

博士論文

論文題目

アカバネウイルスの神経病原性
に関する病理学的検討

氏名 村田 洋介

緒論.....	2
第1章 BALB/c マウスにおけるアカバネウイルス OBE-1 株、Iriki 株の神経病原性に関する病理学的検討.....	7
序	8
材料と方法.....	10
結果.....	14
考察.....	17
要約.....	22
図表.....	23
第2章 マウスの脊髄神経細胞におけるアカバネウイルスの細胞傷害性に関する病理学的検討.....	34
序	35
材料と方法.....	37
結果.....	42
考察.....	45
要約.....	50
図表.....	51
第3章 SOD1 ^{G93A} トランスジェニックマウスの脊髄病変におけるアカバネウイルス感染の影響についての病理学的検討.....	60
序	61
材料と方法.....	64
結果.....	69
考察.....	72
要約.....	75
図表.....	76
総括.....	85
謝辞.....	90
引用文献	91

緒論

アカバネウイルス (AKAV) は、ブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属に属しエンベロープを有する（マイナス）一本鎖 RNA ウイルスであり、ヌカカ等の吸血性節足動物を介して牛、めん羊、山羊などの反芻獣に感染し、アカバネ病を引き起こす[Kurogi *et al.*, 1987; Yanase *et al.*, 2005]。妊娠獣は感染が成立しても臨床症状を示さないが、胎盤を経由して胎子に感染すると流死産や早産が発生し、感染胎子や新生子には水無脳症・関節拘縮症候群などの先天性異常が認められる。どの病変が発現するかは、感染する時期と胎子の成長とに密接に関連している。妊娠早期の感染では流死産、中期では大脳欠損や関節拘縮、後期では非化膿性脳脊髄炎がみられる。流産胎子の脳には非化膿性脳炎、骨格筋には多発性筋炎がみられ、また奇形新生子の脳は菲薄化し層構造が認められず、骨格筋には単核で横紋が認められない小径筋線維を特徴とする矮小筋症が認められる[Konno *et al.*, 1982]。このような病態は、水無脳症・関節拘縮症候群と呼ばれており、水無脳症に関しては非化膿性脳脊髄炎の、関節拘縮は筋形成期に生じた筋炎の二次病変であると考えられている[Tanaka *et al.*, 2010]。アカバネ病は、日本では届出伝染病に指定され、特に南九州地域で大規模な流行がみられる重要な疾患であるが、韓国、台湾、イスラエル、オーストラリア、ケニアなど、アジア、オセアニア、アフリカ各国でも発生が報告されており、世界規模で畜産業に多大な損失を与えている[Bishop *et al.*, 2004; Davies FG *et al.*, 2004; Hirata *et al.*, 2008; Jagoe *et al.*, 1993; Kamta *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 1996; Shimshony, 2002]。媒介節足動物のヌカカの活動地域を中心に九州から本州で散発的に発生が報告されており、近年発生地域は徐々に北上している[Kamta *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2007]。

AKAV には変異体が多く存在し、これらの抗原性、病原性は多様である[Akashi and Inaba, 1997; Kamta *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2007; Ogawa

et al., 2007; Yamakawa *et al.*, 2006]。国内分離株は遺伝子解析により大きく二つのグループに分けられ、主要な株としてそれぞれ OBE-1 株と Iriki 株が知られている[Akashi *et al.*, 1997]。OBE-1 株は、胎盤を通じて胎子に感染し、流死産、早産、水無脳症・関節拘縮症候群を引き起こす(図 0)。一方、Iriki 株は生後感染により新生子牛や若齢牛に脳脊髄炎を起こし(図 0)、それに起因する神経症状(起立不能、振戦、運動失調など)が現れる。OBE-1 株と Iriki 株に関する疫学的研究報告は多くみられるが、病原性の相違について解析した報告は限られている。また、対象が大型家畜であるため感染実験が難しく、アカバネ病の病理発生には依然不明な点が多い。

一方、ヒトの運動神経疾患である筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis : ALS)は上位および下位の運動神経細胞の選択的変性・脱落を特徴とし、全身の筋萎縮をきたす進行性・難治性の神経変性疾患群である。ALS では、初期にミトコンドリア障害および軸索輸送障害が起こり、発症後は酸化ストレス、興奮毒性およびタンパク質分解系の異常による変性タンパク質の蓄積が生じ、これらが互いに関連して病態が進行すると考えられている[Kong and Xu, 1998; Manfredi and Xu, 2005; Swarup and Julien, 2011; Williamson and Cleveland, 1999]。ALS の研究には、変異 superoxide dismutase 1 (SOD1) を強制発現させたトランスジェニックマウスが運動神経細胞変性過程の動物モデルとして汎用されてきた[Swarup and Julien, 2011; Jucker, 2010]。このモデルマウスでは、脊髓腹角の運動神経細胞の脱落に先立ち、神経細胞体および神経網において空胞変性がみられる。また、変異 SOD1 の蓄積によるミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体の脆弱性も指摘されており、病変形成との関係が報告されている[Higgins *et al.*, 2003; Jaarsma *et al.*, 2000; Mourelatos *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 2004; Stieber *et al.*, 2000, 2004; Tobisawa *et al.*, 2003]。

AKAV を始めとするオルソブニヤウイルスは、細胞表面レセプターに接着し、エンドサイトーシス経路により細胞内に侵入する。侵入後、エンドゾーム膜とウイルスエンベロープの膜融合により脱殻し、転写・翻訳が開始される。エンベロープ糖タンパク（Gn、Gc）は粗面小胞体上で合成され、糖鎖付加が行われた後、ゴルジ体膜上に蓄積する。ウイルスゲノムの複製は細胞質内で行われ、複製された後、リボヌクレオプロテインを形成すると、ゴルジ体膜上に蓄積されたエンベロープ糖タンパクと会合する。その後、ゴルジ体内に出芽してウイルス粒子となり、エキソサイトーシスにより細胞外に放出される[Walter and Barr, 2011]。しかしながら、感染したブニヤウイルスによる細胞傷害についての情報は乏しく、アポトーシスの誘導や、標的細胞小器官として、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体が挙げられているものの、詳細は不明である。そのため、感染侵入経路、細胞内動態以外の感染機構の解明は、AKAV の病原性発現機構を解明する上で必須である。

本研究において、第 1 章では、AKAV の OBE-1 株と Iriki 株との病原性の比較を BALB/c マウスを用いて行うとともに、マウスの中枢神経系における AKAV 抗原の分布について詳細な検索を行った。第 2 章では、ALS のモデルマウスにおける細胞小器官の脆弱性に着目して、細胞小器官の形態的变化、アポトーシス関連因子を中心に、AKAV の神経細胞に対する細胞傷害機序を検討した。一方、第 3 章では、ALS モデルマウスの病変への AKAV 感染の影響について、凝集タンパク質、オートファジー関連因子の関連を検討することで、ALS などの神経変性疾患の病態における神経向性ウイルス感染の関与を評価した。

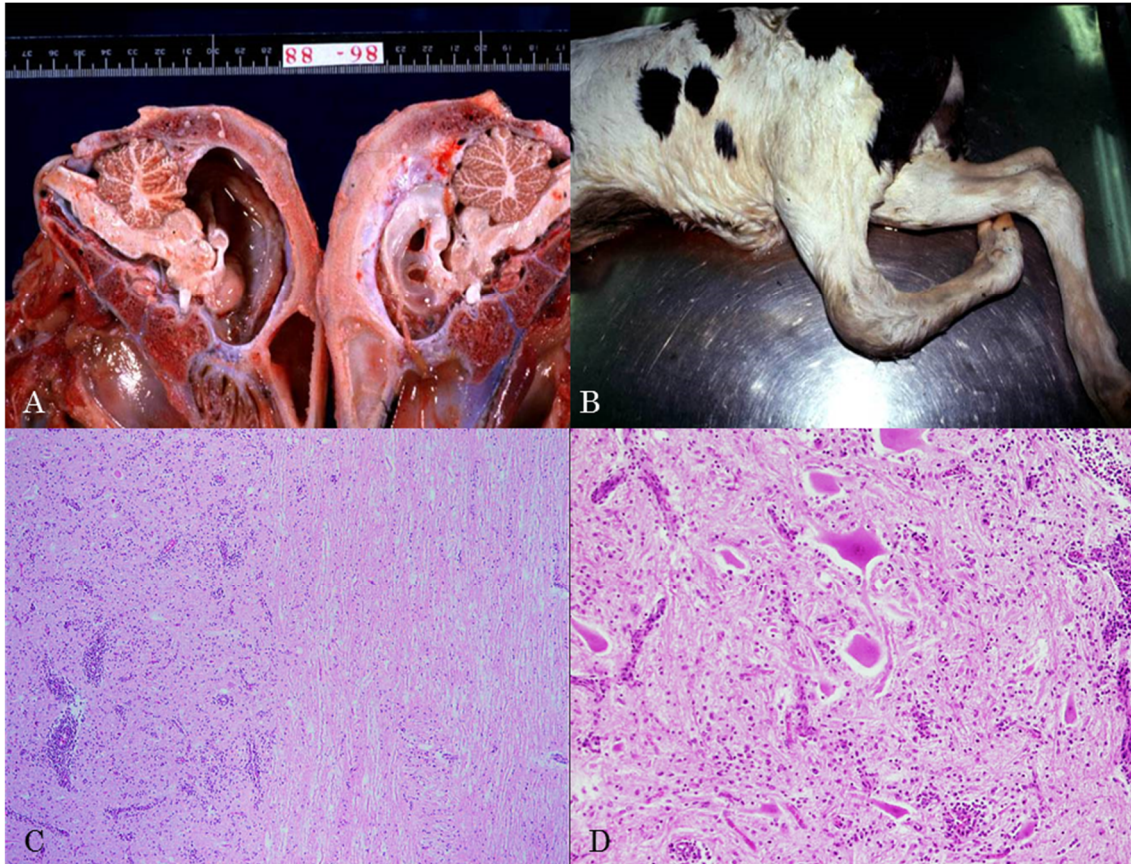


図 0: AKAV 感染牛の病変。OBE-1 株感染による水無脳症 (A) と関節拘縮 (B)。
Iriki 株感染による非化膿性脳炎の組織像。C: 脊髄縦断面。D: 延髄横断面。
東京大学 内田和幸博士提供

第1章

BALB/c マウスにおけるアカバネウイルス
OBE-1 株、Iriki 株の神経病原性に関する病理学的検討

序

AKAV には変異体が多く存在し、これらの抗原性、病原性は多様である。また、AKAV は、N 遺伝子の翻訳領域に基づいて 4 つのクラスターに分類されている。国内分離株はそのうちの 2 つのクラスターに属し (図 1-1)、主要な株としてそれぞれ OBE-1 株と Iriki 株が知られている [Akashi and Inaba, 1997; Akashi *et al.*, 1997; Kamta *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2007; Yamakawa *et al.*, 2006]。OBE-1 株は、アカバネ病が 1972~74 年に九州から本州にかけて大流行した際に分離された株で、現在、弱毒性ワクチンの標準株となっている [Kurogi *et al.*, 1976]。一方、Iriki 株は 1984 年に脳脊髄炎を発症した若齢牛から分離された株で、胎子への感染だけでなく、新生子牛や若齢牛への感染も確認されている [Hirata *et al.*, 2008; Kamta *et al.*, 2009; Miyazato *et al.*, 1989; Uchida *et al.*, 2000]。Iriki 株が属する *genogroup* I には、生後感染により新生子牛や若齢牛に脳脊髄炎や起立不能などの神経症状を引き起こすウイルス株が、OBE-1 株が属する *genogroup* II には、胎子に感染し流死産、水無脳症・関節拘縮症候群を引き起こすウイルス株がそれぞれ多く存在する。

OBE-1 株感染は、水無脳症・関節拘縮症候群と呼ばれる病態を示すが、水無脳症は非化膿性脳脊髄炎の、関節拘縮は筋管形成期の感染による筋炎のそれぞれ二次病変であると考えられている [Tanaka *et al.*, 2010]。また、牛、めん羊、山羊、マウス、ハムスター、ウサギ、モルモットおよび鶏胚を用いた感染実験が行なわれ [Konno and Nakagawa, 1982; Konno *et al.*, 1988; Kurogi *et al.*, 1977; Nakajima *et al.*, 1979, 1980; Narita *et al.*, 1979; Nakatani *et al.*, 2010; Parsonson *et al.*, 1977]、中枢神経組織および骨格筋に親和性を有し、胎子に感染して非化膿性脳脊髄炎、多発性筋炎を起こすことが報告されている [Kitani *et al.*, 2000; Konno *et al.*, 1982, 1988; Parsonson *et al.*, 1977]。しかしながら、新

生子牛や若齢牛は、感染しても一過性のウイルス血症を引き起こすだけで、症状は認められない[Konno and Nakagawa, 1982]。一方、Iriki 株は、脳内接種実験により新生子牛に非化膿性脳脊髄炎を起こすことが確認されている[Miyazato *et al.*, 1989]。しかし、げっ歯類などの実験動物を用いた研究はほとんど行われていない[Nakajima *et al.*, 1980; Oem *et al.*, 2012]。そのため、OBE-1 株と Iriki 株に関する疫学的研究は多いのにもかかわらず、病原性の相違についての解析研究は少ない。

本章では、AKAV の OBE-1 株と Iriki 株との病原性を比較するために、小型実験動物であるマウスを用いた感染実験を行い、マウスの週齢および接種経路による生存率、マウスの週齢による神経病原性をそれぞれの株について検討するとともに、マウスの中樞神経系における AKAV 抗原の分布を詳細に検索した。

材料と方法

動物

(株) 日本クレア (東京) より入手した 3 日齢、1 週齢、2 週齢、3 週齢、8 週齢の BALB/c マウスを使用した。マウスには、自由給水させ、ペレット状固形飼料 (MS 飼料、オリエンタル酵母、東京) を給餌した。設定温度 : 23°C (許容範囲 : 20~26°C)、設定湿度 : 55% (許容範囲 : 40~70%)、明期 14 時間 (照明 : 午前 8:00~午後 10:00) : 暗期 10 時間に維持された動物飼育室で飼育した。

ウイルス

ウイルスは東京大学大学院農学生命科学研究科獣医微生物学研究室にてハムスター肺由来細胞 (HmLu-1-1) 細胞を用いて無血清培地で継代、維持した AKAV OBE-1 株と AKAV Wild type Iriki 株を使用した。HmLu-1 細胞は 5% ウシ血清 (FCS) 加 Dulbecco's modified MEM (DMEM) 培地を用いて、37°C、5%CO₂ で培養、継代した。ウイルス力価は、HmLu-1 細胞を用いたプラックアッセイ法で測定した。

接種実験

本実験は、3 つの実験群により構成される (表 1-1)。実験 1 は、3 日齢、8 週齢のマウスに AKAV OBE-1 株または Iriki 株を腹腔内または大脳皮質内接種し、感染マウスの死亡率を検討した。実験 2 では、3 日齢、1、2、3、8 週齢のマウスに AKAV OBE-1 株または Iriki 株を腹腔内または大脳皮質内接種し、組織病変、週齢による神経病原性の変化を検討した。実験 2 の結果を受け、実験 3 では、8 週齢のマウスに AKAV Iriki 株を大脳皮質内または線条体内接種

し、マウス中枢神経系における AKAV 抗原の分布の詳細な検索を行った。動物実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会を経て、部局長の承認を得たうえで、東京大学動物実験実施規定に従って行った。

実験 1：感染マウスの死亡率

3 日齢または 8 週齢のマウスに AKAV OBE-1 株あるいは Iriki 株 5×10^4 PFU/0.1mL を腹腔内に 100 μ L または大脳皮質内に 5 μ L 接種した。接種後 21 日間生存を観察した。

実験 2：マウスの週齢による神経病原性の変化

3 日齢、1、2、3、8 週齢のマウスに AKAV OBE-1 株または Iriki 株 5×10^4 PFU/0.1mL を腹腔内に 100 μ L または大脳皮質内に 5 μ L 接種した。マウスは接種 3、5、7、9 日後にイソフルランで安楽死処置し、それぞれ脳および大腿筋を採取した。また、瀕死状態および死亡マウスについても、同様に組織を採取した。採取組織を 10% リン酸中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋したのち、厚さ 4 μ m で切片を作製した。切片はキシレンで脱パラフィンした後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および抗 AKAV 抗体を用いた免疫染色を行った。ウイルス抗原陽性細胞数は、6 冠状断面における陽性細胞数を測定し、平均値を算出した。

実験 3：マウス中枢神経系における AKAV 抗原の分布

8 週齢のマウスに AKAV Iriki 株 5×10^2 または 5×10^4 PFU/0.1mL を大脳皮質内に 5 μ L、AKAV Iriki 株 5×10^4 PFU/0.1mL を線条体内に 1 μ L 接種した。マウスは接種 1～4 日後に上述のように安楽死処置し、それぞれ脳および脊髄を

採取した。また、瀕死状態および死亡マウスについても、同様に組織を採取した。採取脊髄組織を 10%リン酸中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋したのち、厚さ 4 μ m で切片を作製した。採取脳組織は、Bregma を基準にして、AP : 2.00mm から -8.00mm にかけて、冠状断で厚さ 4 μ m の連続切片を作製した。切片はキシレンで脱パラフィンした後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および抗 AKAV 抗体を用いて免疫染色し、マウス脳アトラス[Paxinos and Franklin, 2008]に記載されている脳地図上に AKAV 抗原陽性部位をプロットした。陽性部位に関しては、その陽性の程度を染色程度に従って 3 段階 (+1~+3) にスコア化した。各個体で部位ごとのスコア平均値を算出し、その値をもとに個体群の平均値を求め、それを各接種条件群の部位スコアとした。

いずれもコントロール群として、ウイルス液の代わりに DMEM を投与した。

大脳皮質および線条体内接種

大脳皮質内接種は、Bregma を基準にして、anterior-posterior (AP) : -1.0mm、medial-lateral (ML) : +2.0mm、dorsal-ventral (DV) : +1.0mm に、2 段針を用いて行った。また、線条体内接種は脳定位固定装置を用いて、Bregma を基準にして、AP : 0.5mm、ML : 1.8mm、DV : 3.5mm に行った。ウイルス液は、0.1 μ L/min の速度で注入し、注入後 5 分間その場で針を静置した。

免疫染色

脱パラフィンした組織切片を 3%過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング溶液 (8%スキムミルク・TBS) で 37°C、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、TBS で希

積したウサギ抗 AKAV OBE 株血清（1:500, 動物衛生研究所・津田知幸先生提供）と 4℃で一晩反応させた。その後、Envision polymer（Dako, Glostrup, Denmark）法により二次抗体と 37℃で 40 分間反応させた。0.5 % DAB（Dojindo Laboratories、熊本）溶液に 0.1%になるよう H_2O_2 （和光純薬、大阪）を添加した溶液を用いて発色した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

結果

実験 1：感染マウスの死亡率

OBE-1 株を接種したマウスは、接種経路、週齢によらず、死亡率は 0% であった。一方、Iriki 株を腹腔内接種した場合、3 日齢マウスは接種 4 日後より死亡する個体がみられたが、8 週齢マウスの死亡率は 0% であった。Iriki 株を大脳皮質内接種すると週齢によらず高い致死率を示し、3 日齢マウスでは接種 3 日後から 5 日後、8 週齢マウスでは接種 4 日後から 7 日後までに、すべての個体が死亡した（図 1-2）。

実験 2：マウスの週齢による神経病原性の変化

1) AKAV 接種 3 日齢マウスにおける組織病変

OBE-1 株腹腔内接種マウスでは大腿筋の筋衛星細胞にのみウイルス抗原が認められ、脳では病変およびウイルス抗原は認められなかった。一方、Iriki 株を腹腔内接種したマウスの脳では、接種 4 日後から大脳皮質、大脳白質、小脳皮質、小脳白質、脳幹部の神経細胞、血管内皮細胞の細胞質にウイルス抗原が検出され、これらの領域において軽度の囲管性細胞浸潤や神経細胞の変性・壊死、血管内皮細胞の腫大などが認められた（図 1-3）。また、OBE-1 株、Iriki 株接種マウスにおいて、大腿筋のウイルス抗原は接種後徐々に減少し、接種 10 日後には認められなくなった。

OBE-1 株、Iriki 株を大脳皮質内接種したマウスの脳では、それぞれ接種 5 日後、3 日後からウイルス抗原が検出された。OBE-1 株接種マウスでは、接種 7 日後に軽度の神経細胞の変性・壊死、囲管性細胞浸潤が認められた。一方、Iriki 株接種マウスの病変は、ウイルス抗原が分布する部位を中心とする神経細胞の重度壊死であり、血管内皮細胞の腫大や囲管性細胞浸潤は乏しかった

(図 1-3)。また、ウイルス抗原の分布は、両株接種とも Iriki 株腹腔内接種マウスのそれと同様、大脳、小脳、脳幹部の神経細胞、血管内皮細胞で検出されたが、ウイルス抗原量は OBE-1 株接種マウスに比べ、Iriki 株接種マウスが顕著に多かった (図 1-4)。

2) AKAV 接種マウスの週齢による神経病原性の相違

OBE-1 株接種マウスでは、週齢および接種経路によらず死亡個体は認められなかった。一方 Iriki 株腹腔内接種マウスでは、3 日齢、1 週齢マウスに接種した際死亡個体が認められたが、2 週齢以降のマウスでは死亡個体はみられなかった。Iriki 株大脳皮質内接種マウスでは、週齢によらずいずれもが高い死亡率を示した (表 1-3)。

OBE-1 株腹腔内接種マウスの脳では、週齢によらずウイルス抗原は認められなかったが、大脳皮質内接種マウスでは 3 日齢から 3 週齢まで認められ、8 週齢ではみられなかった。一方、Iriki 株大脳皮質内接種マウスの脳では、週齢によらずウイルス抗原が認められたが、腹腔内接種では 3 日齢、1 週齢マウスでしかみられなかった。ウイルス抗原は、3 日齢マウスの脳では大脳、小脳、脳幹に分布していたが、2 週齢以降、大脳から検出されるウイルス抗原の量は著しく減少し、8 週齢マウスでは脳幹にのみ限局していた (図 1-5)。

実験 3 : マウス中枢神経系における AKAV 抗原の分布

Iriki 株 5×10^4 PFU を大脳皮質に接種したマウスの脊髄では、接種 3 日後から頸髄～腰髄灰白質にウイルス抗原がび漫性に認められた。 5×10^2 PFU 接種では接種 4 日後において頸髄～腰髄灰白質の主に腹角にウイルス抗原がみられた (図 1-6)。

一方、Iriki 株 5×10^4 PFU を線条体に接種したマウスでは、接種 2 日後から脳でウイルス抗原が検出され、局在部位数は経日的に増加した。また、接種 2 日後から 3 日後までの感染初期の多くのマウスで、subventricular zone (SVZ) を含む脳室周囲の領域にウイルス抗原が認められた (図 1-7)。脊髄では接種 3 日後から、頸髄～腰髄の腹角を中心にウイルス抗原がみられた (図 1-6)。

Iriki 株の接種部位・接種量にかかわらず、ウイルス抗原は間脳、中脳、橋、延髄など一定の領域に局限した。ウイルス抗原が中程度から重度に検出された部位は、視床、視床下部、橋背側、網様体、赤核、動眼神経核、三叉神経核、前庭神経核であった (表 1-3)。また、左右大腦半球、中脳、間脳、橋、延髄などを連絡する結合線維と、上記神経核の投射線維でも軽度ではあるがウイルス抗原が認められた (表 1-4)。

