保有する CE(NiP)株が最も高率にマウスを発症させた。したがって、西ヶ原株と Ni-CE 株の中枢神経侵入性の違いには、P 遺伝子が主要に関連することが明らかとなった。

第二章では、西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株を感染させたマウスにおけるウイルスの分布を比較するため、各株を筋肉内に接種した 5 日後のマウスの各組織におけるウイルスゲノム RNA の検出を RT-nested PCR により試みた。その結果、全ての感染マウスにおいて、ウイルス接種部位である大腿筋からはウイルス遺伝子が検出された。一方、西ヶ原株及び CE(NiP)株接種群では、それぞれ、100%及び 40%のマウスの脳、脊髄及び坐骨神経からウイルス遺伝子が検出されたのに対し、Ni-CE 株接種群では検出されなかった。このことから、感染マウス体内において、CE(NiP)株が Ni-CE 株よりも効率良く末梢神経に感染することが明らかとなった。一方、神経細胞の分離培養系であるマイクロ流体プラットフォームを用いた実験においては、ウイルスを軸索末端に接種した場合、CE(NiP)株と同様に Ni-CE 株も神経細胞への感染能を持っていることが示された。したがって、両株の軸索末端からの神経細胞への感染能は同等であることが明らかとなった。このように、両株の軸索末端から神経細胞への伝達能は同等である一方で、マウス筋肉内にウイルスを接種した場合には、神経細胞への CE(NiP)株の感染効率が Ni-CE 株よりも高いことが示された。このことから、西ヶ原株の P 蛋白質は、筋肉細胞でのウイルス増殖に寄与することで、間接的に末梢神経への感染を促進する機能をもつことが予測された。

第三章では、筋肉細胞における西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiP)株の増殖性を培養細胞 (*in vitro*) 及びマウス組織 (*in vivo*) で比較した。その結果、培養筋肉細胞、ならびにマウス大腿筋における西ヶ原株及び CE(NiP)株の増殖性は、Ni-CE 株よりも高いことが示された。したがって、西ヶ原株の P 蛋白質が、筋肉細胞でのウイルス増殖に重要であると考えられた。

これまでに、狂犬病ウイルス P 蛋白質がインターフェロン (IFN) のアンタゴニストとして機能し、同ウイルスの病原性に関連することが報告されている。そこで第四章では、筋肉細胞における西ヶ原株及び Ni-CE 株 P 蛋白質の IFN 産生抑制能について *in vitro* 及び *in vivo* で検証を行った。西ヶ原株及び CE(NiP)株を感染させた培養筋肉細胞における *Ifn-β* の mRNA、ならびに IFN 誘導遺伝子群である *Mx1* 及び *Oas1* の mRNA 発現量は、Ni-CE 株感染に比べて有意に低かった。また、西ヶ原株及び CE(NiP)株感染マウスの大腿筋における *Ifn-β* の mRNA 発現量も、Ni-CE 株感染に比べて低い傾向が示された。したがって、西ヶ原株の P 蛋白質は Ni-CE 株の同蛋白質に比べ、筋肉細胞において効果的に IFN 産生を抑制する機能を有すると考えられた。

以上、西ヶ原株の P 蛋白質は、その IFN アンタゴニスト機能によって筋肉細胞におけるウイルス増殖性を高め、結果として、末梢神経へのウイルス感染を促進する役割を持つと考えられた。

本研究では、P 遺伝子が狂犬病ウイルスの中枢神経侵入性に関連することを初めて明らかにした。また、末梢神経への狂犬病ウイルスの感染能と、筋肉細胞での同ウイルスの増殖能が、正の相関関係にあることを初めて実験的に示した。本研究により得られた知見は、狂犬病に対してより効果的な暴露後予防法を開発する上で有用な情報となることが期待される。

審査結果の要旨

狂犬病は、感染後直ちにワクチンを接種することにより発症を防ぐことが可能である

(暴露後予防法)。狂犬病ウイルス(RV)は感染動物の咬傷部位付近の末梢神経から脊髄を上行し、脳で増殖して感染動物を発症させる。したがって、RVの中枢神経侵入機序の解明は、暴露後予防法の効果を高めるために重要である。そこで、中枢神経侵入性に違いがあるRV固定毒の西ヶ原(Ni)株及び同株鶏胚線維芽細胞馴化 Ni-CE 株を比較検討することにより、RVの同機序の解明を行った。