考察

AKAV OBE-1 株を用いた感染実験のこれまでの報告では、腹腔内接種マウスは神経症状を示さないのに対し、脳内接種マウスは中枢神経組織に炎症を引き起こすとされている[Nakajima *et al.*, 1979, 1980; Oem *et al.*, 2012]。本章の結果においても、Iriki 株腹腔内接種マウスは致死的な神経症状を示し、脳でウイルス抗原が認められたのに対し、OBE-1 株腹腔内接種マウスは神経症状を示さず、脳でウイルス抗原はみられなかった。OBE-1 株および Iriki 株腹腔内接種マウスにおいて、大腿筋組織でウイルス抗原が認められたことから、腹腔内接種によりウイルス感染は成立していたと考えられる。以上より、OBE-1 株、Iriki 株ともに腹腔内接種によってマウスに感染できるが、Iriki 株と違い、OBE-1 株は中枢神経組織に侵入できないと考えられた。これらの結果は、非化膿性脳炎を示す野外での牛の生後感染例において、分離されるウイルス株の多くが Iriki 株グループに属していることと一致する[Akashi *et al.*, 1997]。一方、脳内接種では、OBE-1 株の場合、これまでの報告[Nakajima *et al.*, 1979, 1980]と同様、本研究でも脳内でウイルスの増殖が確認され、炎症反応も認められた。Iriki 株脳内接種マウスでは、OBE-1 株接種マウスに比べてより早期に、致死的な症状が認められ、ウイルス抗原も多数確認された。以上の結果から、OBE-1 株もマウス脳内に接種すれば脳内で増殖するが、Iriki 株のほうがより高い脳内増殖能を有することが分かった。AKAV と同じブニヤウイルス科に属するラクロスウイルスを用いた感染実験において、腹腔内接種は末梢におけるウイルスの増殖性および中枢神経組織への侵入性を、脳内接種は中枢神経組織におけるウイルスの増殖性を評価するうえで有用と示されている[Janssen *et al.*, 1986]。今回の実験において、脳内接種および腹腔内接種実験の双方で、Iriki 株は OBE-1 株よりも強い病原性を示した。このことから、マウス中枢神経組織への侵入性およ

びマウス中枢神経組織での増殖性において、Iriki 株は OBE-1 株よりも強毒であることが明らかになった。

牛の野外例、鶏胚や羊を用いた感染実験より、AKAV 感染時の胎齢によって形成される病変が異なることが確認されている [Konno and Nakagawa, 1982; Konno *et al.*, 1988; Nakatani *et al.*, 2010]。今回の実験では、Iriki 株を腹腔内接種した場合、1 週齢までは致死的な神経症状がみられたのに対し、2 週齢以降ではすべてのマウスが生存し脳でウイルス抗原は確認されなかった。一方、Iriki 株を脳内接種すると、週齢によらず致死的な神経症状が認められ、脳でウイルス抗原が確認された。また、OBE-1 株を腹腔内接種した場合、いずれの週齢でも脳でウイルス抗原が認められなかったが、脳内接種すると、3 週齢まで脳にウイルス抗原が認められた。これらの結果は、OBE-1 株の場合、中枢神経組織への浸潤性および中枢神経組織での増殖性が週齢依存性に低下するのに対し、Iriki 株では侵入性において週齢依存性に低下するが、増殖性は維持されることを示しており、成牛における Iriki 株の増殖性についての報告例と一致する [Miyazato *et al.*, 1989; Nakatani *et al.*, 2010; Uchida *et al.*, 2000]。また、今回、ウイルスの中枢神経への侵入性が週齢依存性に低下したことは、AKAV を接種したマウスの週齢と血液脳関門（BBB）の発達との関係で説明できると考えられた [Vorbrodt *et al.*, 1986]。

Iriki 株を大脳皮質内接種した際に、脳幹部の特定領域にウイルス抗原が局在した。このことは、牛の Iriki 株野外感染症例において、病変が主に脳幹部に局限することと一致する [Nakatani *et al.*, 2010; Uchida *et al.*, 2000]。次に、Iriki 株を大脳皮質内に接種した時にウイルス抗原が確認されず、かつウイルス液を接種するのに十分な大きさがある線条体に接種することで、接種部位によ

りウイルス抗原の分布傾向が変化するかを検討したところ、ウイルスは接種量や接種部位にかかわらず、視床、視床下部、橋背側、網様体、赤核、動眼神経核、三叉神経核、前庭神経核などの脳幹部に重度に局在していた。脊髄では、主に腹核の神経細胞に分布していた。子牛の Iriki 株野外感染症例においても AKAV 抗原が脊髄灰白質および腹根で高率に検出されており、これらの部位の病変が起立不能などの運動機能障害の原因であるとされている [Kamata *et al.*, 2009; Kurogi *et al.*, 1977; Nakatani *et al.*, 2010]。また、一般的にアカバネ病の異常産子牛では、脊髄腹角神経細胞の脱落が顕著に認められる [Tanaka *et al.*, 2010]。以上のことから、AKAV は動物種によらず、脳幹部や脊髄の運動神経などに親和性が高く、これらの部位への感染がアカバネ病における運動機能障害を引き起こすと推察された。

げっ歯類の SVZ には神経幹細胞、神経芽細胞、神経前駆細胞が存在する [Doetsu *et al.*, 1999; Laywell *et al.*, 1999, 2000; Taupin and Gage, 2002]。Iriki 株を線条体内接種すると、接種 2 日後からこの領域にウイルス抗原が認められたことから、AKAV は感染後、まず SVZ の未分化神経細胞に感染すると考えられた。また、3 日齢から 1 週齢までの脳内でび漫性に AKAV 抗原が検出されたことから、アカバネ病感染胎子で認められる水無脳症は、胎子期に脳全体に分布している未分化神経細胞の広範な脱落に起因すると考えられた。さらに、ウイルス抗原が結合線維、投射線維などにも分布していたことから、AKAV は経神経伝播することが示唆された。

AKAV 感染牛の脳組織では囲管性細胞浸潤を伴う非化膿性脳炎が脳幹部を中心に認められるが、今回のマウスを用いた感染実験では神経細胞の変性・壊死を主体とする病変が脳の各所に認められた。また、子牛の野外感染症例でウイルス抗原が検出された線条体内包には、いずれの Iriki 株感染マウスでもウイ

ルス抗原は検出されなかった[Nakatani *et al.*, 2010]。このように、本実験で用いた接種経路が通常の AKAV 感染の経路とは異なるため、Iriki 株大脳皮質内または線条体内接種マウスの脳における病変やウイルス抗原の分布は、子牛のそれらとは完全には一致しなかった。しかし、マウスにおけるウイルスの病原性や神経向性は、牛におけるそれをよく反映していると考えられた。

これまで AKAV OBE-1 株と Iriki 株のそれぞれを用いた感染実験は多く行われてきたが、病原性の相違を検討した研究報告はほとんどなく、とくにウイルス感染による脳病変の発生過程と組織像について比較した研究は皆無であった。本研究で得られたマウスにおける OBE-1 株と Iriki 株の神経病原性は過去の牛への感染実験や牛の症例の結果と矛盾しなかったことから、AKAV の生後感染における神経病原性の株間の相違は、中枢神経組織への侵入性および中枢神経組織での増殖性によって規定されるものと考えられた。とくに、Iriki 株脳内接種マウスは神経病原性、中枢神経系でのウイルス抗原の分布において、生後牛の AKAV 感染におけるそれらをよく再現していると考えられる。AKAV 感染モデルマウスを用いることで、中枢神経内での AKAV の動態を簡便に再現できることから、このモデルは AKAV の感染機構を解明するのに非常に有用であると考えられた。

本章では、マウス中枢神経組織への侵入性およびマウス中枢神経組織での増殖性において、Iriki 株は OBE-1 株よりも強毒であることを示した。侵入性の低下には、週齢依存性の要素が関与していると思われる。また、AKAV は BBB を通って脳へ侵入した後、まず SVZ の未分化神経細胞に感染し、増殖した後に神経向性の伝播によって、脳幹部の神経核細胞や脊髓腹角の神経細胞に広範分布するものと考えられた。さらに、AKAV の Iriki 株を大脳皮質内または線条体

内に接種したマウスは、生後牛における AKAV 感染のモデルとして有用であることが示された。

要約

AKAV の変異体として、OBE-1 株と Iriki 株が知られている。本章では、BALB/c マウスにおける AKAV の OBE-1 株と Iriki 株の病原性を比較するとともに、中枢神経系における AKAV 抗原の分布を詳細に検索した。腹腔内接種した場合、Iriki 株は 1 週齢までは中枢神経組織への感染が成立し病変が認められたが、OBE-1 株では新生子でも脳にはウイルス抗原や病変は認められなかった。脳内接種した場合、Iriki 株は週齢によらず増殖が維持されたが、OBE-1 株は脳での増殖が週齢依存性に著しく減退した。これらの結果から、マウス中枢神経組織への侵入性およびマウス中枢神経組織での増殖性において、Iriki 株は OBE-1 株よりも強毒であることが明らかになった。また、Iriki 株を大脳皮質、線条体内接種したマウスの中枢神経系では、ウイルスの接種量や接種部位にかかわらず、AKAV 抗原が視床、視床下部、橋背側、網様体、赤核、動眼神経核、三叉神経核、前庭神経核などの脳幹部に重度に局在し、結合線維、投射線維などにも軽度に分布していた。脊髄では、主に腹角の神経細胞に分布していた。また、線条体内接種では、感染初期に、未分化な神経細胞が存在する SVZ においてもウイルス抗原が確認された。以上より、AKAV は BBB を通って脳へ侵入した後、まず SVZ の未分化神経細胞に感染し、増殖した後に神経向性の伝播によって、脳幹部の神経核細胞や脊髄腹角の神経細胞に広範に分布拡大するものと考えられた。

表1-1: AKAV接種実験

<i>Purpose of experiment</i>	<i>Inoculation route</i>	<i>Virus strain</i>	<i>Dose (μl)</i>	<i>PFU ($5.0 \times \sim / 0.1 \text{ ml}$)</i>	<i>Age</i>	<i>Number</i>
Mortality test	i.p.	OBE-1	100	10^4	3d	15
					8w	6
		Iriki	100	10^4	3d	9
					8w	6
		DMEM	100	—	3d	9
					8w	9
	i.c.	OBE-1	5	10^4	3d	9
					8w	7
		Iriki	5	10^4	3d	11
					8w	8
		DMEM	5	—	3d	9
					8w	9
Histopathological examination	i.p.	OBE-1	100	10^4	3d	12
					1w	12
					2w	12
					3w	12
					8w	12
		Iriki	100	10^4	3d	24
					1w	12
					2w	12
					3w	12
					8w	12
		DMEM	100	—	3d	3
					1w	6
					2w	6
					3w	6
					8w	3
	i.c.	OBE-1	5	10^4	3d	12
					1w	12
					2w	12
					3w	12
					8w	12
		Iriki	5	10^4	3d	24
					1w	12
					2w	12
					3w	12
					8w	12
		DMEM	5	—	3d	3
					1w	6
					2w	6
					3w	6
					8w	3
Antigen distribution	i.c.	Iriki	5	10^4	8w	11
					10^2	10
	i.s.	Iriki	1	10^4	8w	10

Inoculation route: i.p., intraperitoneally; i.c., intracerebrally; i.s., intrastriatally

Virus strain: DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium(AKAV非接種対照)

Age: d, day; w, week

表 1-2: マウスの週齢による神経病原性の変化

<i>Examination</i>	<i>Virus strain</i>	<i>Inoculation route</i>	<i>Mouse age</i>				
			<i>3 days</i>	<i>1 week</i>	<i>2 weeks</i>	<i>3 weeks</i>	<i>8 weeks</i>
Mortality	OBE-1	i.p.	S	S	S	S	S
		i.c.	S	S	S	S	S
	Iriki	i.p.	D	D	S	S	S
		i.c.	D	D	D	D	D
Antigen in the brain	OBE-1	i.p.	-	-	-	-	-
		i.c.	+	+	+	+	-
	Iriki	i.p.	+	+	-	-	-
		i.c.	+	+	+	+	+

Inoculation route: i.p., intraperitoneally; i.c., intracerebrally

Mortality: D, death; S, survival

Antigens detection by immunohistochemistry: +, positive; -, negative

表1-3: ウイルス抗原が重度に検出された部位

Interbrain	Thalamus	Subparafascicular thalamic nucleus Intergeniculate leaflet Zona incerta, dorsal part Zona incerta, ventral part
	Hypothalamus	Arcuate hypothalamic nucleus, medial posterior part Dorsal hypothalamic area Dorsomedial hypothalamic nucleus Dorsomedial hypothalamic nucleus, compact part Dorsomedial hypothalamic nucleus, dorsal part Dorsomedial hypothalamic nucleus, ventral part Dorsal tegmental nucleus, pericentral part Dorsal tuberomammillary nucleus Posterior hypothalamic nucleus Peduncular part of lateral hypothalamus
	Pars dorsalis pontis	Barrington's nucleus
	Caudal pontine reticular nucleus	Pontine reticular nucleus, caudal part
	Tegmenti pedunculopontinus	Laterodorsal tegmental nucleus
	Parabrachial nucleus	Lateral parabrachial nucleus, central part Medial parabrachial nucleus
	Locus coeruleus	Locus coeruleus
	Locus subcoeruleus	Subcoeruleus nucleus, dorsal part Subcoeruleus nucleus, ventral part
	Pontinus nervi trigemini	Supratrigeminal nucleus
	Red nucleus	Red nucleus, magnocellular part Red nucleus, parvicellular part
	Nervi oculomotorii	Nucleus of Darkschewitsch Pre-Edinger-Westphal nucleus
	Nuclei vestibulares	Medial vestibular nucleus, magnocellular part Medial vestibular nucleus, parvicellular part
	Pedunculus cerebellaris superior	Superior cerebellar peduncle
	Formatio reticularis	Dorsal paragigantocellular nucleus Gigantocellular reticular nucleus Gigantocellular reticular nucleus, alpha part Parvicellular reticular nucleus, alpha part

表1-4：ウイルス抗原が軽度に出検された部位

	Precommissural nucleus	Precommissural nucleus
	Habenular nucleus	Medial habenular nucleus
		Medial lemniscus
Connective fiber	Corpus callosum	Forceps minor of the corpus callosum
	Raphe	Dorsal raphe, interfascicular part
		Raphe interpositus nucleus
		Raphe magnus nucleus

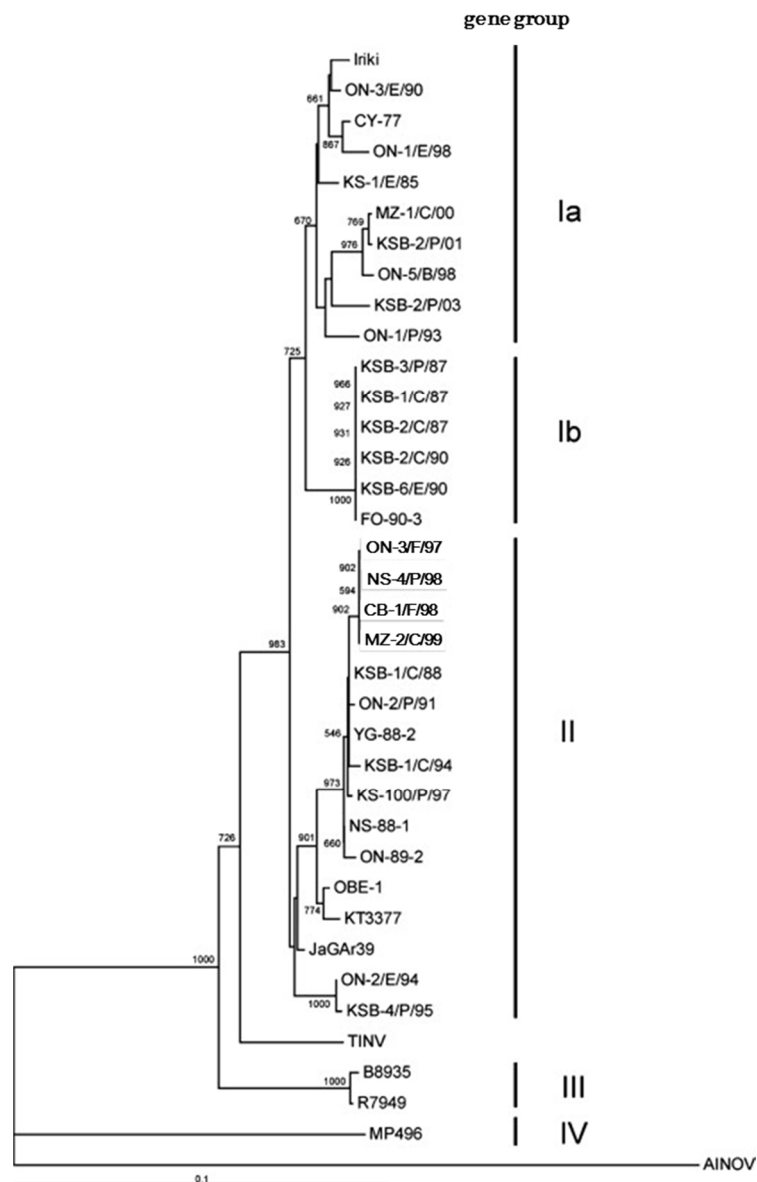


図 1-1 : AKAV 野外分離株の S 分節の N ORF 塩基配列に基づいた系統分類。AKAV は 4 つのクラスター（I ～IV）に分類される。さらに、genegroup I は I a、I b に細分類される。数字は計算 1000 回中のブートストラップ確率を示し、最下部のスケールバーは、座位あたりの 0.1%の置換を表す。

Kobayashi T *et al.*, (2007) Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates. *Virus Research* より一部改訂

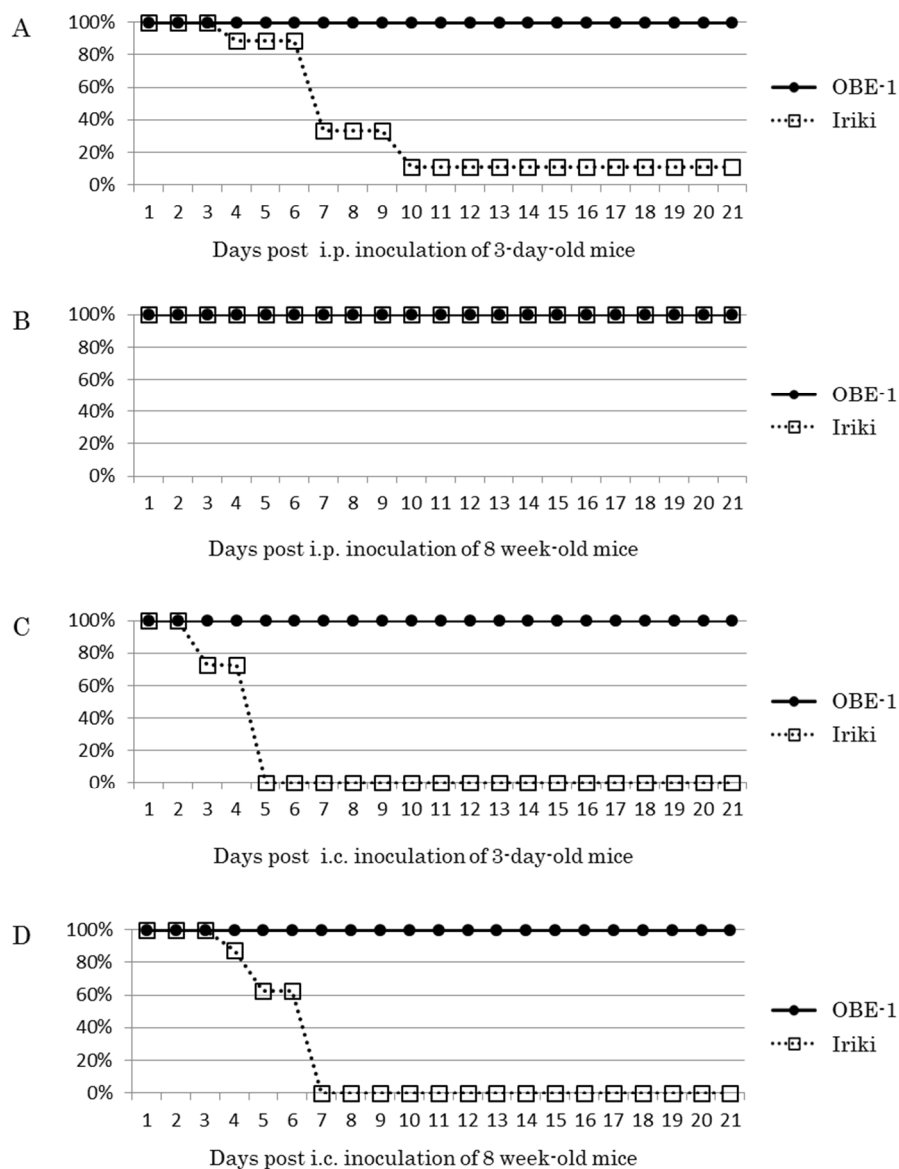


図 1-2 : AKAV の OBE-1 株または Iriki 株を腹腔内 (A,B) または脳内 (C,D) 接種したときの 3 日齢 (A,C) と 8 週齢 (B,D) マウスの生存率。OBE-1 株接種マウスは、接種経路、週齢によらず生存率 100%だったのに対し、Iriki 株接種マウスは 3 日齢で、腹腔内、脳内接種ともに高い致死率を示した。また、8 週齢においては、腹腔内接種で生存率 100%だったが、脳内接種では高い致死率を示した。

i.p.:腹腔内接種、i.c. : 脳内接種

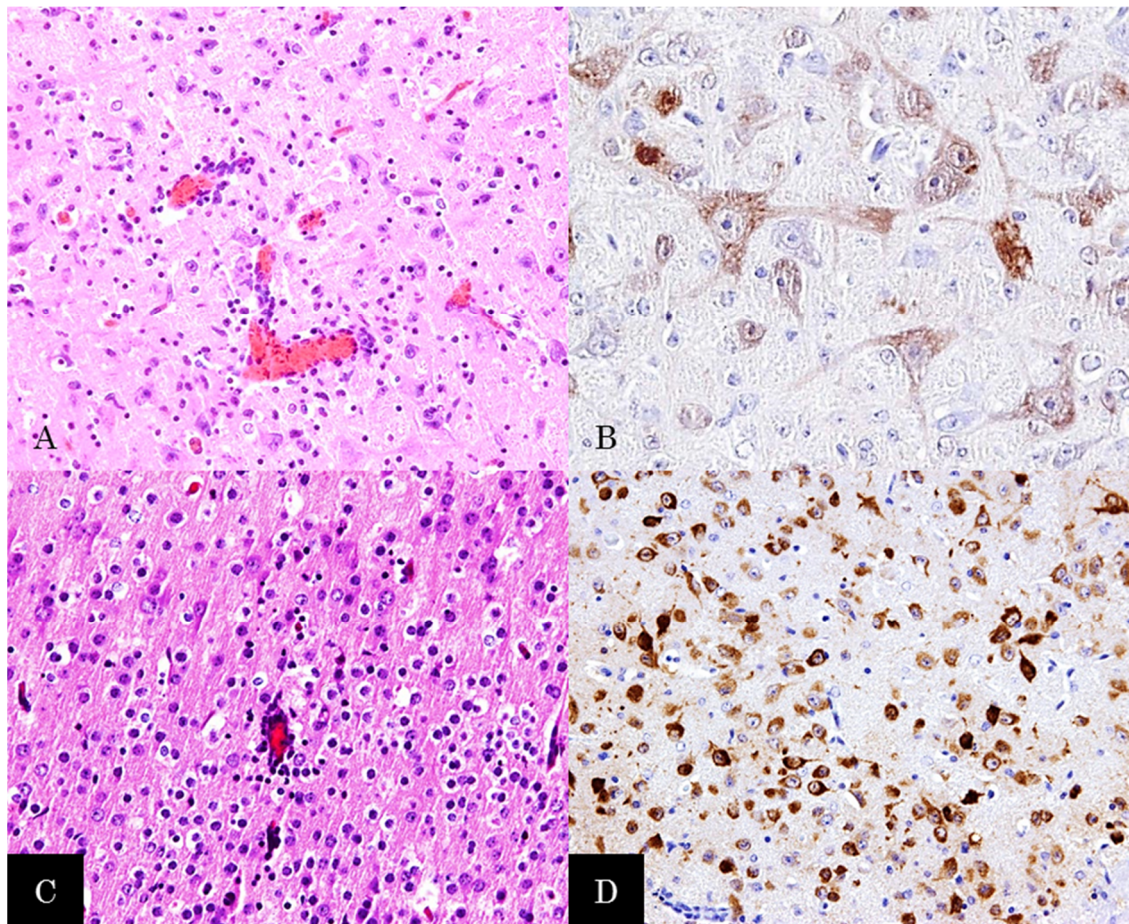


図 1-3 : AKAV 接種 3 日齢マウスの脳の病理組織学的変化。

A、B : OBE-1 株脳内接種。HE 染色 (A)、AKAV 免疫染色 (B)。C、D : Iriki 株脳内接種。HE 染色 (C)、AKAV 免疫染色 (D)。神経細胞の変性・壊死や血管性細胞浸潤などの所見が認められる。これらの病変は腹腔内接種に比べ、脳内接種の方が重度であった。また、病変に一致して、神経細胞の細胞質にウイルス抗原が検出された。

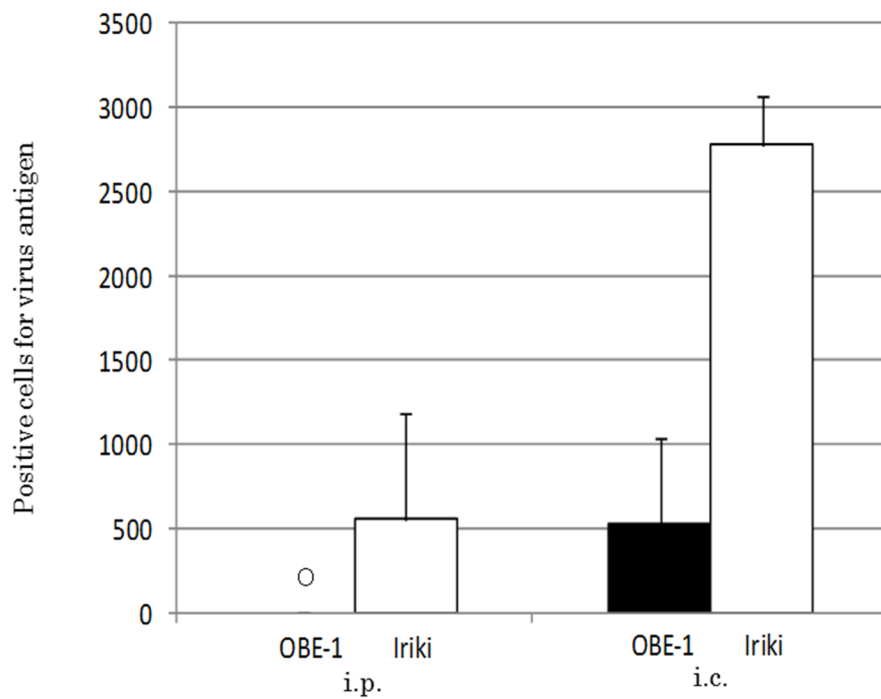


図 1-4 : AKAV 接種 3 日齢マウスの脳全体におけるウイルス抗原陽性細胞数。

Iriki 株を腹腔内接種したマウスの脳ではウイルス抗原が検出されたが、OBE-1 株接種では検出されなかった。脳内接種した場合、OBE-1 株でも Iriki 株と比べると少ないものの、ウイルス抗原が検出された。

i.p.:腹腔内接種、i.c. : 脳内接種

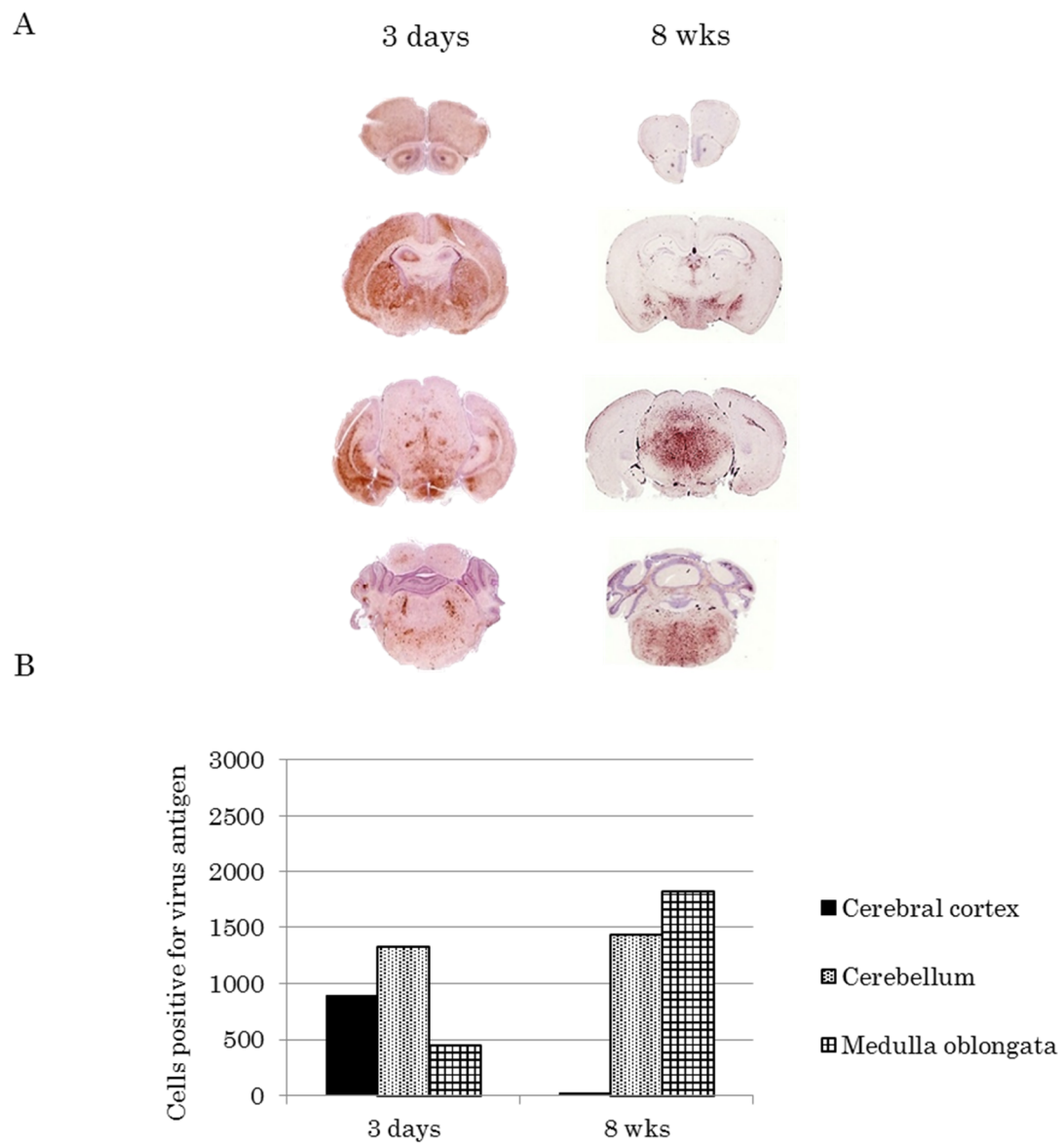


図 1-5 : AKAV Iriki 株脳内接種マウスの脳におけるウイルス抗原の分布。ルーペ画像 (A) とウイルス抗原陽性細胞数 (B)。8 週齢のマウスでは、3 週齢と比較すると、大脳におけるウイルス抗原量は脳幹部に局限した。

3days : 3 日齢マウス、8wks : 8 週齢マウス。

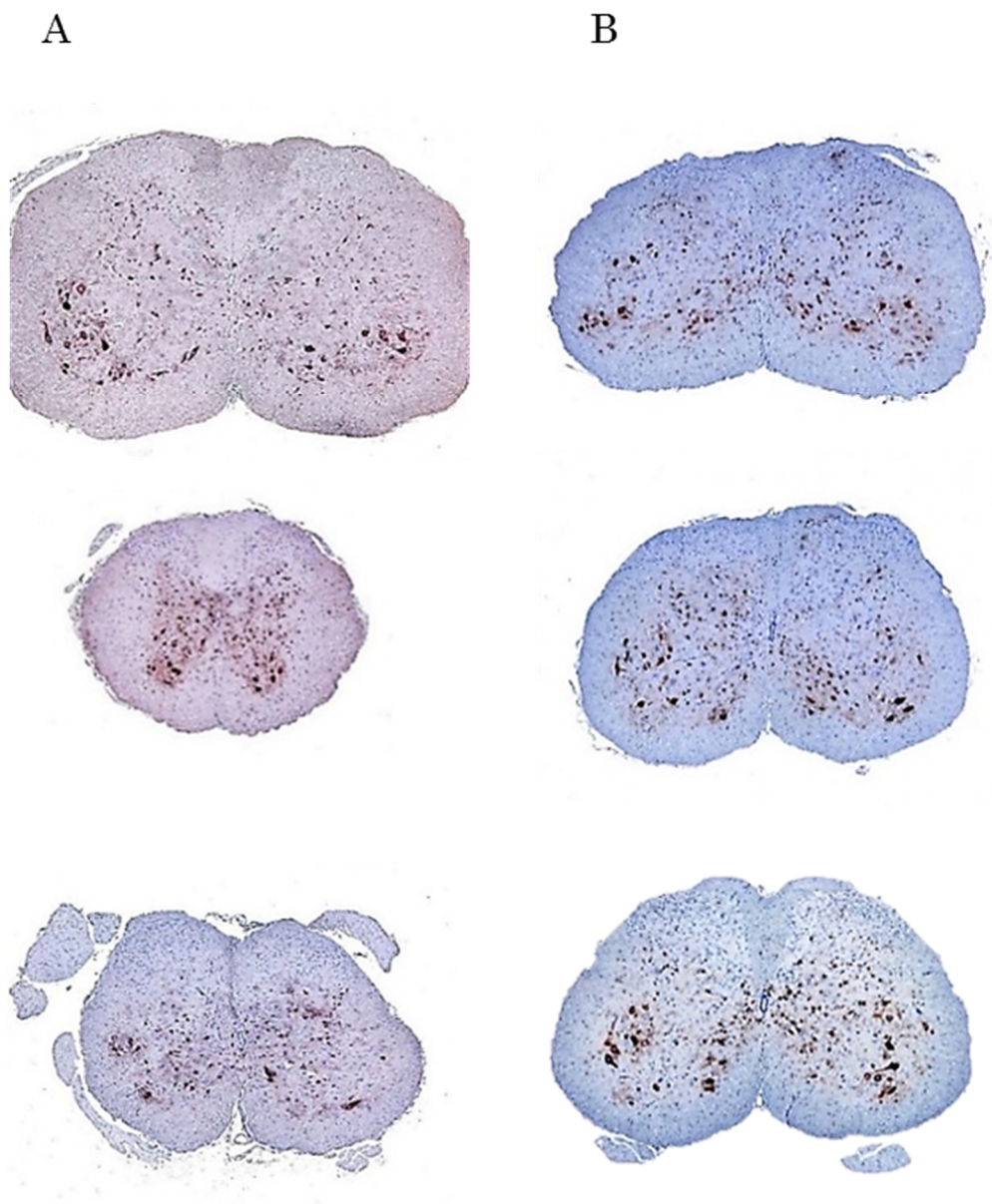


図 1-6 : AKAV Iriki 株脳内接種マウスの脊髄におけるウイルス抗原の分布。

A : 大脳皮質内接種 (5×10^2 PFU) 3 日後。B : 線条体内接種 (5×10^4 PFU) 4 日後。ウイルス接種部位・接種量によらず、頸髄から腰髄の、主に腹角でウイルス抗原が検出された。上から、頸髄、胸髄、腰髄。AKAV 免疫染色。

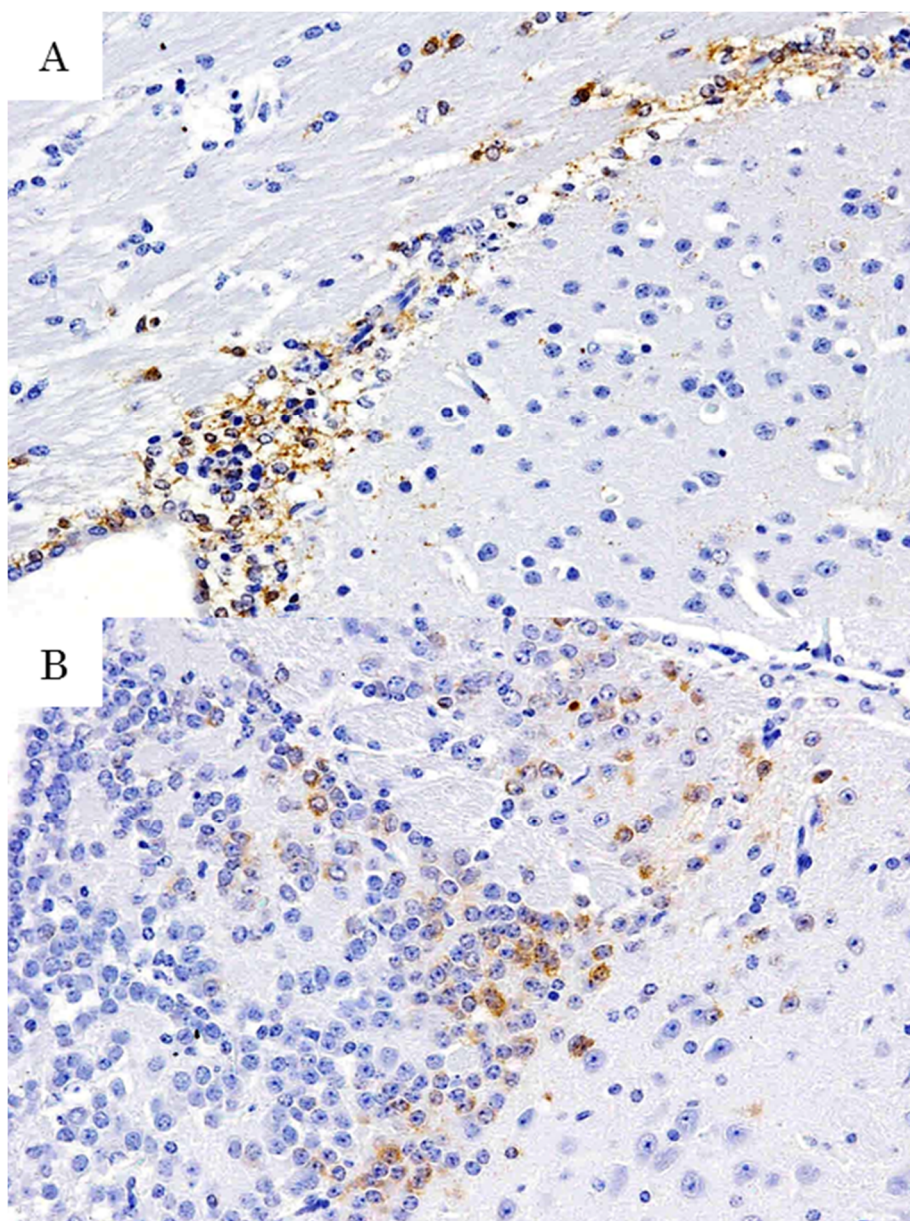


図 1-7 : AKAV Iriki 株 (5×10^4 PFU) 線条体内接種マウスの脳におけるウイルス抗原の分布。接種 3 日後の SVZ (A)、第 3 脳室周囲 (B) の細胞にウイルス抗原が検出された。 AKAV 免疫染色。

第2章

マウスの脊髄神経細胞におけるアカバネウイルスの
細胞傷害性に関する病理学的検討

序

ヒト変異 SOD1 遺伝子を導入した SOD1 トランスジェニックマウスは、ALS の病態モデルマウスとして汎用されてきた。このマウスでは運動神経細胞の脱落がみられる[Gurney ME *et al.*, 1994]のに対し、SOD1 遺伝子をノックアウトしたマウスでは神経系に異常が認められないこと[Reaume *et al.*, 1996]から、ALS の病態として SOD1 の機能不全 (loss of function) ではなく、変異 SOD1 タンパクによる神経傷害 (gain of function) が考えられている。

ALS モデルとして最も汎用されている SOD1^{G93A} トランスジェニック (Tg) マウスは、90 日齢ごろから明瞭な運動機能障害を呈し、120~130 日齢で死亡する[Gurney ME *et al.*, 1994]。このマウスでは、運動神経細胞の脱落に先立ち、脊髄腹角の神経細胞体および神経網の空胞変性がみられることが特徴である。この空胞は変異 SOD1 が局在するミトコンドリアの膜間腔の膨化に由来すると考えられている[Higgins *et al.*, 2003; Jaarsma *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2004]。ミトコンドリアは活性酸素種 (ROS) 生成の主要な場所であり、酸化ストレスによるダメージを受けやすい呼吸鎖関連酵素やミトコンドリア DNA が存在している。これらのことから、ミトコンドリアの機能障害に由来する酸化ストレスの増加が ALS における神経変性機序の一つとして有力視されている[Kong and Xu, 1998]。

この Tg マウスでは、ミトコンドリアだけでなく、ゴルジ体や小胞体についても、病変形成との関連が指摘されている[Ito *et al.*, 2009; Mourelatos *et al.*, 1996; Stieber *et al.*, 2000, 2004; Tobisawa *et al.*, 2003]。変異 SOD1 は、小胞体 - ゴルジ体間のタンパク質輸送を調節している Rab1 の機能を阻害することで、小胞体への異常なタンパク質の蓄積を起こし、小胞体ストレス、神経細胞死を誘導するとされている[Soo *et al.*, 2015]。また、ALS 患者や ALS モデルマ

ウスの脊髄では、神経細胞体の空胞変性に先立ってゴルジ体の断片化が確認されている[Mourelatos *et al.*, 1996; Stieber *et al.*, 2000, 2004]。

一方、AKAV を始めとするオルソブニヤウイルスは、細胞表面レセプターに接着後、エンドサイトーシス経路により細胞に侵入する。侵入後、エンドゾーム膜とウイルスエンベロープが低 pH 下で膜融合することで脱殻し、ウイルスゲノムが細胞質内に放出され、転写・翻訳が開始される。エンベロープ糖タンパク質 (Gn、Gc) は粗面小胞体上で翻訳・合成され、糖鎖付加が行われた後、ゴルジ体膜上に蓄積する。ウイルスゲノムの複製は細胞質内で行われ、リボヌクレオプロテインが形成されると、ゴルジ体膜上に蓄積されたエンベロープ糖タンパクと会合する。その後、ゴルジ体内に出芽してウイルス粒子となり、エキソサイトーシスにより細胞外に放出される[Walter and Barr, 2011]。

ブニヤウイルスによる細胞傷害については、ウイルスの非構造蛋白 (NSs) や mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) がミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することや、ウイルス増殖自体が小胞体ストレスの原因となり、アポトーシスを誘導することが報告されている[Colon-Ramos *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2012]。しかし、AKAV に関しては、AKAV 感染培養細胞でアポトーシスが誘導されることや、アポトーシス誘導因子の c-jun 経路の活性化が報告されているのみで、具体的な機構については不明である[Lim *et al.*, 2005; Mitomo *et al.*, 2016]。

そこで、本章では AKAV の神経細胞に対する細胞傷害の機序を解明することを目的に、ALS モデルマウスを用いて感染実験を行い、細胞小器官、アポトーシス因子の発現を中心に病理学的な検索を行った。

材料と方法

動物

SOD1^{G93A} [B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1Gur/J、JAX Mice #002726] マウスおよび野生型の[B6SJL] (wild type : Wt) マウスは、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入した。実験には、雄性 SOD1^{G93A} (+/-) (Tg) マウス (ヘミ接合体変異をもつマウス) と雌性 Wt マウスとの交配により生まれた Tg マウスと、Wt マウスを用いた。遺伝子型検査は、生後 4 週齢で採取したマウスの尾組織から Mighty Amp Genotyping Kit (TaKaRa Bio) を用いて抽出した DNA について、プロトコルに従い standard PCR により行った。PCR には G93A 変異 SOD1 プライマー (Forward : 5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3'、Reverse : 5'-CGC GAC TAA CAA TCAAAG TGA-3') および内因性コントロールプライマー (Forward : 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'、Reverse : 5'-GTA GGT GGAAAT TCT AGC ATC ATC C-3') を用いた。

マウスには、自由給水させ、ペレット状固形飼料 (MS 飼料、オリエンタル酵母、東京) を給餌した。設定温度 : 23°C (許容範囲 : 20~26°C)、設定湿度 : 55% (許容範囲 : 40~70%)、明期 14 時間 (照明 : 午前 8:00~午後 10:00) : 暗期 10 時間に維持された動物飼育室で飼育した。動物実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会を経て、部局長の承認を得たうえで、東京大学動物実験実施規定に従って行った。

ウイルス

ウイルスは東京大学大学院農学生命科学研究科獣医微生物学研究室にてハムスター肺由来 (HmLu-1) 細胞を用いて無血清培地で継代、維持した AKAV Wild type Iriki 株を使用した。HmLu-1 細胞は 5% ウシ血清 (FCS) 加

Dulbecco's modified MEM (DMEM) 培地を用いて、37°C、5%CO₂ で培養、継代した。ウイルス力価は、HmLu-1 細胞を用いたブラックアッセイ法で測定した。

接種実験

70 日齢の Tg および Wt マウスに AKAV Iriki 株あるいは溶媒 (DMEM) をそれぞれ大脳皮質内に 5μL ずつ接種した (表 2-1)。大脳皮質内接種は 2 段針を用いて、Bregma を基準にして、anterior-posterior (AP) : -1.0mm、medial-lateral (ML) : +2.0mm、dorsal-ventral (DV) : +1.0mm に行った。マウスは接種 6 日後にイソフルランで安楽死処置し、脊髄を採取した。また、瀕死状態および死亡マウスについても、脊髄組織を採取した。

病理組織学、免疫染色および蛍光二重染色

採取脊髄組織を 10%リン酸中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋したのち、厚さ 4μm で組織切片を作製した。切片はキシレンで脱パラフィンした後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫染色を行った。脊髄腹角に認められた NeuN (神経細胞マーカー) 陽性かつ神経細胞の形態的特徴をもつ細胞を腹角神経細胞とした。

免疫染色については、脱パラフィンした組織切片について表 2-2 に示した条件で抗原賦活化を行った。オートクレーブの設定は 120°C、10 分間とした。3%過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング溶液 (8%スキムミルク・TBS) で 37°C、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、TBS で希釈した一次抗体 (表 2-2) と 4°Cで一晩反応させた。その後、Envision polymer (Dako, Glostrup, Denmark) 法によ

り二次抗体と 37℃で 40 分間反応させた。0.5 % DAB (Dojindo Laboratories、熊本) 溶液に 0.1%になるよう H₂O₂ (和光純薬、大阪) を添加した溶液を用いて発色した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

蛍光二重染色は上記免疫染色と同様に脱パラフィンした切片に抗原賦活化を行い、ブロッッキング溶液 (8%スキムミルク・TBST) で 37℃、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、ブロッッキング溶液で希釈した一次抗体 (表 2-2) と 4℃で一晩反応させた。TBST を用いて洗浄した後に他方の一次抗体と 37℃で 1 時間反応させた。その後、TBST で希釈した Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体 (1:200 希釈、Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) と Alexa 594 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:200、Invitrogen Life Technologies, Burlingame, CA) の混合液と室温で 1 時間反応させた。その後、封入剤 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (ZEISS, Jena, Germany) を用いて観察した。