Ni-CE株のN, P, M, GあるいはL遺伝子を、Ni株由来のそれぞれの遺伝子で置換したキメラウイルス株をマウスの大腿筋に接種した。その結果、Ni-CE株のゲノムにNi株のP遺伝子を保有するCE(NiP)株が最も高率にマウスを発症させ、両株の中枢神経侵入性の違いには、P遺伝子が主に関連することを明らかにした。

次に、Ni株、Ni-CE株及びCE(NiP)株の末梢から神経細胞への伝達性について検討を行った。全ての感染マウスにおいて、接種部位の大腿筋からRV遺伝子が検出された。一方、Ni株及びCE(NiP)株接種群では、脳、脊髄及び坐骨神経からRV遺伝子が検出されたのに対し、Ni-CE株接種群では検出されなかった。さらに、神経細胞の分離培養系マイクロ流体プラットフォームを用いた検討により、CE(NiP)株と同様にNi-CE株も軸索末端から神経細胞への感染能を持つことを示した。このことから、Ni株のP蛋白質は、筋肉細胞でのウイルス増殖に寄与し、間接的に末梢神経への感染を促進する機能をもつと考えられた。

また、培養筋肉細胞及びマウス大腿筋におけるNi株及びCE(NiP)株の増殖性がNi-CE株よりも高い成績であったことから、Ni株のP蛋白質が筋肉細胞でのウイルス増殖に重要であることが示唆された。さらに、Ni株及びCE(NiP)株感染培養筋肉細胞における*Ifn-β*及びIFN誘導遺伝子群のmRNA発現量が、Ni-CE株感染に比べて有意に低く、マウス的大腿筋でも同様の傾向を示したことから、Ni株のP蛋白質は、Ni-CE株に比べ筋肉細胞において効果的にIFN産生を抑制することが明らかとなった。

以上、Ni株のP蛋白質は、そのIFNアンタゴニスト機能によって筋肉細胞でのRVの増殖性を高め、末梢神経への感染を促進する役割を持つことを示した。本研究により得られた知見は、狂犬病に対してより効果的な暴露後予防法を開発する上で有用な情報となることが期待できる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness
著 者 名 : Yamaoka, S., Ito, N., Ohka, S., Kaneda, S., Nakamura, H., Agari, T., Masatani, T., Nakagawa, K., Okada, K., Okadera, K., Mitake, H., Fujii, T. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : Journal of Virology
巻・号・頁・発行年 : 87(22): 12327-12338, 2013

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity

著者名：Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S. and Sugiyama, M.

学術雑誌名：Virus Research

巻・号・頁・発行年：155 (1): 168-174, 2011

- 2) 題目：Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P [29] and G24P [33] strains provides evidence for interspecies transmission

著者名：Abe, M., Ito, N., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Kanamaru, Y., Suzuki, H., Shibano, K., Arashi, Y. and Sugiyama, M.

学術雑誌名：Journal of General Virology

巻・号・頁・発行年：92(4): 952-960, 2011

- 3) 題目：Amino acid substitution at position 95 in rabies virus matrix protein affects viral pathogenicity

著者名：Ito, N., Mita, T., Shimizu, K., Ito, Y., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Abe, M., Okadera, K., Minamoto, N. and Sugiyama, M.

学術雑誌名：The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年：73(10): 1363-1366, 2011

- 4) 題目：Generation of a live rabies vaccine strain attenuated by multiple mutations and evaluation of its safety and efficacy

著者名：Nakagawa, K., Ito, N., Masatani, T., Abe, M., Yamaoka, S., Ito, Y., Okadera, K. and Sugiyama, M.

学術雑誌名：Vaccine

巻・号・頁・発行年：30(24): 3610-3617, 2012

- 5) 題目：Importance of rabies virus nucleoprotein in viral evasion of interferon response in the brain

著者名：Masatani, T., Ito, N., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S., Okadera, K. and Sugiyama, M.

学術雑誌名：Microbiology and immunology

巻・号・頁・発行年：57(7): 511-517, 2013

- 6) 題目：Evidence of natural transmission of group A rotavirus between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Japan

著者名：Okadera, K., Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Yamasaki, A., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S. and Sugiyama, M.

学術雑誌名：Infection, Genetics and Evolution

巻・号・頁・発行年：20: 54-60, 2013