免疫染色結果の解析

脊髄の免疫染色組織標本は NIS-Elements ソフトウェア (Nikon Instruments, 東京) を用いて Nikon DM-U3 デジタルカメラで撮影した。画像解析は National Institutes of Health (NIH) Image J ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。すなわち、カラーチャンネルを RGB 8-bit イメージに分離し、閾値 (threshold) の設定により免疫染色陽性領域を検出し、腹角灰白質の面積に対する比率を算出した。得られた結果は、平均値±標準誤差で示した。データは 2 群間については Student の *t* 検定、多群間については一元配置分散分析 (one-way ANOVA) における Sheffe's *F* test を用いて検定し、 $p<0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

タンパク質の抽出

採材組織（頸髄：C3-5、胸髄：T5-7、腰髄：L3-5）は使用時まで -80°C で凍結保存した。タンパク質抽出用緩衝溶液（150 mM NaCl、1 mM EDTA、2 mM Na_3VO_4 、10 mM NaF、1% NP-40 および protease inhibitor cocktail（5% v/v）を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5））を添加し、氷冷下で Bio Masher II（Nippi、東京）を用いて攪拌した。これを $12,000\times g$ 、 4°C で 20 分間遠沈した後、上清中の組織タンパク質をサンプルとした。サンプルは用いるまで、 -80°C で凍結保存した。タンパク質量は、DC プロテインアッセイキット（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）および iMark マイクロプレートリーダー（Bio-Rad）を用いて定量した。また、サンプルは 5%のメルカプトエタノールを含む sodium dodecyl sulfate（SDS）処理液（Laemmli sample Buffer、Bio-Rad Laboratories）と 1:1 の割合で混合し、 100°C で 10 分間煮沸した後、ウェスタンブロッティング法に用いた。

ウェスタンブロッティング

上述のタンパク質サンプルについて、15%ポリアクリルアミドゲル（ATTO、東京）を用いて室温で 90 分間電気泳動（ゲル 1 枚あたり 20mA 定電流）し、100%メタノールで親水化処理したタンパク質ブロッティング用ポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜（GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）に、ブロッティング（20V 定電圧、50 分間）した。ブロッティング膜を TBST（0.05% Tween-20 および 137 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5）で洗浄し、3% スキムミルクを含む TBST で 60 分間ブロッキングした。TBST で 5 分間洗浄した後、3%スキムミルクを含む TBST で希釈した一次抗体（表 2-2）と振盪しながら 4°C で一晩反応させ、反応後 TBST で 5 分間 3 回洗浄した。次

に、3%スキムミルクを含む TBST で希釈した HRP 標識 2 次抗体 (1:5000, GE Healthcare) と室温で 1 時間反応させ、TBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。その後、発光検出試薬 (ECL prime、GE Healthcare) と反応させ、Chemi-Doc XRS plus System (Bio-Rad) を用いて陽性バンドを検出、画像解析ソフト Image Lab (Bio-Rad) で定量した。

結果

神経細胞数

Tg マウスおよび Wt マウスで、AKAV 接種群は非接種群と比較して、脊髓腹角における神経細胞数が有意に少なかった。非接種群に対する接種群の神経細胞数の割合を比較したところ、Tg マウスは Wt マウスに比べて低い傾向にあった（図 2-1）。

ミトコンドリアマーカの発現

ミトコンドリアマーカの Tom (Mitochondrial preprotein translocases of the outer membrane) 20 に対する抗体を用いた免疫染色の結果（図 2-2）、Tg マウス、Wt マウスで、神経細胞の細胞質に顆粒状の陽性像が認められた。しかし、ミトコンドリアの凝集・蓄積を示す、塊状の強陽性像は Tg マウスでのみ認められ、強陽性像を示す神経細胞数は AKAV 接種群で非接種群と比べて、多い傾向にあった。脊髓腹角の灰白質に占める Tom20 弱陽性面積率は、Tg、Wt マウスのいずれにおいても、AKAV 接種群で非接種群と比べて低い傾向にあった。また、AKAV 非接種群に対する接種群の Tom20 弱陽性面積の割合を比較したところ、Tg マウスと Wt マウスとの間に有意な差はなかった。

ゴルジ体マーカの発現

ゴルジ体マーカの GM130 (Golgi matrix protein of 130kDa) に対する抗体を用いた免疫染色の結果（図 2-3）、Tg マウス、Wt マウスで、神経細胞の細胞質に顆粒状、小胞状の陽性像が認められた。また、Tg マウスや AKAV 接種 Wt マウスでは、ゴルジ体の断片化を示す細顆粒状の陽性像が認められ、その数は Tg マウスでは AKAV 接種群で非接種群と比べて有意に多かった。脊髓腹

角の灰白質に占める GM130 陽性面積率は、Tg マウスにおいて、AKAV 接種群で非接種群と比べて有意に低かった。一方、Wt マウスでは、AKAV 接種群で非接種群と比べて有意ではないが低い傾向にあった。

小胞体マーカーの発現

小胞体マーカーの PDI (Oxidoreductase-protein disulfide isomerase) に対する抗体を用いた免疫染色の結果 (図 2-4)、Tg マウスと Wt マウスで、神経細胞の細胞質に細顆粒状の陽性像が認められた。Tg マウスにおいて空胞変性を呈する神経細胞では、その染色性が低下していた。脊髓腹角の灰白質に占める PDI 陽性面積率は、Tg、Wt マウスのいずれにおいても、AKAV 接種群で非接種群と比べて低い傾向にあった。また、AKAV 非接種群に対する接種群の PDI 陽性面積率を比較したところ、Tg マウスと Wt マウスとの間に有意差はなかった。

蛍光二重染色

Tg マウスと Wt マウスについて、細胞小器官のマーカーである Cytochrome C (ミトコンドリアマーカー)、GM130、PDI のそれぞれと AKAV 抗原の発現局在を蛍光二重染色により検索したが、細胞小器官とウイルス抗原との明瞭な共局在は認められなかった (図 2-5)。

アポトーシス因子の発現

アポトーシスマーカーである Cleaved Caspase 3、Cleaved Caspase 9、p53 のそれぞれに対する抗体を用いた免疫染色の結果 (図 2-6)、どの実験群においても、脊髓腹角の神経細胞に陽性像は認められなかった。次に、アポトーシスに関わる Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9、p-p38、p-p53、NF- κ B、RIP

(Receptor-interacting protein) の脊髄における発現レベルをウェスタンブロッティングにより検索した (図 2-7) ところ、すべての実験群において、Cleaved-Caspase 3 のバンドは認められず、pro-Caspase 3 の発現も、Tg と Wt に関わらず、AKAV 接種群と非接種群との間で差は認められなかった。また、すべての実験群において、Cleaved-Caspase 8、Cleaved-Caspase 9 のバンドが確認されたが、Cleaved-Caspase 8、Cleaved-Caspase 9 の発現レベルは、Tg と Wt とに関わらず、すべてで AKAV 接種群と非接種群との間に差は認められなかった。さらに、p-p38 と p-p53 もすべての実験群で、バンドが認められなかった。NF- κ B の発現レベルは、Tg と Wt とに関わらず、AKAV 接種群と非接種群との間に差は認められなかった。また、RIP の発現レベルは、Wt マウスでは AKAV 接種群で非接種群と比べて低い傾向であったのに対し、Tg マウスでは有意に低かった。

考察

Tg、Wt 両マウスで、AKAV の大脳皮質内接種により脊髄腹角の神経細胞は有意に減少し、その程度は Tg マウスで Wt マウスに比べて有意ではないものの大きかった。AKAV の感染により、神経細胞のゴルジ体は Tg マウスで Wt マウスに比べてより多く断片化し、マーカーである GM130 の発現量も Wt マウスでは AKAV 接種群で非接種群と比べて低い傾向であったのに対し、Tg マウスでは有意に低かった。ミトコンドリアについては、Tg マウスでは、ミトコンドリアマーカーの Tom20 の蓄積が AKAV 感染により多くなる傾向にあったが、Tg マウス、Wt マウスとも Tom20 の発現量は AKAV 接種により少なくなる傾向であった。小胞体についても、マーカーの PDI の発現が、Tg マウス、Wt マウスともに AKAV 接種により少なくなる傾向であった。しかし、神経細胞数、Tom20 弱陽性面積率、PDI 陽性面積率についての、AKAV 非接種群に対する接種群の割合を比較すると、Tg マウス、Wt マウスともに、その割合に差はなかったため、AKAV 接種によるミトコンドリアや小胞体の発現量の減少は主に神経細胞の脱落によるものと考えられた。これらの結果から、AKAV 感染により主にゴルジ体が傷害されることで、神経細胞死が誘導されるものと考えられた。AKAV を接種した場合、Wt マウスと比べ Tg マウスでより明瞭にゴルジ体の傷害が認められたことは、AKAV 感染における細胞傷害から細胞死に至るプロセスが急性であるため、WT マウスではゴルジ体の変化を捕らえにくかったのに対し、細胞小器官が脆弱である Tg マウスではより顕著にその変化が現れたためと考えられた。このことは、AKAV 接種による神経細胞の脱落の程度が、Wt マウスより Tg マウスでより重度であったことと矛盾しない。

ゴルジ体の断片化は細胞分裂時に見られる生理的な形態変化[Misteli and Warren, 1995; Sutterlin et al., 2002]であるが、アポトーシスやゴルジ体ス

トレス応答によっても誘発される[Hicks and Machamer, 2005; Jiang *et al.*, 2011; Machamer, 2015; Sasaki and Yoshida, 2015]。ゴルジ体ストレスは、主に容量負荷に対する反応[Oku *et al.*, 2011; Taniguchi *et al.*, 2015]であり、タンパク質分泌量が増加すると、ゴルジ体のタンパク質修飾・輸送機能を向上させるなどして、ゴルジ体機能を調節する[Bierring, 1962; Clermont *et al.*, 1993; Freeman, 1962; Rambourg *et al.*, 1993]。また、ゴルジ体の断片化はウイルス感染によっても誘発され[Campadelli *et al.*, 1993; Fontana *et al.*, 2008; Jantti *et al.*, 1997]、bunyawera virus 感染においてウイルス粒子の複製・成熟に必要な可能性が報告されている[Salanueva *et al.*, 2003]。本章の結果では、ウイルスと各細胞小器官との共局在が認められず、AKAV 感染によるゴルジ体の断片化および減少の詳細な機構に関する知見は得られなかった。しかし、ゴルジ体の断片化に酸化ストレスや小胞体ストレスが関係している[Nakagomi *et al.*, 2008]との報告があることから、今回認められたゴルジ体マーカーの発現の変化に、ゴルジ体でのウイルス粒子の過剰な出芽・蓄積によるゴルジ体ストレスや、ミトコンドリアや小胞体のストレスが関わっている可能性が示唆された。

アポトーシスはプログラム細胞死とも呼ばれ、その経路は様々な因子により複雑に調節されているが、カスパーゼ (Caspase) と総称される一連のプロテアーゼの活性化が細胞死の実行を担っている[Fan, 2005; Haupt *et al.*, 2003; Szegezdi, 2003; Simon., 2000]。その経路は主に以下の3つに分類される。すなわち、1) 細胞外からのアポトーシスシグナルから始まり、Caspase 8 を介する経路、2) p53 の活性化やミトコンドリアからの Cytochrome C の漏出を介し、Caspase 9 が活性化される経路、3) 小胞体ストレスに始まり、Caspase 12 の活性化を介する経路、の3つである。これら一連のシグナル伝達経路は、いずれも最終的に Caspase 3 を活性化することで、アポトーシスを実行する。培養細胞

に AKAV を感染させると Caspase 3 や p38 が活性化することが確認されている [Lim *et al.*, 2005; Mitomo *et al.*, 2016]。しかし、今回の検索で、Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9、p-p38、p-p53 の発現レベルは AKAV 接種群と非接種群とで差は認められず、Cleaved-Caspase 3、Cleaved-Caspase 9、p53 に関しては発現が確認できなかった。これらの結果から、AKAV 感染によるマウス脊髄腹角の神経細胞の脱落に、アポトーシスは関与しないことが推察された。

RIP は、NF- κ B の活性化を介してインターフェロンの産生を促進し、炎症や細胞の生存を誘導するリン酸化酵素（キナーゼ）であるが、TNF 受容体を起点とする Caspase 8 を介したアポトーシス経路に関与することも知られている。活性化 Caspase 8 により RIP が分解されるとアポトーシスが、Caspase 8 が活性化せず、RIP が分解されなければ NF- κ B の活性化が起こる [Declercq *et al.*, 2009; Festjens *et al.*, 2007; Silke *et al.*, 2015]。さらに、最近では制御されたネクローシスとして、ネクロトーシス (necroptosis) という分子機構が提唱されているが、このネクロトーシスに RIP が関与することが報告されている [Christofferson and Yuan, 2010; de Almagro and Vucic, 2015; Linkermann and Green, 2014]。この経路には依然不明な点が多いが、RIP1、RIP3、MLKL を含む複合体（ネクロソーム : necrosome）の形成が必須で、これは TNF 受容体、Toll 様受容体、DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) などによって誘導される。TNF 受容体から始まるシグナル伝達経路において、Caspase 8 などのアポトーシス誘導因子が活性化せず、かつ RIP1 による NF- κ B の活性化が起こらなければ、ネクロソーム（ネクローシス・シグナル伝達複合体、RIP1-RIP3-MLKL 複合体）が形成され、RIP1→RIP3→MLKL とリン酸化が連続的に誘導される。最終的にリン酸化された MLKL (Mixed lineage kinase domain-like) が細胞膜に孔を形成し、ネクロトーシスが実行される。今

回の検索では、Caspase 8、NF- κ B の発現において AKAV 接種群と非接種群との間に差は認められなかった。一方、RIP の発現は AKAV 接種群で非接種群と比べ有意ではないが多かった。今回検索した RIP はリン酸化 RIP ではないため、認められた RIP 発現レベルの上昇は、リン酸化 RIP の発現レベルの上昇、つまりはネクローシス経路の活性化を直接示すものではないが、カスパーゼや NF- κ B の発現に変化が認められなかったことから、AKAV 感染によるマウス脊髄腹角の神経細胞の脱落は、細胞傷害を起因とした、ネクローシスによるものと思われる。

AKAV の細胞傷害に関する報告は少ないが、培養細胞に AKAV を感染させると Caspase 3 や p38 が活性化することが報告されており、他のブニヤウイルスと同様に、AKAV 感染による細胞死はアポトーシスによるものと考えられている [Lim *et al.*, 2005; Mitomo *et al.*, 2016]。とくに今回の検索では、AKAV 感染マウスの脊髄神経細胞においてゴルジ体の傷害が確認されたため、AKAV 感染により誘導される細胞死はゴルジ体の傷害に起因するアポトーシスによるものと想定された。しかし、AKAV 感染マウスの脊髄において、神経細胞の脱落は確認されたが、アポトーシス関連因子の活性化は認められなかった。一方、前述したように AKAV 感染により RIP の発現が上昇する傾向が認められたことから、マウス脊髄腹角の神経細胞の脱落は、細胞小器官傷害を起因としたネクローシスによる可能性が示唆された。この結果は過去の研究報告と異なるが、これは本研究が *in vivo* での実験であるのに対し、過去の報告のほとんどが *in vitro* での実験によるものあるからと推察された。培養細胞ではその種類によって誘導される細胞死の経路が異なるという報告があり [Yamanaka *et al.*, 2011]、実際 AKAV の感染実験に使われた細胞は、Vero cell (African greenmonkey kidney epithelial cell line) であったことから、誘導された細胞死の相違は感染細胞の

種類によるものと推測された。しかしながら、*in vivo* での AKAV 感染実験や AKAV 野外感染症例において、アポトーシスを検索した報告はなく、本研究でもアポトーシスは AKAV 感染マウスの脊髄神経細胞死だけに参与しないかどうかについての有意な知見は得られなかった。

本章では、AKAV 感染による神経細胞の脱落は細胞小器官のストレス、とくにゴルジ体への傷害によって誘導される可能性が高いことが分かった。さらに、その神経細胞死には、アポトーシスではなく、ネクロトーシスが関与することが示唆された。

要約

ヒト変異 SOD1 遺伝子を導入した SOD1^{G93A} トランスジェニック (Tg) マウスは、ALS の病態モデルとして汎用されてきた。この Tg マウスでは、ミトコンドリアの機能障害に由来する酸化ストレスの増加が ALS の際の神経変性機序の一つとして有力視されているが、加えてゴルジ体や小胞体の傷害についても、関連が指摘されている。そこで、この Tg マウスの細胞小器官の脆弱性に着目して、AKAV 感染神経細胞における細胞傷害の機序を解明することを目的に、ALS モデルマウスを用いて感染実験を行い、病理学的検索を行った。AKAV の感染により、Tg マウスの神経細胞ゴルジ体の断片化は有意に多くなり、ゴルジ体マーカーである GM130 の発現量は有意に少なくなった。ミトコンドリアや小胞体については、AKAV 接種群で非接種群より Tom20 (ミトコンドリアマーカー) や PDI (小胞体マーカー) の発現量は少ない傾向であった。一方、アポトーシス関連因子の cleaved-caspase 3、cleaved-caspase 9、p53 は、AKAV 接種群で発現が確認できず、caspase 3、caspase 8、caspase 9、p-p38、p-p53、NF- κ B の発現レベルは AKAV 接種群と非接種群とで差は認められなかった。しかし、RIP の発現レベルは、Tg マウスで AKAV 接種群で非接種群と比べ、高くなっていた。これらの結果から、AKAV 感染による神経細胞の脱落は細胞小器官のストレス、とくにゴルジ体への傷害によって誘発される可能性が高いと推察された。さらに、その神経細胞死には、ネクロトーシスの機序が関与することが示唆された。

表2-1：AKAV接種実験					
接種ウイルス	マウス	接種経路	接種量 (μl)	接種日齢	匹数
Iriki 5.0×10^4 PFU / 0.1ml	SOD1 ^{G93A}	i.c.	5	70	11
	Wt	i.c.	5	70	10
DMEM	SOD1 ^{G93A}	i.c.	5	70	5
	Wt	i.c.	5	70	5

接種ウイルス: DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium (AKAV非接種対照)

接種経路: i.c., intracerebrally

表2-2: 用いた一次抗体

抗体名	種類	認識構造	抗原賦活化	希釈倍率	販売元、製品番号
AKAV OBE株	Rabbit, p	AKAV	-	1:500	動物衛生研究所, 津田知幸先生
NeuN	Mouse, m	神経細胞	Citrate buffer	1:200	Millipore, MA, USA, #MAB377
Tom20	Rabbit, p	ミトコンドリア	Citrate buffer	1:500 1:200(IF)	Santa Cruz, CA, USA, #sc-11415
GM130	Mouse, m	ゴルジ体	Citrate buffer	1:200 1:100(IF)	BD Biosciences, CA, USA, 610823
PDI	Mouse, m	小胞体	Citrate buffer	1:100 1:50(IF)	Santa Cruz, CA, USA, #sc-74551
Cytochrome C	Mouse, m	ミトコンドリア	Citrate buffer	1:100(IF)	Santa Cruz, CA, USA, #sc-13156
Cleaved-caspase 3	Rabbit, p	-	Citrate buffer	1:500	Cell Signaling Technology, MA, USA, #9664
Cleaved-caspase 9	Rabbit, p	-	Citrate buffer	1:200	Novus Biologicals, CO, USA, NB100-56118
p53	Rabbit, p	-	-	1:300	Santa Cruz, CA, USA, #sc-6243
p-p53	Rabbit, p	-	-	1:500(WB)	Cell Signaling Technology, MA, USA, #9284
Caspase 9	Rabbit, p	-	-	1:500(WB)	Cell Signaling Technology, MA, USA, #9662
Caspase 8	Rabbit, p	-	-	1:1000(WB)	BD Biosciences, CA, USA, 551234
Caspase 9	Rabbit, p	-	-	1:500(WB)	Cell Signaling Technology, MA, USA, #9504
p-p38	Rabbit, p	-	-	1:1000(WB)	Cell Signaling Technology, MA, USA, #9211
NF- κ B	Mouse, m	-	-	1:200(WB)	Santa Cruz, CA, USA, #sc-8008
RIP	Rabbit, p	-	-	1:1000(WB)	Cell Signaling Technology, MA, USA, #3493
beta-actin	Rabbit, p	-	-	1:2000(WB)	Cell Signaling Technology, MA, USA, #4967

種類: m, monoclonal; p, polyclonal

抗原賦活化: Citrate buffer, pH6.0

希釈倍率: IF, Immunofluorescence; WB, Western blotting

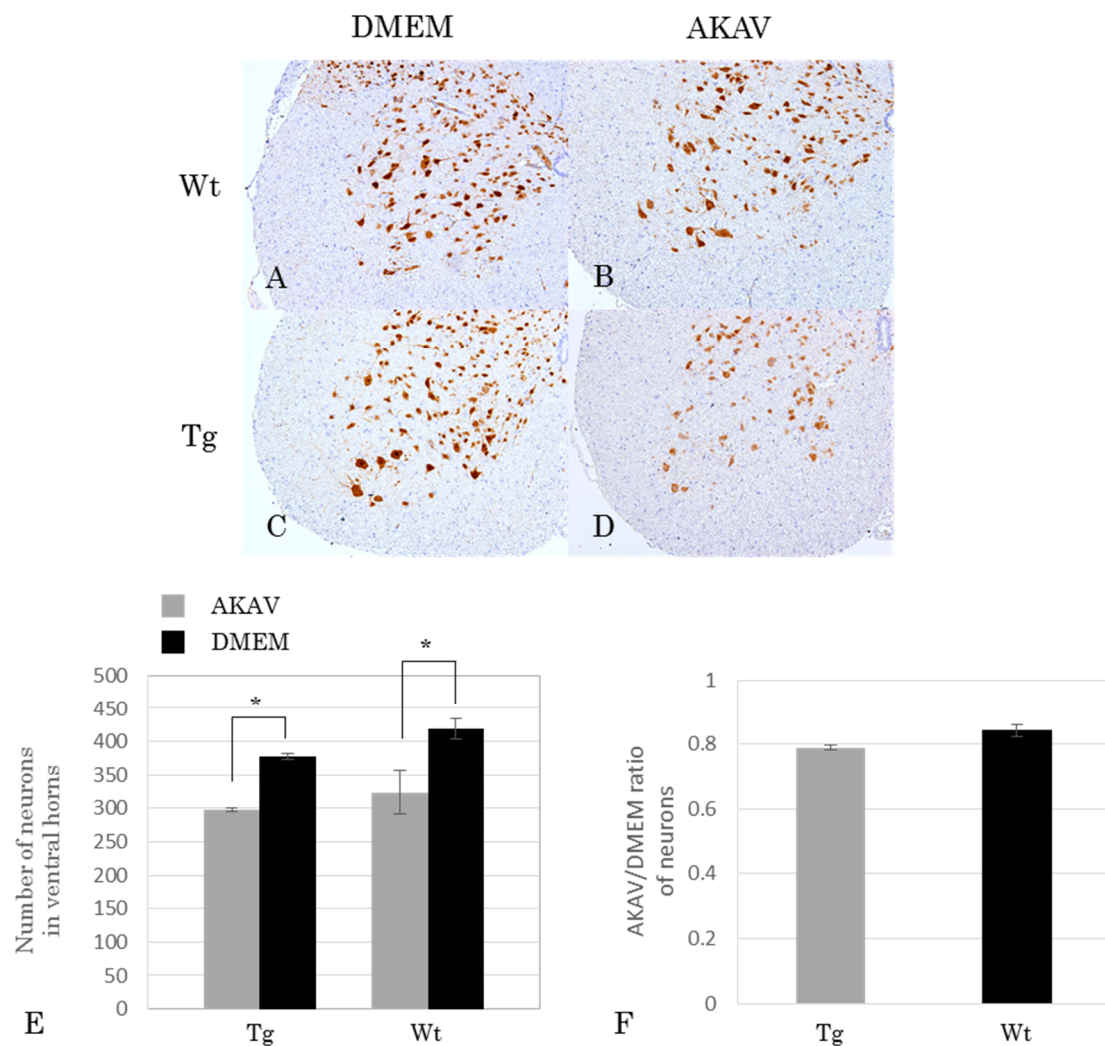


図 2-1 : NeuN 免疫染色。

A,B,C,D : 腰髄腹角。A, B : Wt、C, D : Tg。A,C : 非接種対照、B,D : AKAV 接種。

E : 腹角の神経細胞数。F : 非接種群に対する接種群の神経細胞数の割合。

Tg,Wt マウスで、AKAV 接種群は非接種群と比較して、神経細胞数が有意に少なかった。非接種群に対する接種群の神経細胞数の割合は Tg マウスで Wt マウスに比べて低い傾向にあった。 $*p < 0.05$ 。

AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

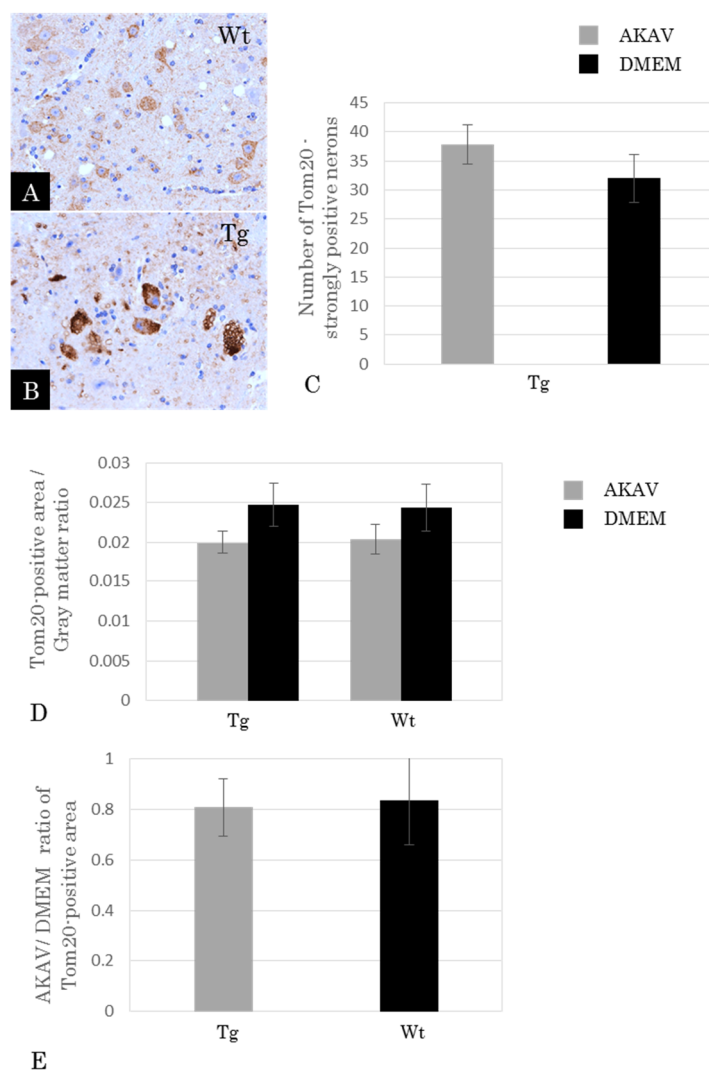


図 2-2 : Tom20 免疫染色。A,B : 腰髄腹角、非接種対照。A : Wt、B : Tg。C : Tg マウスでの Tom20 強陽性神経細胞数。D : 灰白質全体に占める Tom20 面積率。E : 非接種群に対する接種群の Tom20 陽性面積の割合。神経細胞の細胞質に顆粒状の陽性像が認められた。強陽性像は Tg マウスでしか認められず、強陽性像を示す神経細胞数は AKAV 接種群で非接種群と比べて多い傾向。灰白質に占める Tom20 弱陽性面積率は、AKAV 接種群で非接種群と比べて低い傾向であった。非接種群に対する接種群の弱陽性面積の割合を比較したところ、Tg マウスと Wt マウスとの間に有意差はなかった。AKAV:AKAV 接種、DMEM:AKAV 非接種対照

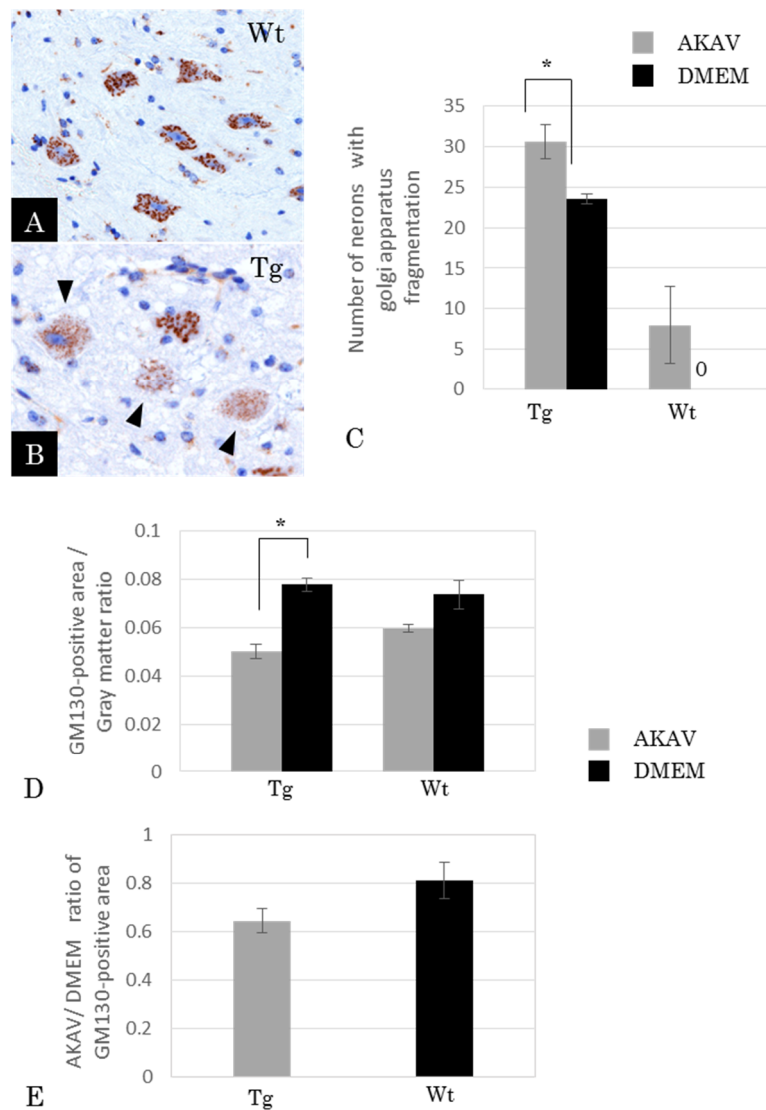


図 2-3 : GM130 免疫染色。A,B : 腰髄腹角、非接種対照。A : Wt、B : Tg。C : ゴルジ体の断片化を認める神経細胞数。D : 灰白質全体に占める GM130 陽性面積率。E : 非接種群に対する接種群の GM130 陽性面積の割合。神経細胞の細胞質に顆粒状、小胞状の陽性像が認められ、Tg マウスや AKAV 接種 Wt マウスでは、断片化を示す細顆粒状の陽性像 (B の矢頭) が認められた。その数は Tg マウスでは接種群で非接種群と比べて有意に多かった。灰白質に占める陽性面積率は、Tg では接種群で非接種群と比べて有意に低く、Wt マウスでは有意ではないが低かった。* $p < 0.05$ 。AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

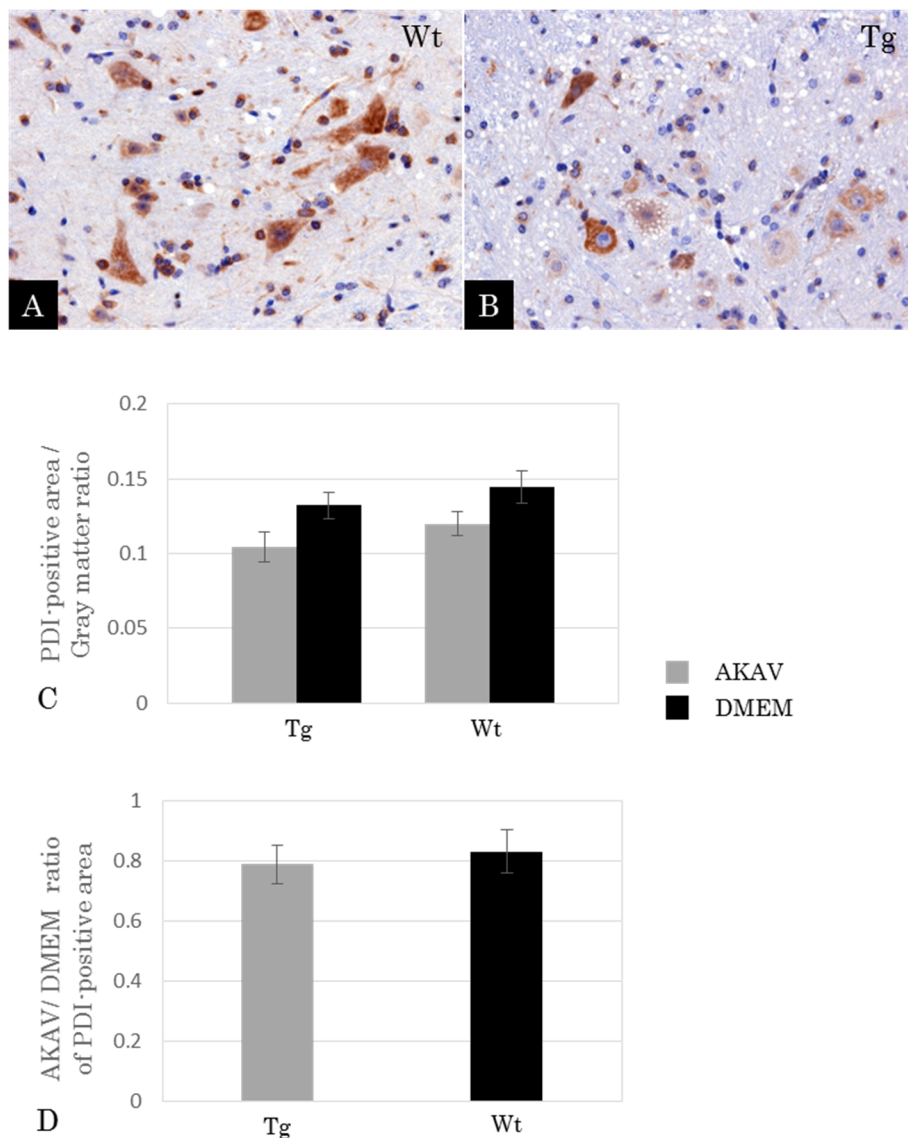


図 2-4 : PDI 免疫染色。A,B : 腰髄腹角、非接種対照。A : Wt、B : Tg。C : 灰白質全体に占める PDI 陽性面積率。D : 非接種群に対する接種群の PDI 陽性面積の割合。神経細胞の細胞質に細顆粒状の陽性像が認められ、空胞変性を呈する Tg マウスの神経細胞では染色性が低下した。灰白質に占める陽性面積率は、Tg、Wt マウスのいずれにおいても、AKAV 接種群で非接種群と比べて有意ではないが低かった。また、非接種群に対する PDI 陽性接種群の神経細胞数の割合を比較したところ、Tg マウスと Wt マウスとの間に有意差はなかった。

AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

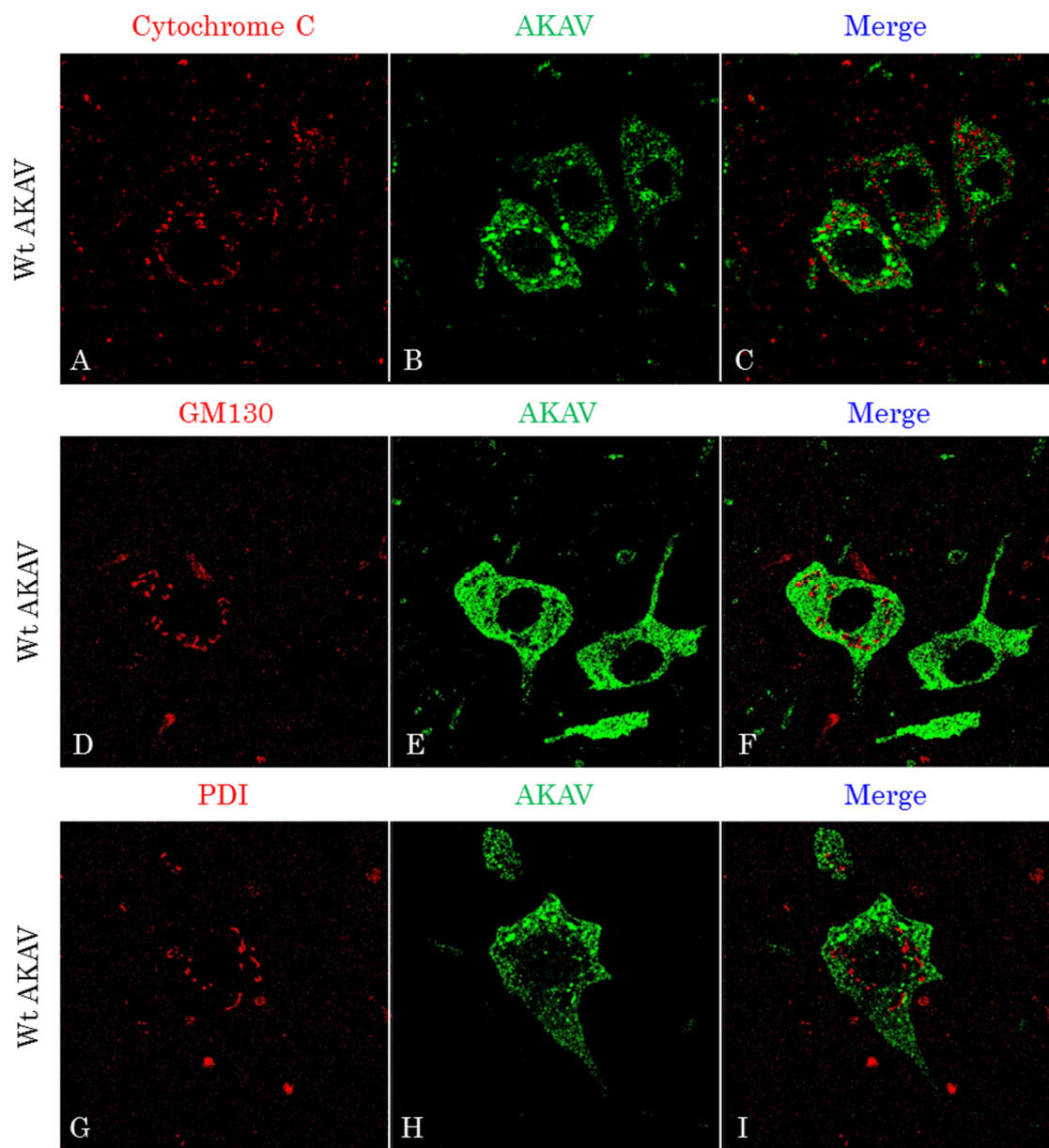


図 2-5 : 蛍光二重染色。Wt、70 日齢、AKAV 接種、腰髄腹角。A : Cytochrome C (赤)、B : AKAV (緑)、C : Cytochrome C/AKAV。D : GM130 (赤)、E : AKAV (緑)、F : GM130/AKAV。G : PDI (赤)、H : AKAV (緑)、I : PDI/AKAV。Tg および Wt マウスで、細胞小器官とウイルス抗原との明瞭な共局在は認められなかった (Wt マウスのみを表示)。AKAV : AKAV 接種

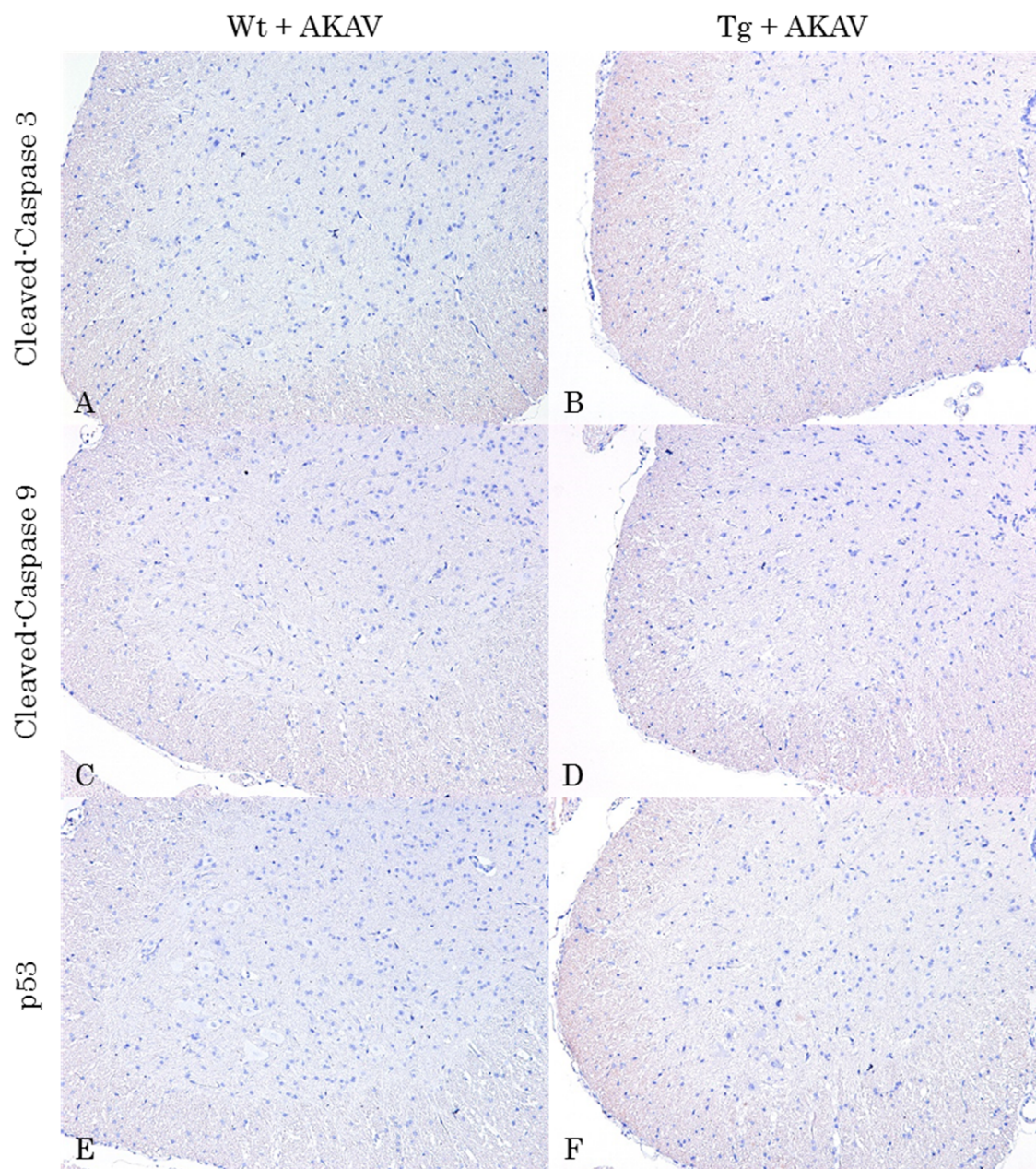


図 2-6 : アポトーシス関連タンパク質の免疫染色。

A,C,E : Wt、70 日齢、AKAV 接種、腰髄腹角。 B,D,F : Tg、70 日齢、AKAV 接種、腰髄腹角。 A,B : Cleaved-Caspase 3、 C,D : Cleaved-Caspase 9、 E,F : p53。

AKAV : AKAV 接種

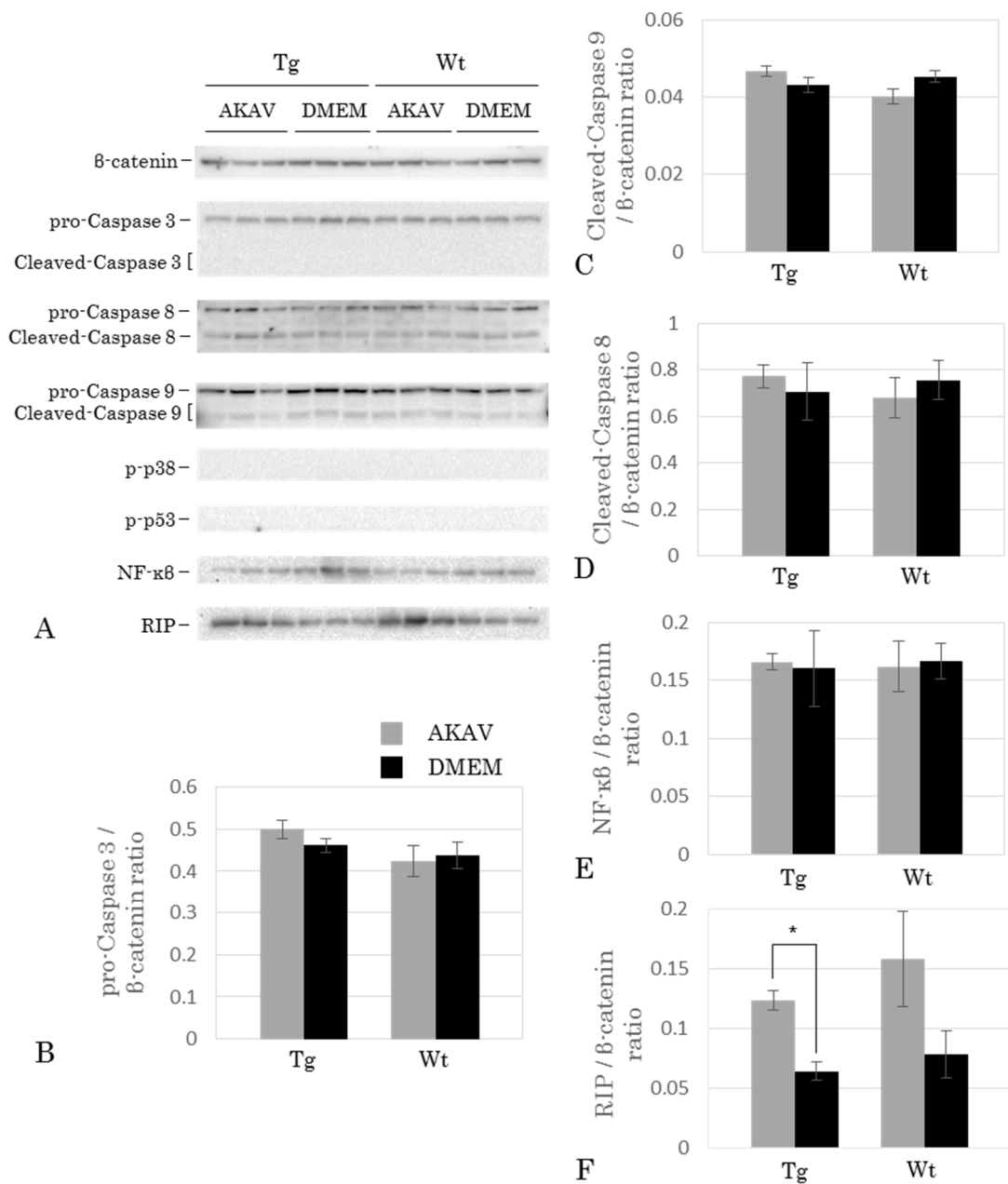


図 2-7: ウェスタンブロッティングによる各種アポトーシス関連タンパク質の発現。A: ウェスタンブロッティングの結果。各レーンは個体（各群 3 個体）を示す。 B: pro-Caspase 3 / β -actin、 C: Cleaved-Caspase 8 / β -actin、 D: Cleaved-Caspase 9 / β -actin、 E: NF- κ B / β -actin、 F: RIP / β -actin。 AKAV: AKAV 接種、 DMEM: AKAV 非接種対照

第3章

SOD1^{G93A}トランスジェニックマウスの脊髄病変における
アカバネウイルス感染の影響についての病理学的検討

序

神経変性疾患とウイルス感染症との関係についてはさまざまな報告がある[De Chiara *et al.*, 2012; Deleidi and Isacson, 2012; Zhou *et al.*, 2013; Ward, 1996]。よく知られているのが、パーキンソン病とインフルエンザとの関係である。1918 年の H1N1 型インフルエンザ(スペイン風邪)の全世界的な大流行後、1920～1930 年代に脳炎後パーキンソン症候群 (PEP) の患者が劇的に増加した[Poskanzer *et al.*, 1963; Ravenholt and Foege, 1982]。流行時の患者から分離されたウイルスの一つである A/WSN 株は、マウス感染実験においてウイルス抗原が中脳黒質や海馬に分布し、特に黒質ではドパミン産生細胞に特異的に感染することが確認された[Landreau *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 1995]。最近では、H5N1 型インフルエンザ(鳥インフルエンザ) ウイルスをマウスに感染させると、脳炎や神経細胞変性・壊死、さらには中脳黒質で神経細胞の減少を引き起こすことが報告されている[Jang *et al.*, 2009]。これに対し、ALS では、エンテロウイルス、ヘルペスウイルスなどの感染が随伴していたとの報告があるが[Berger *et al.*, 2000; Cermelli *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2006]、その関連を詳細に検討した報告はない。

一方、オートファジー(自食作用)はユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) 以外で最も主要な細胞質内タンパク質分解系(自己分解経路)であり、誘導的オートファジーと定常的オートファジーに大別される。誘導的オートファジーの主たる機能は細胞が栄養飢餓に陥った際の自己代謝によるアミノ酸の供給であり、細胞飢餓状態以外にホルモン、温度、酸素濃度、細胞ストレスおよび感染によっても活性化される。これに対し、定常的オートファジーは栄養豊富な状態でも恒常的に低いレベルで維持されていて、細胞内浄化作用により異常タンパク質が蓄積することを防ぎ、細胞内の恒常性維持および細胞の生存に寄与してい

る[Klionsky and Emr, 2000; Levine and Kroemer, 2008; Mizushima, 2007]。

オートファジーによる分解は、mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1) の抑制から開始される。栄養飢餓などの刺激により、mTOR の活性が抑制されると、Beclin 1-Vps34-PI3 キナーゼ複合体を介して隔離膜の形成が誘導される。次に、Atg12-Atg5-Atg16Lf 複合体の結合を経て隔離膜が伸長し、その後、アダプタータンパク質である p62 (p62/A170/Sqstm1) や NBR1 (neighbor of BRCA gene 1) の介在により隔離膜が分解対象物を取り囲み、隔離膜上で LC3 (Microtubule-associated protein light chain) -I が、Atg12-Atg5-Atg16Lf 複合体を介し LC3-II へと変換されることでオートファゴソームが形成される。これが最終的にライソゾームと融合してオートライソゾームとなり、分解対象物が消化・分解される。LC3-I から LC3-II への変換はオートファゴソーム形成過程における重要な段階であるため、LC3 はオートファゴソームまたはオートライソゾーム (オートファジー小胞) 形成のマーカーとして多用されている[Klionsky and Emr, 2000; Klionsky *et al.*, 2012; Mizushima, 2010]。

近年、ヒトの神経変性疾患において、定常的オートファジーの異常による異常タンパク質の蓄積が病因の一つとして指摘されており、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病だけでなく、ALS の病態機序においてもオートファジーが関与するという報告がある[Chen *et al.*, 2012; Kiriya and Nochi, 2015; Nassif and Hetz, 2012, Nixon, 2013]。実際、ALS のモデル動物である SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスでは、発症後、脊髄における LC3 や p62 の異常蓄積、隔離膜形成の促進による運動神経細胞脱落の早期化が報告されている[Gal *et al.*, 2009; Morimoto *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011]。これらのことから、ALS 病態において、隔離膜の形成亢進や、ライソゾームの分解能を越えた過剰なオートファジー小胞の形成・蓄積が病態の増悪因子になると推

察される[Chu, 2006]。

第 2 章において AKAV がミトコンドリアや小胞体など ALS の病態に関与する細胞小器官を傷害することを見出したので、本章では、ALS などの神経変性疾患における神経向性ウイルス感染の病態への関与を明らかにすることを目的として、AKAV Iriki 株を Tg マウスに接種し、中枢神経病変への影響についてオートファジー関連因子を含め、病理学的に検索した。

材料と方法

動物

SOD1^{G93A} [B6SJL-Tg (SOD1^{G93A}) 1Gur/J、JAX Mice #002726] マウスおよび野生型の[B6SJL] (wild type : Wt) マウスは、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入した。実験には、雄性 SOD1^{G93A} (+/-) (Tg) マウス (ヘミ接合体変異をもつマウス) と雌性 Wt マウスとの交配により生まれた Tg マウスと、Wt マウスを用いた。遺伝子型検査は、生後 4 週齢で採取したマウスの尾組織から Mighty Amp Genotyping Kit (TaKaRa Bio) を用いて抽出した DNA について、プロトコルに従い standard PCR により行った。PCR には G93A 変異 SOD1 プライマー (Forward : 5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3'、Reverse : 5'-CGC GAC TAA CAA TCAAAG TGA-3') および内因性コントロールプライマー (Forward : 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'、Reverse : 5'-GTA GGT GGAAAT TCT AGC ATC ATC C-3') を用いた。

マウスには、自由給水させ、ペレット状固形飼料 (MS 飼料、オリエンタル酵母、東京) を給餌した。設定温度 : 23°C (許容範囲 : 20~26°C)、設定湿度 : 55% (許容範囲 : 40~70%)、明期 14 時間 (照明 : 午前 8:00~午後 10:00) : 暗期 10 時間に維持された動物飼育室で飼育した。

動物実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会を経て、部局長の承認を得たうえで、東京大学動物実験実施規定に従って行った。

ウイルス

ウイルスは東京大学大学院農学生命科学研究科獣医微生物学研究室にてハムスター肺由来 (HmLu-1) 細胞を用いて無血清培地で継代、維持した AKAV Wild type Iriki 株を使用した。HmLu-1 細胞は 5% ウシ血清 (FCS) 加

Dulbecco's modified MEM (DMEM) 培地を用いて、37℃、5%CO₂ で培養、継代した。ウイルス力価は、HmLu-1 細胞を用いたブラックアッセイ法で測定した。

接種実験

70 日齢と 100 日齢の Tg および Wt マウスに AKAV Iriki 株あるいは溶媒 (DMEM) をそれぞれ大脳皮質内に 5μL ずつ接種した (表 3-1)。大脳皮質内接種は 2 段針を用いて、Bregma を基準にして、anterior-posterior (AP) : -1.0mm、medial-lateral (ML) : +2.0mm、dorsal-ventral (DV) : +1.0mm に行った。マウスは接種 6 日後にイソフルランで安楽死処置し、脊髄を採取した。また、瀕死状態および死亡マウスについても、脊髄組織を採取した。

病理組織学、免疫染色および蛍光二重染色

採取脊髄組織を 10%リン酸中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋したのち、厚さ 4μm で組織切片を作製した。切片はキシレンで脱パラフィンした後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、ルクソール・ファスト・ブルー (LFB) -HE 染色および免疫染色を行った。脊髄腹角に認められた NeuN (神経細胞マーカー) 陽性かつ神経細胞の形態的特徴をもつ細胞を腹角神経細胞とした。

免疫染色については、脱パラフィンした切片について表 3-2 に示した条件で抗原賦活化を行った。オートクレーブの設定は 120℃、10 分間とした。3%過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング溶液 (8%スキムミルク・TBS) で 37℃、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、TBS で希釈した一次抗体 (表 3-2) と 4℃で一晩反

応させた。その後、Envision polymer (Dako, Glostrup, Denmark) 法により二次抗体と 37℃で 40 分間反応させた。0.5 % DAB (Dojindo Laboratories、熊本) 溶液に 0.1%になるよう H₂O₂ (和光純薬、大阪) を添加した溶液を用いて発色した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

蛍光二重染色は上記免疫染色と同様に脱パラフィンした切片に抗原賦活化を行い、ブロッキング溶液 (8%スキムミルク・TBST) で 37℃、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体 (表 2-2) と 4℃で一晩反応させた。TBST を用いて洗浄した後に他方の一次抗体と 37℃で 1 時間反応させた。その後、TBST で希釈した Alexa 488 標識抗ヤギ IgG 抗体 (1:200 希釈、Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) と Alexa 594 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:200、Invitrogen Life Technologies, Burlingame, CA) の混合液と室温で 1 時間反応させた。その後、封入剤 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (ZEISS, Jena, Germany) を用いて観察した。

免疫染色結果の解析

脊髄の免疫染色組織標本は NIS-Elements ソフトウェア (Nikon Instruments, 東京) を用いて Nikon DM-U3 デジタルカメラで撮影した。画像解析は National Institutes of Health (NIH) Image J ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。すなわち、カラーチャネルを RGB 8-bit イメージに分離し、閾値 (threshold) の設定により免疫染色陽性領域を検出し、腹角灰白質の面積に対する比率を算出した。得られた結果は、平均値±標準誤差で示した。データは 2 群間については Student の *t* 検定、多群間については一元配置分散分析 (one-way ANOVA) における Sheffe's *F* test を用いて検定し、

$p < 0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

タンパク質の抽出

採材組織（頸髄：C3-5、胸髄：T5-7、腰髄：L3-5）は使用時まで -80°C で凍結保存した。タンパク質抽出用緩衝溶液（150 mM NaCl、1 mM EDTA、2 mM Na_3VO_4 、10 mM NaF、1% NP-40 および protease inhibitor cocktail（5% v/v）を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5））を添加し、氷冷下で Bio Masher II（Nippi、東京）を用いて攪拌した。これを $12,000\times g$ 、 4°C で 20 分間遠沈した後、上清中の組織タンパク質をサンプルとした。サンプルは用いるまで、 -80°C で凍結保存した。タンパク質量は、DC プロテインアッセイキット（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）および iMark マイクロプレートリーダー（Bio-Rad）を用いて定量した。また、サンプルは 5%のメルカプトエタノールを含む sodium dodecyl sulfate（SDS）処理液（Laemmli sample Buffer、Bio-Rad Laboratories）と 1:1 の割合で混合し、 100°C で 10 分間煮沸した後、ウェスタンブロッティング法に用いた。

ウェスタンブロッティング

上述のタンパク質サンプルについて、15%ポリアクリルアミドゲル（ATTO、東京）を用いて室温で 90 分間電気泳動（ゲル 1 枚あたり 20mA 定電流）し、100%メタノールで親水化処理したタンパク質ブロッティング用ポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜（GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）に、ブロッティング（20V 定電圧、50 分間）した。ブロッティング膜を TBST（0.05% Tween-20 および 137 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5）で洗浄し、3% スキムミルクを含む TBST で 60 分間ブロッキングした。TBST で 5 分間洗浄した後、3%スキムミルクを含む TBST で希釈した抗 LC3 抗体（表 3-

2) と振盪しながら 4℃で一晩反応させ、反応後 TBST で 5 分間 3 回洗浄した。次に、3% スキムミルクを含む TBST で希釈した HRP 標識 2 次抗体 (1:5000, GE Healthcare) と室温で 1 時間反応させ、TBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。その後、発光検出試薬 (ECL prime、GE Healthcare) と反応させ、Chemi-Doc XRS plus System (Bio-Rad) を用いて陽性バンドを検出、画像解析ソフト Image Lab (Bio-Rad) で定量した。

結果

病理組織変化

70 日齢および 100 日齢の Tg マウスの脊髄では、AKAV 接種群、非接種群ともに、脊髄腹角を中心に神経細胞の変性を認め、神経網および神経細胞体内に空胞がみられた。これら空胞の辺縁は SOD1、ミトコンドリアマーカートの Tom20 に陽性であった。Tg マウスの脊髄腹角における空胞変性の程度を 0（なし）～+3（重度）の 4 段階でスコア化したところ、70 日齢、100 日齢のいずれにおいても、AKAV 接種群は非接種群と比較してスコアは有意に重度であった。これに対し、Wt では、日齢や AKAV 接種、非接種にかかわらず、神経網および神経細胞体の空胞変性は認められなかった。また、100 日齢マウスでは、AKAV 接種群は非接種群と比較して、脊髄腹角における神経細胞数が有意に少なかった（図 3-1）。

SOD1 の発現

SOD1 に対する抗体を用いた免疫染色の結果（図 3-2）、SOD1 陽性像は、70 日齢、100 日齢ともに Tg マウスでのみ認められた。脊髄腹角の灰白質に占める SOD1 陽性面積率は、日齢によらず AKAV 接種群で非接種群と比べてわずかに低かったが、有意差はなかった。

ユビキチンの発現

ユビキチンに対する抗体を用いた免疫染色の結果（図 3-3）、ユビキチン陽性像は、70 日齢では AKAV 接種 Tg マウスでのみ、100 日齢では AKAV 接種と非接種とに関わらず Tg マウスでのみ認められた。脊髄腹角の灰白質におけるユビキチン陽性像の数は、70 日齢、100 日齢ともに AKAV 接種群で非接種群と

比べて有意に多かった。

LC3 の発現

LC3 に対する抗体を用いた免疫染色の結果 (図 3-4)、日齢や Tg と Wt、AKAV 接種と非接種とに関わらず、脊髄腹角の神経細胞の細胞質に顆粒状の弱陽性像、また神経細胞体、神経細胞の樹状突起、灰白質の主に神経網において、オートファジー小胞を示す斑点状の強陽性像 (LC3 puncta) が認められた。斑点陽性像の数を各群で比較したところ、70 日齢、100 日齢のいずれも、Wt マウスにおいて AKAV 接種群で非接種群に比べてやや多い傾向にあり、Tg マウスでは AKAV 接種群で非接種群と比較して多く、特に 100 日齢において、有意に多かった。

また、LC3-I から LC3-II への移行についてウェスタンブロッティング法により検索した結果 (図 3-5)、LC3-I と LC3-II の発現比率 (LC3-II/LC3-I) は Tg、Wt マウスにおいて、日齢に関わらず、AKAV 接種群で非接種群に比べて有意ではないが高い傾向であった。

p62 の発現

p62 に対する抗体を用いた免疫染色の結果 (図 3-6)、日齢や Tg と Wt、AKAV 接種と非接種とに関わらず、脊髄腹角の神経細胞の細胞質に顆粒状の p62 弱陽性像が認められた。しかし、p62 の凝集・蓄積を示す塊状の強陽性像は、Tg マウスでのみ認められた。この強陽性像の数を Tg マウスで比較したところ、70 日齢、100 日齢のいずれにおいても、AKAV 接種群が非接種群と比較して有意に多かった。

蛍光二重染色

AKAV 接種マウスにおいて、オートファジー関連因子である LAMP2 (Lysosome-associated membrane proteins 2、ライソゾームマーカー) と AKAV 抗原の発現局在を蛍光二重染色により検索したところ、Wt マウスで日齢に関わらず、一部の神経細胞の細胞質に共局在を認めた (図 3-7)。Tg マウスにおいても、数は少なかったが、神経細胞の細胞質に共局在が認められた。

考察

Tg マウスで認められた空胞変性は、日齢に関わらず AKAV 接種群で非接種群より重度であり、ユビキチンの沈着も多いことが確認された。一方で、SOD1 の発現レベルは AKAV 接種群で非接種群と比べて低かったが、これは神経細胞数の減少によるものと考えられ、AKAV 接種そのものにより SOD1 の沈着量は変化しないと思われる。これらの結果から、AKAV 感染は神経細胞内の SOD1 の蓄積には影響することなく、ミトコンドリアの空胞化とユビキチンの沈着を促進すると推察された。

オートファジーはウイルス感染によっても亢進することが知られている [Kudchodkar and Levine, 2009]。ブニヤウイルスでは hantavirus や Rift Valley virus、Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus の感染において、ウイルス除去のためにオートファジーが亢進すると報告されている [Ganaie and Mir, 2014; Husseni *et al.*, 2012; Moy *et al.*, 2014; Silvas *et al.*, 2016]。また、SOD1^{G93A} マウスでは、オートファゴソームの形成促進が、異常タンパク質の除去亢進につながらず、逆に病変を増悪させることから、病態進行へのオートファゴソーム分解異常の関与が指摘されている [Morimoto *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011]。今回の検索では、Tg マウスにおいて、AKAV 接種群で非接種群と比べて、オートファジーに関連する LC3 と p62 の強陽性像が多かった。一方、Wt マウスでは、AKAV 接種により LC3 の強陽性像がやや多くなったが、p62 の強陽性像は観察されなかった。また、LC3-II/LC3-I 比は、Tg と Wt マウスにおいて日齢に関わらず、AKAV 接種により有意ではないが高くなった。さらに、蛍光二重染色において、Tg および Wt マウスで日齢に関わらず、ライソゾームマーカーの LAMP2 と AKAV 抗原の共局在が認められた。これらのことから、マウスの脊髄神経細胞では AKAV 感染によりオートファジーが亢

進すること、さらに Tg マウスでは感染によりオートファジー小胞の蓄積も増加することが示唆された。Tg マウスのみでオートファジー小胞の蓄積が認められたのは、蓄積がオートファジーの亢進ではなく、オートファゴソームの分解異常によるためと考えられた。

運動神経細胞において変異 SOD1 は、p62 により認識され、オートファジーによる分解を受ける [Gal *et al.*, 2007, 2009] ことが報告されており、変異 SOD1 の凝集・蓄積がオートファジーの亢進や LC3、p62 の蓄積・凝集を誘発することが推察される。しかし、今回、AKAV 感染による SOD1 の発現レベルの増加は確認されず、また、LAMP2 と AKAV 抗原の共局在像の分布は、LC3、p62 の強陽性像の分布と完全には一致しなかった。本章の結果から、AKAV 感染により傷害された細胞小器官とオートファジーの関連を示唆する有用な知見は得られなかったが、酸化ストレス、小胞体ストレスがオートファジーの亢進に関係する [Kiffin *et al.*, 2004; Yorimitsu *et al.*, 2006] ことから、AKAV 感染によるミトコンドリアなどの細胞小器官の傷害が、LC3、p62 の蓄積・凝集を促進する可能性が示唆された。また、通常オートファジーの亢進により細胞死が誘発される [Gozuacik and Kimchi, 2007; Schwartz *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 2004] が、本章ではオートファジー経路の異常が指摘されている Tg マウスにおいても、神経細胞の脱落は Wt マウスと同程度であったことから、AKAV による細胞死の機序にオートファジーが直接関係している可能性は低いと考えられた。

ALS 患者において感染が確認されているエンテロウイルスやヘルペスウイルスには、神経向性で脳脊髄炎を引き起こす株が存在する [Nakajima and Shoji, 2011; Ooi *et al.*, 2010]。これらの株をマウスに感染させると、脊髄神経細胞に病変が形成され、臨床症状を引き起こす [Chen *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 1982]。今回の検索では、AKAV 感染による病変が急性かつ致死性のものであつ

たため、運動機能障害については評価できなかったが、AKAV 感染が細胞小器官を傷害し、オートファジーを亢進することが確認できた。よって、SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスを用いた感染実験系は、エンテロウイルスやヘルペスウイルスなどの他の神経向性ウイルスと ALS の病態の関係を検討するためのツールとしても有用であることが示唆された。

本章で得られた結果から、Tg マウスでは、AKAV 感染がオートファジーの亢進、ミトコンドリアなどの細胞小器官の傷害を介し、ユビキチン化タンパクやオートファジー関連タンパクの LC3、p62 などの蓄積・凝集を促進することで、病態が進行する可能性が推測された。しかし、Wt マウスでは、オートファジーの亢進は認められたが、それ以外の変化は認められなかった。よって、インフルエンザウイルスなどとは違い、AKAV は神経変性の素因のないマウスに、重度の神経変性を誘発しないと考えられた。以上のことから、AKAV 感染は ALS の病態を増悪するが、発症には直接関連しないことが示された。

要約

ALS ではエンテロウイルス、ヘルペスウイルスなどの感染が随伴していたという報告がみられるが、その関連性を詳細に検討した報告はない。第 2 章において、AKAV がミトコンドリアや小胞体など ALS の病態に関与する細胞小器官を傷害することを見出した。そこで、AKAV Iriki 株を SOD1^{G93A} Tg マウスに接種し、オートファジー関連因子などの発現を検索し、ALS などの神経変性疾患における神経向性ウイルス感染の病態への関与を検討した。その結果、Tg マウスでは、日齢に関わらず、AKAV 感染により脊髓腹角の空胞変性の程度がより重度になり、ユビキチンの沈着も多くなった。また、Tg マウスにおいて、AKAV 接種群で非接種群と比べて、オートファジーに関連する LC3 と p62 の強陽性像が多かった。一方、Wt マウスでは、AKAV 接種により LC3 の強陽性像がやや増加したが、p62 の強陽性像は観察されなかった。さらに、Tg と Wt マウスにおいて、日齢に関わらず、LC3-II/LC3-I 比が AKAV 接種により有意ではないが上昇し、蛍光二重染色において、ライソゾームマーカーの LAMP2 と AKAV 抗原の共局在が認められた。以上の結果から、Tg マウスでは、AKAV 感染がオートファジーの亢進、ミトコンドリアなどの細胞小器官の傷害を介して、ユビキチン化タンパクやオートファジー関連タンパクの LC3、p62 などの蓄積・凝集を促進し、病態が進行する可能性が推測された。一方、Wt マウスでは、オートファジーの亢進は認められたが、それ以外の変化は認められなかった。よって、AKAV は神経変性の素因のないマウスには、重度の神経変性を誘発しないと考えられた。以上のことから、AKAV 感染は ALS の病態を増悪するが、発症には直接関連しないことが示された。

表3-1：AKAV接種実験

接種ウイルス	マウス	接種経路	接種量 (μl)	接種日齢	匹数
Iriki 5.0×10 ⁴ PFU/0.1ml	SOD1 ^{G93A}	i.c.	5	70	11
	Wt	i.c.	5	70	10
DMEM	SOD1 ^{G93A}	i.c.	5	70	5
	Wt	i.c.	5	70	5
Iriki 5.0×10 ⁴ PFU/0.1ml	SOD1 ^{G93A}	i.c.	5	100	7
	Wt	i.c.	5	100	7
DMEM	SOD1 ^{G93A}	i.c.	5	100	5
	Wt	i.c.	5	100	5

DMEM：Dulbecco's modified Eagle's medium（AKAV非接種対照）

表3-2：用いた一次抗体

抗体	種類	認識構造	抗原賦活化	希釈倍率	販売元、製品番号
AKAV OBE株	Rabbit, p	AKAV	-	1:500 1:200(IF)	動物衛生研究所, 津田知幸先生
NeuN	Mouse, m	神経細胞	Citrate buffer	1:200	Millipore, MA, USA, #MAB377
SOD1	Rabbit, p	-	-	1:1000	ENZO Life Sciences, NY, USA, #ADI-SOD-100
ubiquitin	Rabbit, p	-	-	1:200	Dako, Glostrup, Denmark, #Z0458
LC3	Rabbit, p	-	-	1:500 1:200(IF) 1:1000(WB)	MBL, Aichi, Japan, #PM036
p62	Rabbit, p	-	-	1:200	MBL, Aichi, Japan, #PM045
LAMP2	Goat, m	-	Citrate buffer	1:50(IF)	Santa Cruz, CA, USA, #sc-8100
beta-actin	Rabbit, p	-	-	1:2000(WB)	Cell Signaling Technology, MA, USA, # 4967

種類: m, monoclonal; p, polyclonal

抗原賦活化: Citrate buffer, pH6.0

希釈倍率: IF, Immunofluorescence; WB, Western blotting

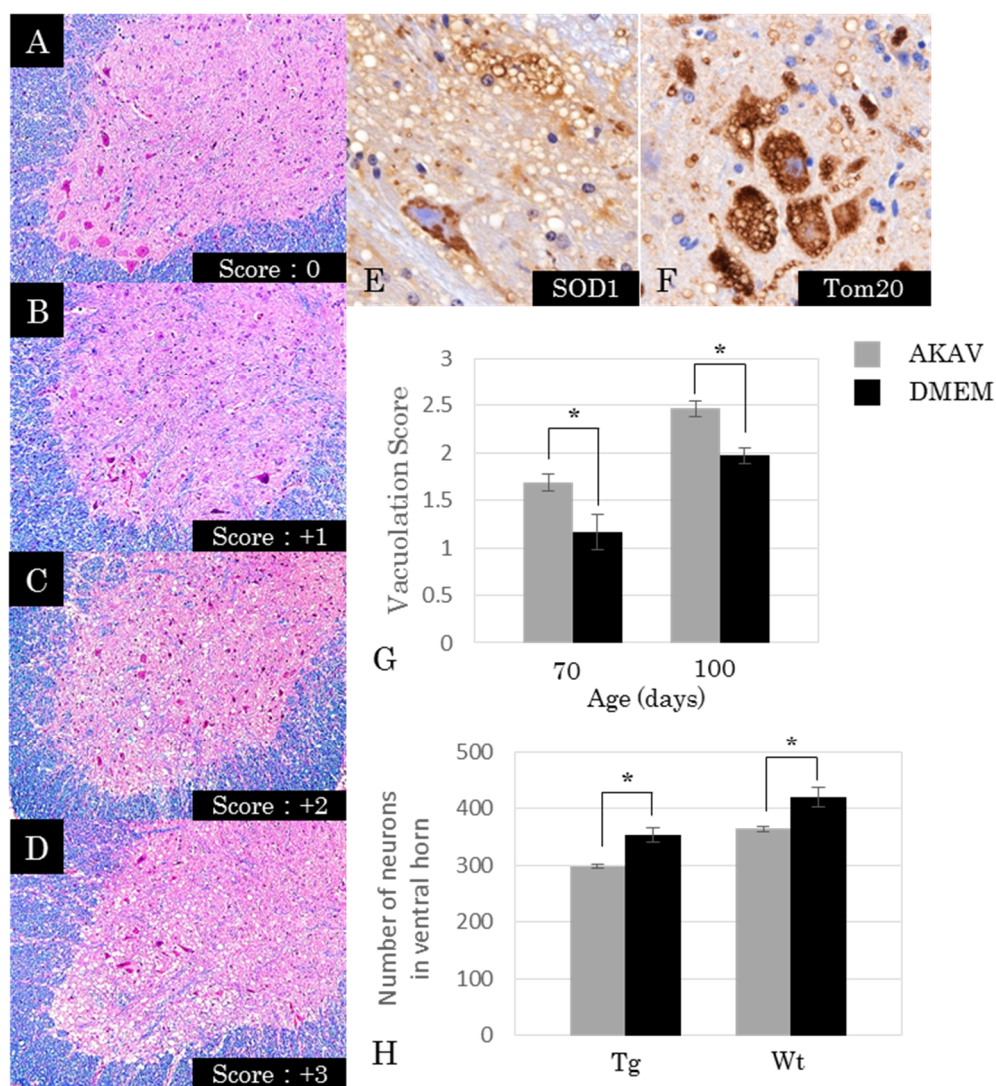


図 3-1 : 脊髓腹角の病理組織学的変化。A,B,C,D : 腰髄腹角、LFB-HE 染色。A : Wt、70 日齢、AKAV 接種、空胞スコア,0。B : Tg、70 日齢、AKAV 接種、スコア,+1。C : Tg、100 日齢、非接種対照、スコア,+2。D : Tg、100 日齢、AKAV 接種、スコア,+3。E,F : 腰髄、Tg、100 日齢、非接種対照。SOD1 免疫染色 (E)、Tom20 免疫染色 (F)。G : 腹角における空胞化の程度。H : 100 日齢、腹角の神経細胞数。空胞化の程度は 70 日齢、100 日齢のいずれにおいても、AKAV 接種群は非接種群と比較して有意に重度であった。100 日齢マウスでは、接種群は非接種群と比較して、神経細胞数が有意に少なかった。* $p < 0.05$ 。

AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

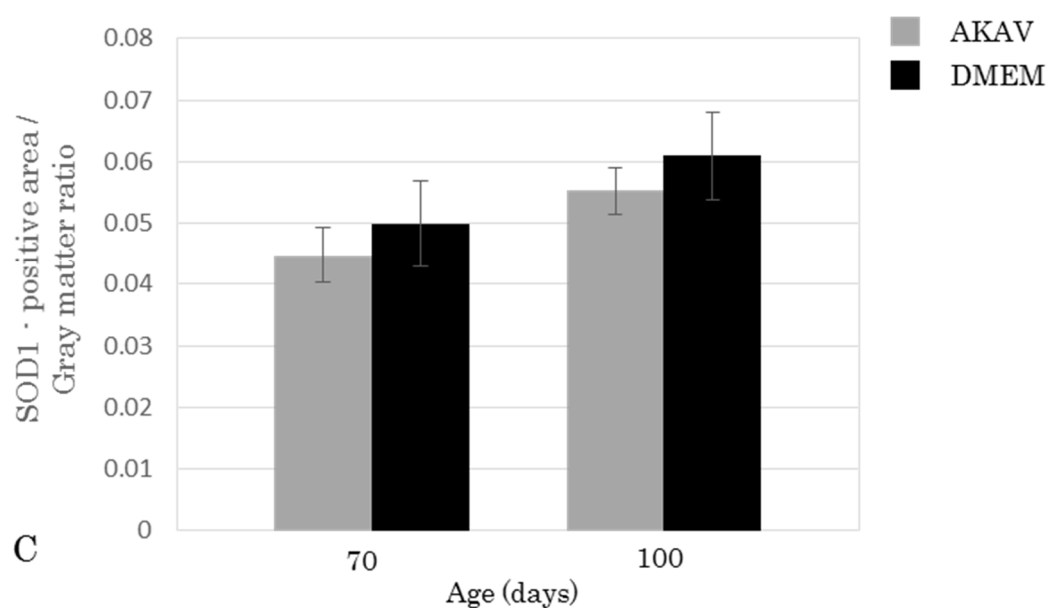
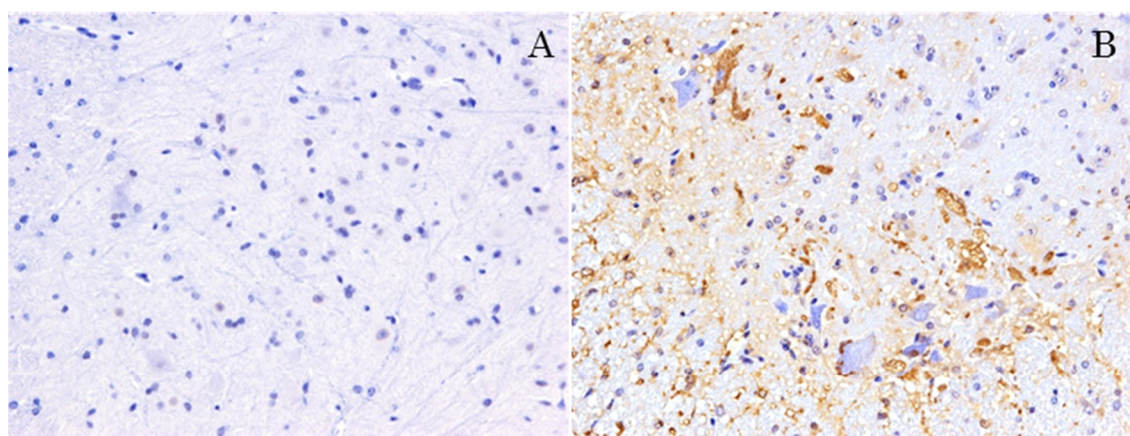


図 3-2 : SOD1 免疫染色。

A,B : 腰髄腹角。A : Wt、70 日齢、AKAV 接種。B : Tg、70 日齢、AKAV 接種。

C : Tg マウスの灰白質全体に占める SOD1 陽性面積率。陽性像は、70 日齢、100 日齢ともに Tg マウスでのみ認められた。灰白質に占める陽性面積率は、日齢によらず AKAV 接種群で非接種群と比べてわずかに低かった。

AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

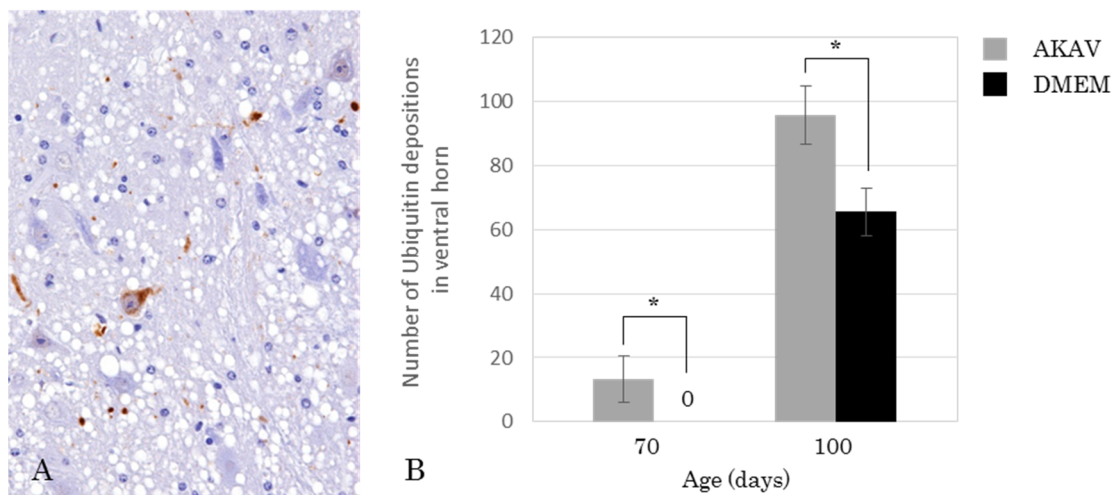


図 3-3 : ユビキチン免疫染色。

A : Tg、100 日齢、AKAV 接種、腰髄腹角。B : Tg マウスの脊髄腹角におけるユビキチン沈着数。陽性像は、70 日齢、100 日齢ともに Tg マウスでのみ認められ、日齢によらず AKAV 接種群で非接種群と比べて有意に多かった。 $*p < 0.05$ 。

AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

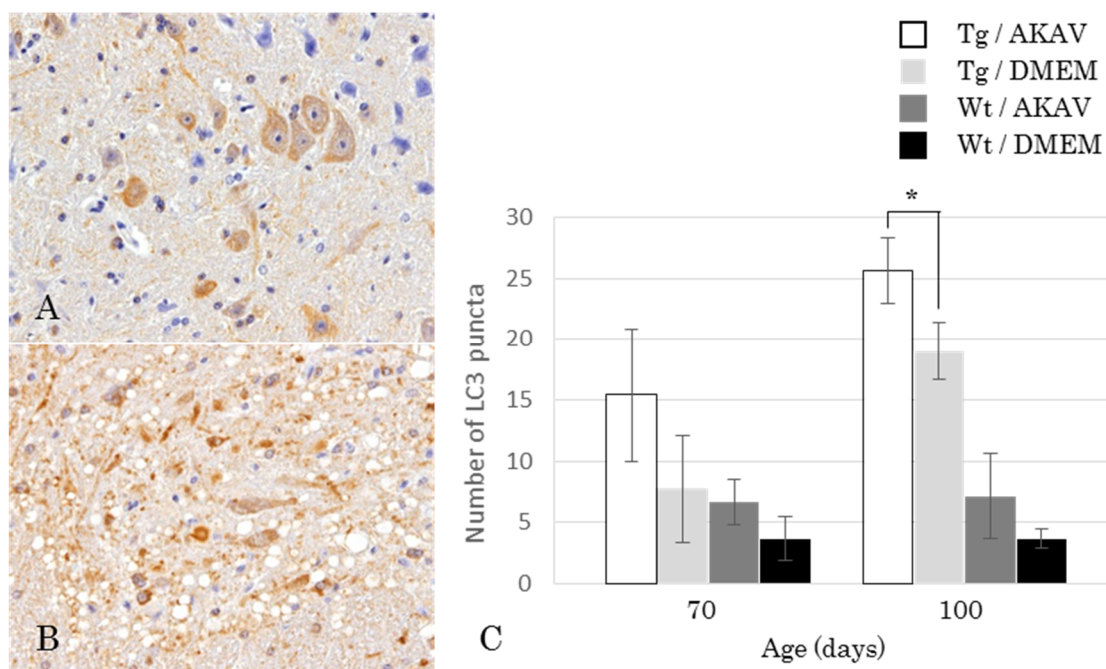


図 3-4 : LC3 免疫染色。

A,B : 腰髄腹角。A : Wt、70 日齢、非接種対照。B : Tg、100 日齢、非接種対照。

C : 脊髄腹角における LC3 陽性斑点 (LC3 puncta) の数。脊髄腹角の神経細胞の細胞質に顆粒状の弱陽性像が、また神経細胞体、神経細胞の樹状突起、灰白質の主に神経網において、陽性斑点 (LC3 puncta) が認められた。陽性斑点の数は、Tg マウス、Wt マウスの AKAV 接種群で非接種群に比べて多い傾向にあり、100 日齢の Tg マウスでは有意に多かった。* $p < 0.05$ 。

AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

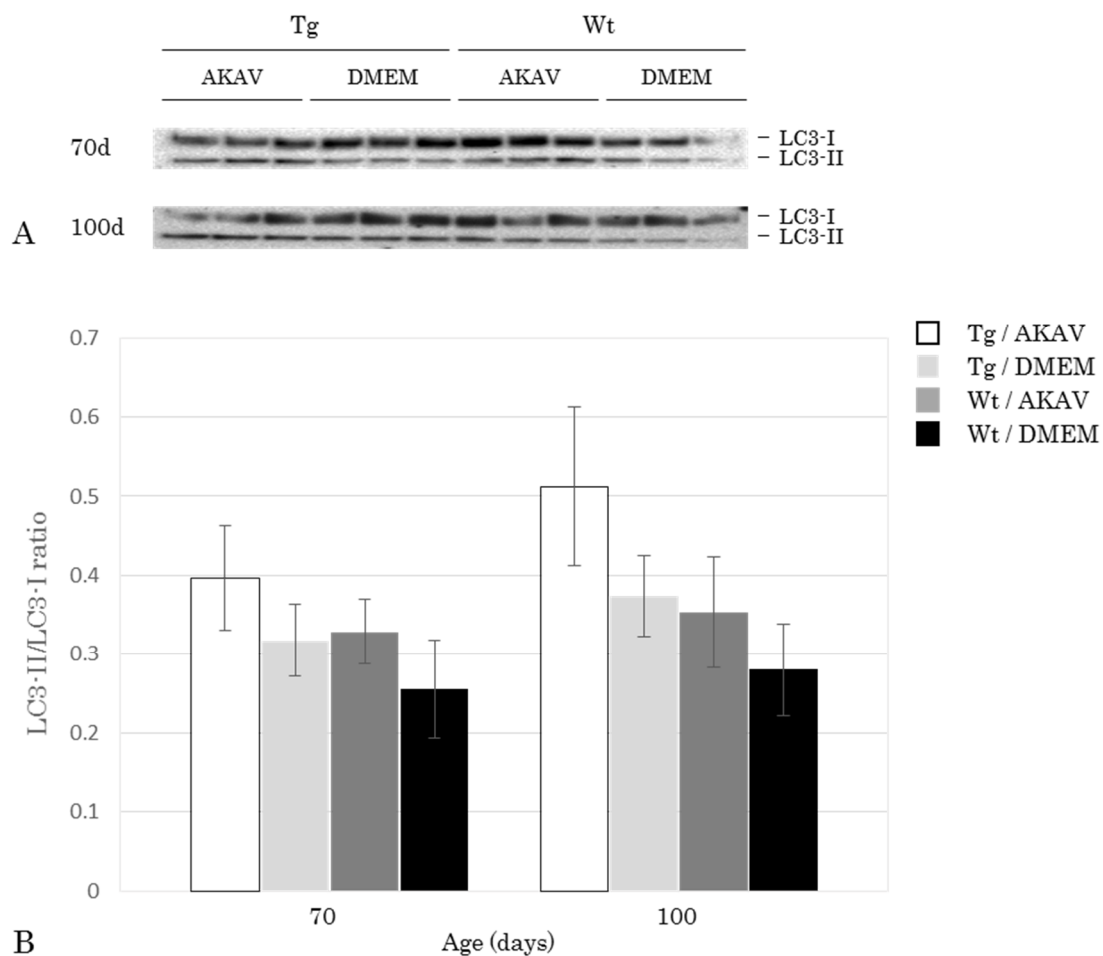


図 3-5 : ウェスタンブロッティングによる LC3-II / LC3-I 発現量比。

A : ウェスタンブロッティングの結果。各レーンは個体（各群 3 個体）を示す。

B : LC3-I と LC3-II の発現量比。70 日齢あるいは 100 日齢の Tg マウスおよび Wt マウス。Tg マウス、Wt マウスでは、AKAV 接種群で非接種群に比べ発現量の比が、有意ではないが高い傾向にあった。

AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

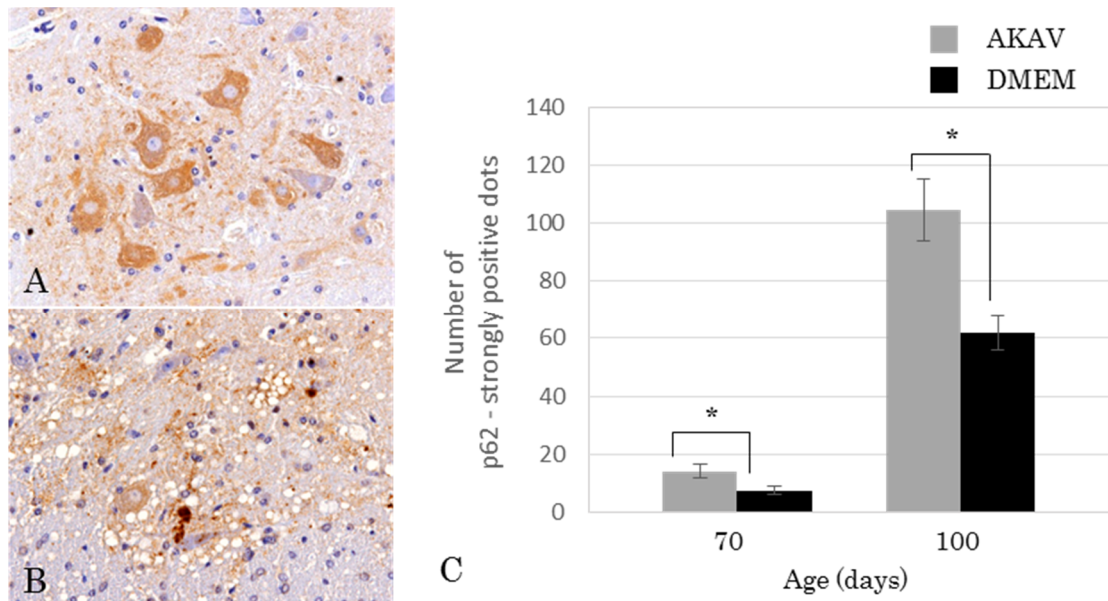


図 3-6 : p62 免疫染色。

A,B : 腰髄腹角。A : Wt、70 日齢、AKAV 接種。B : Tg、100 日齢、非接種対照。C : Tg マウスの脊髄腹角における p62 強陽性像の数。神経細胞の細胞質には顆粒状の p62 弱陽性像が認められた。塊状の強陽性像は Tg マウスの主に神経網に確認された。強陽性像の数は、70 日齢、100 日齢のいずれにおいても、AKAV 接種群で非接種群と比較して有意に多かった。 $*p < 0.05$ 。

AKAV : AKAV 接種、DMEM : AKAV 非接種対照

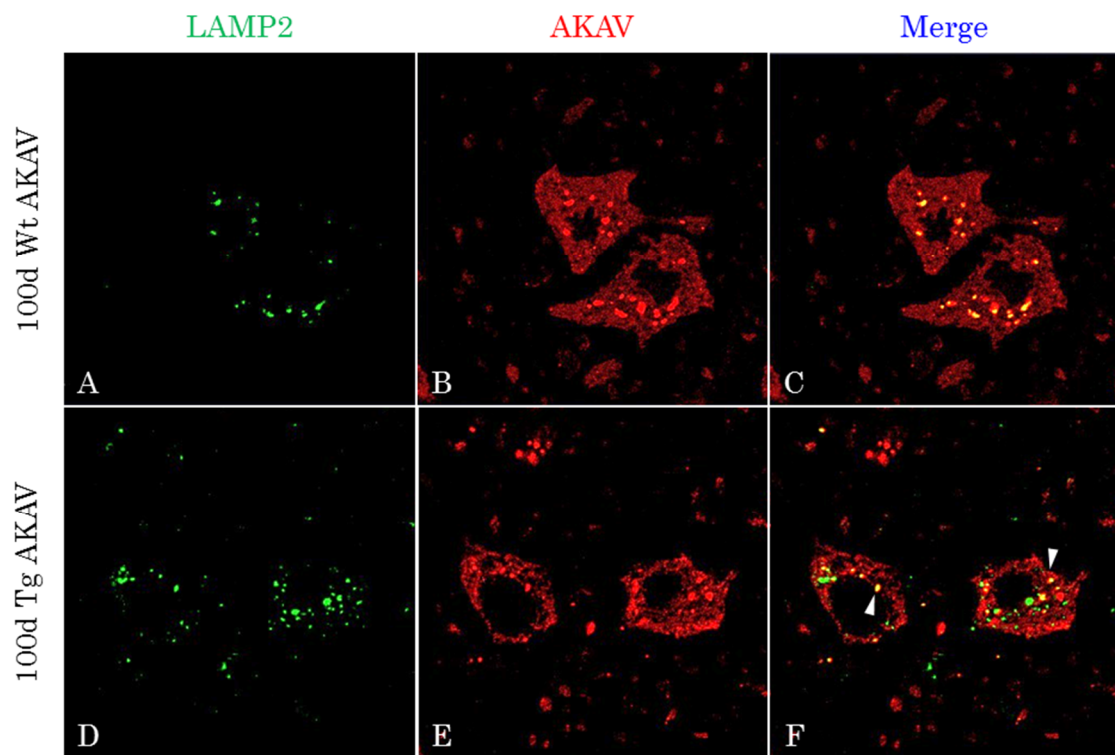


図 3-7 : 蛍光二重染色。

A,B,C : Wt、100 日齢、AKAV 接種、腰髄腹角。D,E,F : Tg、100 日齢、AKAV 接種、腰髄腹角。A,D : LAMP2 (緑)。B,E : AKAV (赤)。

C,F:LAMP2/AKAV。Wt マウスで日齢に関わらず、神経細胞の細胞質に LAMP2 と AKAV の共局在を認めた。Tg マウスにおいても、数は少なかったが、共局在が認められた (矢頭)。

AKAV : AKAV 接種

総括

AKAV 感染によるアカバネ病は、日本の畜産において重要な疾病の一つである。ウシ、ヒツジ、ヤギ等の反芻獣に繁殖障害を引き起こし、その流行は畜産業に多大な経済的損失を発生させる。しかし、その感染制御法や治療法の開発に必要となるウイルス学的知見はいまだ十分に得られていない。そこで本研究では、AKAV の病理発生機序について、神経病原性に着目して研究を行った。第 1 章～第 2 章では、AKAV の実験的感染モデルマウスの病態を通して、アカバネ病の病理発生について考察した。第 3 章では、第 1 章～第 2 章で得られた知見をもとに、ALS モデルマウスを用いて、神経変性疾患における神経向性ウイルス感染の病態への関与を検討した。

第 1 章では、BALB/c マウスにおける AKAV OBE-1 株と Iriki 株の病原性を比較するとともに、中枢神経系における AKAV 抗原の分布を詳細に検索した。まず、3 日齢、1、2、3、8 週齢のマウスに AKAV OBE-1 株または Iriki 株を腹腔内または大脳皮質内に接種し、それぞれの株について接種マウスの死亡率、組織病変、週齢による神経病原性の変化を検討した。Iriki 株腹腔内接種マウスは 1 週齢まで致死的な神経症状を示し、脳でウイルス抗原が認められたのに対し、OBE-1 株腹腔内接種マウスは、いずれの週齢でも神経症状を示さず、脳でウイルス抗原は認められなかった。一方、脳内接種では、OBE-1 株の場合、3 週齢まで脳内でウイルスの増殖が確認され、炎症反応も認められた。Iriki 株脳内接種マウスでは、OBE-1 株接種マウスに比べてより早期に、週齢によらず致死的な症状が認められ、ウイルス抗原も多数確認された。これらの結果から、マウス中枢神経組織への侵入性およびマウス中枢神経組織での増殖性において、Iriki 株は OBE-1 株よりも強毒であることが明らかになった。次に、8 週齢のマウスに AKAV Iriki 株を大脳皮質内または線条体内接種し、マウス中枢神経系における AKAV 抗原の分布の詳細な検索を行った。接種マウスでは、ウイルスは

接種量や接種部位にかかわらず、視床、視床下部、橋背側、網様体、赤核、動眼神経核、三叉神経核、前庭神経核などの脳幹部に重度に局在し、結合線維、投射線維などにも軽度に分布していた。脊髄では、主に腹核の神経細胞に分布していた。また、線条体内接種では、未分化な神経細胞が存在する SVZ においてもウイルス抗原が確認された。以上より、AKAV は BBB を通って脳へ侵入した後、まず SVZ の未分化神経細胞に感染し、増殖した後に神経向性の伝播によって、脳幹部の神経核細胞や脊髄腹角の神経細胞に広範分布するものと考えられた。

これまで AKAV OBE-1 株と Iriki 株のそれぞれを用いた感染実験は多く行われてきたが、病原性の相違を検討した研究報告はほとんどなく、とくにウイルス感染による脳病変の発生過程と組織像について比較した研究は皆無であった。本研究で得られた OBE-1 株と Iriki 株の神経病原性は過去の感染実験や牛の症例の結果と矛盾せず、AKAV の生後感染における神経病原性の株間の相違は、中枢神経組織への侵入性および中枢神経組織での増殖性によって規定されるものと考えられた。Iriki 株脳内接種マウスは神経病原性、中枢神経系でのウイルス抗原の分布において、生後牛の AKAV 感染におけるそれらをよく再現していると考えられる。AKAV 感染モデルマウスを用いることで、中枢神経内での AKAV の動態を簡便に再現できることから、このモデルは AKAV の感染機構を解明するのに非常に有用であると考えられた。

ヒト変異 SOD1 遺伝子を導入した SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスは、ALS のモデルとして最も汎用されており、病変形成における、ミトコンドリアやゴルジ体、小胞体の脆弱性との関連も指摘されている。そこで、第 2 章では SOD1^{G93A} マウスを用いて AKAV 感染実験を行い、神経細胞に対する細胞傷害の機序を検討した。70 日齢の Tg および Wt マウスに AKAV Iriki 株を大脳皮質内接種し、脊髄病変について細胞小器官、アポトーシス関連因子の発現を中心

に病理学的な検索を行った。AKAV の感染により、神経細胞のゴルジ体が Tg マウスで Wt マウスに比べてより多く断片化していた。GM130 (ゴルジ体マーカー) の発現は、Wt マウスでは AKAV 接種群で非接種群と比べて少ない傾向であったのに対し、Tg マウスでは有意に少なかった。ミトコンドリア、小胞体については、Tg マウス、Wt マウスとも AKAV 接種群で Tom20 (ミトコンドリアマーカー)、PDI (小胞体マーカー) の発現量は少ない傾向を示した。また、ウェスタンブロッティングの結果、アポトーシス関連因子である Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9、p-p38、p-p53、NF- κ B の発現レベルは AKAV 接種群と非接種群とで差は認められなかった。一方、RIP の発現は AKAV 接種群で非接種群と比べ有意ではないが高かった。以上の結果から、AKAV 感染により主にゴルジ体が傷害されることで、神経細胞死が誘導されるものと考えられた。また、ゴルジ体の傷害にはミトコンドリアや小胞体の変化が関わっている可能性が示唆された。さらに、AKAV 感染により誘導される神経細胞死は、アポトーシス関連因子は発現せず、RIP が発現していたことから、アポトーシスではなく、ネクロトーシスであると推察された。

第 3 章では、ALS における神経向性ウイルス感染の病態への関与を明らかにすることを目的として、AKAV Iriki 株を 70 日齢、100 日齢の SOD1^{G93A} マウスに接種し、オートファジー関連因子を中心に脊髄を病理学的に検索した。Tg マウスで認められる脊髄腹角の空胞変性は、日齢に関わらず AKAV 接種群で非接種群と比べてより重度であり、ユビキチンの沈着も多い一方で、SOD1 の発現レベルは AKAV 接種群で非接種群と比べて少ない傾向だった。また、Tg マウスでは、AKAV 接種群で非接種群と比べて、LC3、p62 の強陽性像も多いことが確認された。これに対し Wt マウスでは、LC3 の強陽性像がやや多いだけであった。さらに、蛍光二重染色において、Tg および Wt マウスで日齢に関わらず、

ライソゾームマーカーの LAMP2 と AKAV 抗原の共局在が認められた。これらの結果から、Tg マウスでは、AKAV 感染はミトコンドリアなどの細胞小器官の傷害、オートファジーの亢進を介して、ユビキチン化タンパクやオートファジー関連タンパクである LC3、p62 などの蓄積・凝集を引き起こし、病態を進行させる可能性が示唆された。

以上の本研究で得られた知見をふまえ、マウス中枢神経における AKAV の感染動態を以下のように考察した。すなわち、AKAV は BBB を通過して脳へ侵入した後、まず SVZ などに存在する未分化神経細胞に感染する。そこで増殖した後に神経向性の伝播により、脳幹部の神経核細胞や脊髓腹角の神経細胞に分布し、細胞小器官を傷害することで、主にネクローシスを誘導し、神経細胞死を引き起こすと推察された。また ALS モデルの Tg マウスに AKAV を感染させると、オートファジーの亢進や、細胞小器官の傷害を介して、ユビキチン化タンパクやオートファジー関連タンパク質の蓄積・凝集が促進され、病態をさらに進行させる可能性が推測された。これまでに報告されている情報とあわせると、AKAV 感染神経細胞において、オートファジーの亢進と細胞小器官の傷害、タンパク質の蓄積・凝集が相互に関連し、最終的に神経細胞の脱落が生じることが想定されるが、今回の検索において、AKAV 感染から神経細胞の脱落に至るまでの詳細な機序を解明することはできなかった。

本研究では、AKAV 感染マウスの病理学的検索を通して、OBE-1 株と Iriki 株の病原性の相違、とくに Iriki 株の神経病原性の特徴を明らかにし、また AKAV などの神経向性ウイルスが ALS の病態を増悪する可能性を示した。本研究により得られた知見は、AKAV の病理発生のみならず、ブニヤウイルス全体の感染機構を解明する一助となり、さらには神経変性疾患とウイルス感染症との関係解明に貢献するものと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の機会を与えて頂き、博士論文をまとめるようご指導・ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室の中山裕之教授、病理組織学の基礎から論文作成に至るまで、終始懇切なるご指導・ご鞭撻を頂きました同研究室の内田和幸准教授、病理診断、研究活動を行うにあたり多数の有益な助言を頂きましたジェームズ・チェンバーズ助教に敬意を表するとともに深く感謝いたします。また常に研究環境を整え、支援して下さった土居千代さんに感謝いたします。

本研究において不可欠であるアカバネウイルスを快く提供して下さった、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻感染制御学研究室の上間亜希子博士に深謝いたします。

最後に、実験や実験動物の維持管理、様々な研究室業務をサポートして下さった獣医病理学研究室の皆様にご心より感謝いたします。

引用文献

Akashi H, Inaba Y. Antigenic diversity of Akabane virus detected by monoclonal antibodies. *Virus Res.* 1997;47(2):187-196.

Akashi H, Kaku Y, Kong XG, et al. Sequence determination and phylogenetic analysis of the Akabane bunyavirus S RNA genome segment. *J Gen Virol.* 1997;78(11):2847-2851.

Berger MM, Kopp N, Vital C, et al. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology.* 2000;54(1):20-25.

Bishop AL, Spohr LJ, Barchia IM. Factors affecting the spread of *Culicoides brevitarsis* at the southern limit of distribution in eastern Australia. *Vet Ital.* 2004;40(3):316-319.

Campadelli G, Brandimarti R, Dilazzaro C, et al. Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the golgi-apparatus after infection with herpes-simplex virus-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(7):2798-2802.

Cermelli C, Vinceti M, Beretti F, et al. Risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with seropositivity for herpesviruses and echovirus-7. *Eur J Epidemiol.* 2003;18(2):123-127.

Chen C, Yao Y, Lin S, et al. Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice. *J Virol*. 2007;81(17):8996-9003.

Chen S, Zhang X, Song L, et al. Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol*. 2012;22(1):110-116.

Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):263-268.

Chu CT. Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(5):423-432.

Craig CP, Nahmias AJ. Different patterns of neurologic involvement with herpes simplex virus types 1 and 2: isolation of herpes simplex virus type 2 from the duffy coat of two adults with meningitis. *J Infect Dis*. 1973;127(4):365-372.

Davies FG, Jessett D. A study of the host range and distribution of antibody to Akabane virus (genus bunyavirus, family Bunyaviridae) in Kenya. *J Hyg*. 1985;95(01):191-196.

de Almagro MC, Vucic D. Necroptosis: pathway diversity and characteristics. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;39:56-62.

De Chiara G, Marcocci ME, Sgarbanti R, et al. Infectious agents and neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. 2012;46(3):614-638.

Declercq W, Vanden Berghe Tom, Vandenabeele P. RIP Kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell*. 2009;138(2):229-232.

Deleidi M, Isacson O. Viral and inflammatory triggers of neurodegenerative diseases. *Sci Transl Med*. 2012;4(121):121ps3.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999;97(6):703-716.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, et al. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2005;37(11):719-727.

Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, et al. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ*. 2007;14(3):400-410.

Fontana J, López-Montero N, Elliott RM, et al. The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol*. 2008;10(10):2012-2028.

Gal J, Ström A, Kwinter DM, et al. Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin - independent mechanism. *J Neurochem*. 2009;111(4):1062-1073.

Gal J, Ström A, Kilty R, et al. p62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 2007;282(15):11068-11077.

Ganaie SS, Mir MA. The role of viral genomic RNA and nucleocapsid protein in the autophagic clearance of hantavirus glycoprotein Gn. *Virus Res.* 2014;187:72-76.

Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol.* 2007;78:217-245.

Gurney M, Pu H, Chiu A, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 1994;264(5166):1772-1775.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, et al. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 20):4077-4085.

Hicks SW, Machamer CE. Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1744(3):406-414.

Higgins CMJ, Jung C, Xu Z. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* 2003;4:16.

Hirata M, Goto Y, Ikeda S, et al. An outbreak of encephalomyelitis of calves infected with Akabane virus in Kagoshima prefecture. *J Jpn Vet Med Assoc.* 2008;61(10):771-776.

Hussein ITM, Cheng E, Ganaie SS, et al. Autophagic clearance of Sin Nombre hantavirus glycoprotein Gn promotes virus replication in cells. *J Virol*. 2012;86(14):7520-7529.

Ito Y, Yamada M, Tanaka H, et al. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol Dis*. 2009;36(3):470-476.

Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JAC, et al. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis*. 2000;7(6):623-643.

Jagoe S, Kirkland PD, Harper Pa. An outbreak of Akabane virus-induced abnormalities in calves after agistment in an endemic region. *Aust Vet J*. 1993;70(2):56-58.

Jang H, Boltz D, Sturm-Ramirez K, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):14063-14068.

Janssen RS, Nathanson N, Endres MJ, et al. Virulence of La Crosse virus is under polygenic control. *J Virol*. 1986;59(1):1-7.

Jääntti J, Hildén P, Rönkä H, et al. Immunocytochemical analysis of Uukuniemi virus budding compartments: role of the intermediate compartment and the Golgi stack in virus maturation. *J Virol*. 1997;71(2):1162-1172.

Jiang Z, Hu Z, Zeng L, et al. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria?. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(8):907-917.

Jucker M. The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. *Nat Med*. 2010;16(11):1210-1214.

Kamata H, Inai K, Maeda K, et al. Encephalomyelitis of cattle caused by Akabane virus in southern Japan in 2006. *J Comp Pathol*. 2009;140(2-3):187-193.

Kiffin R, Christian C, Knecht E, et al. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell*. 2004;15(11):4829-4840.

Kiriyama Y, Nochi H. The function of autophagy in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26797-26812.

Kitani H, Yamakawa M, Ikeda H. Preferential infection of neuronal and astroglia cells by Akabane virus in primary cultures of fetal bovine brain. *Vet Microbiol*. 2000;73(4):269-279.

Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000;290(5497):1717-1721.

Klionsky D, Agholme L, Agnello M, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2016;8(April):445-544.

Kobayashi T, Yanase T, Yamakawa M, et al. Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates. *Virus Res*. 2007;130(1-2):162-171.

Kohl A, Clayton RF, Weber F, et al. Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. *J Virol*. 2003;77(14):7999-8008.

Kong J, Xu Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the. *J Neurosci*. 1998;18(9):3241-3250.

Konno S, Koeda T, Madarame H, et al. Myopathy and encephalopathy in chick embryos experimentally infected with Akabane virus. *Vet Pathol*. 1988;25(1):1-8.

Konno S, Moriwaki M, Nakagawa M. Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. Spontaneous disease. *Vet Pathol*. 1982;19(3):246-266.

Konno S, Nakagawa M. Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. experimental disease. *Vet Pathol.* 1982;19(3):267-279.

Kudchodkar SB, Levine B. Viruses and autophagy. *Rev Med Virol.* 2009;19(6):359-378.

Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, et al. Isolation of akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Vet Microbiol.* 1987;15(3):243-248.

Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, et al. Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle: isolation of Akabane virus from affected fetuses. *Arch Virol.* 1976;51(1):67-74.

Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, et al. Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with Akabane virus. *Infect Immun.* 1977;17(2):338-343.

Landreau F, Galeano P, Caltana LR, et al. Effects of two commonly found strains of influenza A virus on developing dopaminergic neurons, in relation to the pathophysiology of schizophrenia. *PLoS One.* 2012;7(12):1-13.

Laywell ED, Kukekov VG, Steindler DA. Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals. *Exp Neurol.* 1999;156(2):430-433.

Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, et al. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13883-13888.

Lee J, Kim J, Park B, et al. Akabane viral encephalitis in calves in South Korea. *Vet Rec*. 2007;161(7):236-237.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.

Li XD, Lankinen H, Putkuri N, et al. Tula hantavirus triggers pro-apoptotic signals of ER stress in Vero E6 cells. *Virology*. 2005;333(1):180-189.

Liao YK, Lu YS, Goto Y, et al. The isolation of Akabane virus (Iriki strain) from calves in Taiwan. *J Basic Microbiol*. 1996;36(1):33-39.

Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med*. 2014;370(5):455-465.

Machamer CE. The Golgi complex in stress and death. *Front Neurosci*. 2015;9:421.

Manfredi G, Xu Z. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion*. 2005;5(2):77-87.

Martin JR. Spinal cord and optic nerve demyelination in experimental herpes simplex virus type 2 infection. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1982;41(3):253.

Misteli T, Warren G. Mitotic disassembly of the Golgi apparatus in vivo. *J Cell Sci.* 1995;108(7):2715-2727.

Mitomo S, Omatsu T, Tsuchiaka S, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase by Akabane virus is required for apoptosis. *Res Vet Sci.* 2016;107:147-151.

Miyazato S, Miura Y, Hase M, et al. Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus. *Nihon Juigaku Zasshi.* 1989;51(1):128-136.

Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007;21(22):2861-2873.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010;140(3):313-326.

Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, et al. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2007;1167(1):112-117.

Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, et al. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(11):5472-5477.

Moy RH, Gold B, Molleston JM, et al. Antiviral autophagy restricts rift valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity.* 2014;40(1):51-65.

Mukherjee P, Woods TA, Moore RA, et al. Activation of the innate signaling molecule mavs by bunyavirus infection upregulates the adaptor protein sarm1, leading to neuronal death. *Immunity*. 2013;38(4):705-716.

Nakagomi S, Barsoum MJ, Bossy-Wetzel E, et al. A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2008;29(2):221-231.

Nakajima Y, Takahashi E, Konno S. Encephalitogenic effect of Akabane virus on mice, hamsters and guinea pigs. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*. 1980;20(2):81-82.

Nakajima Y, Takahashi E, Konno S. Encephalomyelitis in mice experimentally infected with Akabane virus. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*. 1979;19(1-2):47-52.

Nakatani H, Manabe S, Ohtani A, et al. Histopathological and immunohistochemical findings in the nerve tissues of an 8-month-old calf with postnatal Akabane disease. *J Jpn Vet Med Assoc*. 2010;63(10):781-784.

Narita M, Inui S, Hashiguchi Y. The pathogenesis of congenital encephalopathies in sheep experimentally induced by Akabane virus. *J Comp Pathol*. 1979;89(2):229-240.

Nassif M, Hetz C. Autophagy impairment: a crossroad between neurodegeneration and tauopathies. *BMC Biol*. 2012;10(1):78.

Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2013;19(8):983-997.

Oem J, Yoon H, Kim H, et al. Genetic and pathogenic characterization of Akabane viruses isolated from cattle with encephalomyelitis in Korea. *Vet Microbiol*. 2012;158(3-4):259-266.

Ogawa Y, Fukutomi T, Sugiura K, et al. Comparison of Akabane virus isolated from sentinel cattle in Japan. *Vet Microbiol*. 2007;124(1-2):16-24.

Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, et al. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol*. 2010;9(11):1097-1105.

Parsonson IM, Della-Porta AJ, Snowdon WA. Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect Immun*. 1977;15(1):254-262.

Paxinos G, 1944-, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates / Keith B.J. Franklin, George Paxinos*. Academic Press: New York; 2008.

Poskanzer DC, Schwab RS. Cohort analysis of Parkinson's syndrome: evidence for a single etiology related to subclinical infection about 1920. *J Chronic Dis*. 1963;16:961-973.

Ravenholt RT, Foege W. 1918 influenza, encephalitis lethargica, parkinsonism. *Lancet*. 1982;320(8303):860-864.

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 1996;13(1):43-47.

Rodrigues R, Paranhos-Baccalã G, Vernet G, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-infected hepatocytes induce ER-stress and apoptosis crosstalk. *PLoS One.* 2012;7(1):1-11.

Salanueva IJ, Novoa RR, Cabezas P, et al. Polymorphism and structural maturation of Bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J Virol.* 2003;77(2):1368-1381.

Sasaki K, Yoshida H. Organelle autoregulation - stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. *J Biochem.* 2015;157(4):185-195.

Sasaki S, Warita H, Murakami T, et al. Ultrastructural study mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol.* 2004;107(5):461-474.

Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, et al. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(3):980-984.

Seong IL, Kweon CH, Dong KY, et al. Apoptosis in Vero cells infected with Akabane, Aino and Chuzan virus. *J Vet Sci.* 2005;6(3):251-254.

Shimshony S. An epizootic of Akabane disease in bovines, ovines and caprines in Israel, 1969-70: epidemiological assessment. *Acta Morphol Acad Sci Hung.* 1980;28(1-2):197-199.

Silke J, Rickard JA, Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat Immunol.* 2015;16(7):689-697.

Silvas JA, Popov VL, Paulucci-Holthauzen A, et al. Extracellular vesicles mediate receptor-independent transmission of novel tick-borne bunyavirus. *J Virol.* 2015.

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000;5(5):415-418.

Soo KY, Halloran M, Sundaramoorthy V, et al. Rab1-dependent ER–Golgi transport dysfunction is a common pathogenic mechanism in SOD1, TDP-43 and. *Acta Neuropathol.* 2015;130(5):679-697.

Stieber A, Gonatas JO, Moore JS, et al. Disruption of the structure of the Golgi apparatus and the function of the secretory pathway by mutants G93A and G85R of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2004;219(1-2):45-53.

Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK. Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus. *J Neurol Sci.* 2000;173(1):53-62.

Sütterlin C, Hsu P, Mallabiabarrena A, et al. Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell*. 2002;109(3):359-369.

Swarup V, Julien JP. ALS pathogenesis: recent insights from genetics and mouse models. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(2):363-369.

Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1010:186-194.

Takahashi M, Yamada T, Nakajima S, et al. The substantia nigra is a major target for neurovirulent influenza A virus. *J Exp Med*. 1995;181(6):2161-2169.

Tanaka S, Kawasaki K, Sato M, et al. Detection of Akabane viral antigens in lesions found in fetal calves resulting from experimental intrauterine infection. *Bull Natl Inst Anim Health*. 2009(116):11-20.

Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*. 2002;69(6):745-749.

Tobisawa S, Hozumi Y, Arawaka S, et al. Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(2):496-503.

Uchida K, Murakami T, Sueyoshi M, et al. Detection of Akabane viral antigens in spontaneous lymphohistiocytic encephalomyelitis in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2000;12(6):518-524.

Verma A, Berger JR. ALS syndrome in patients with HIV-1 infection. *J Neurol Sci.* 2006;240(1-2):59-64.

Vorbrodt AW, Lossinsky AS, Wisniewski HM. Localization of alkaline phosphatase activity in endothelia of developing and mature mouse blood-brain barrier. *Dev Neurosci.* 1986;8(1):1-13.

Walter CT, Barr JN. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol.* 2011;92(11):2467-2484.

Ward MC. Neurovirulence of influenza A virus. *J Neurovirol.* 1996;2(3):139-151.

Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci.* 1999;2(1):50-56.

Yamakawa M, Yanase T, Kato T, et al. Chronological and geographical variations in the small RNA segment of the teratogenic Akabane virus. *Virus Res.* 2006;121(1):84-92.

Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, et al. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J Biol Chem*. 2011;286(28):24666-24673.

Yanase T, Kato T, Kubo T, et al. Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985-2002. *J Med Entomol*. 2005;42(1):63-67.

Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem*. 2006;281(40):30299-30304.

Yoshida K, Tsuda T. Rapid detection of antigenic diversity of Akabane virus isolates by dot immunobinding assay using neutralizing monoclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5(2):192-198.

Yu L, Alva A, Su H, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*. 2004;304(5676):1500-1502.

Zhang X, Li L, Chen S, et al. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*. 2011;7(4):412-425.

Zhou L, Miranda-Saksena M, Saksena NK. Viruses and neurodegeneration. *Virology Journal*. 2013;10(1):1.