

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成 25 年度博士課程 入学
氏名 村田 洋介
指導教員 中山 裕之

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

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 ウイルスである。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。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。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。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。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。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、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数あるが、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、対象が大型家畜の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。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に侵入する。侵入後、エンドゾーム膜とウイルスエンベロプの膜融合により脱殻し、転写・翻訳が開始される。エンベロプ糖タンパク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。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。しかし、ブニヤウイルスによる細胞傷害については、アポトーシスの誘導や、ウイルスの標的細胞小器官の候補として、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体が挙げられているだけで、具体的な機構については不明である。

一方、ヒトの運動神経疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位および下位の運動ニューロンの選択的変性・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傷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。オートファジーは主要な細胞質内タンパク質分解系であり、細胞内の恒常性維持および細胞の生存に寄与しているが、近年、ALSをはじめとするヒトの神経変性疾患において、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いる。ALS の研究には、変異 SOD1 を強制発現させた SOD1^{G93A} トランスジェニック (Tg) 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。この Tg マウスでは、脊髄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、神経変性機序との関係が報告されている。そこで、本研究では AKAV の神経病原性の発生機序を解明することを目的に、Balb/c マウスおよび SOD1^{G93A} マウスを用いて感染実験を行い、AKAV 感染による中枢神経の病態を検討した。

第 1 章では、AKAV の OBE-1 株と Iriki 株を様々な週齢の Balb/c マウスの脳内または腹腔内に接種してそれぞれの病原性の比較検討を行った。次いで、Iriki 株を 8 週齢 Balb/c マウス大脳皮質内または線条体内に接種して、AKAV 抗原の分布について詳細な検索を行った。その結果、腹腔内接種した場合、Iriki 株は 1 週齢のマウス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 株は週齢に関係なく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。以上の結果から、Iriki 株は中枢神経への侵入

性、増殖性の両方で OBE-1 株より強毒であることが示された。また、大脳皮質内、線条体内接種マウスでは、AKAV 抗原は AKAV の接種量や接種部位にかかわらず、脳・延髄において、知覚の統制、眼球・体性運動を司る脳幹部の特定部位に多く局在し、脳梁、交連前核など、脳内の各部位を連絡する神経路にも軽度 AKAV 抗原が局在した。脊髄では、頸髄～腰髄の主に腹角に AKAV 抗原が分布していた。さらに、線条体内接種では、感染初期に、神経幹細胞、神経芽細胞、神経前駆細胞などの未分化神経細胞が存在する脳室下領域 (SVZ) に AKAV 抗原が認められた。以上より、AKAV をマウス脳内に接種すると、まず SVZ の未分化神経細胞に感染し、ここで増殖した後に神経線維を介して、広範に伝播分布すること、さらにその伝播経路は脳幹部の各種神経核から脊髄腹角に至ることが推察された。

第 2 章では、SOD1^{G93A} Tg マウスの細胞小器官の脆弱性に着目して、AKAV の神経細胞における細胞傷害の機序をより詳細に検討することを目的として、SOD1^{G93A} を用いて感染実験を行い、病理学的検索を行った。その結果、AKAV の感染により、Tg マウスで神経細胞のゴルジ体の断片化が有意に多くなり、ゴルジ体マーカーの発現量が有意に減少した。ミトコンドリアマーカーや小胞体マーカーの発現量については、AKAV 接種群で非接種群より少ない傾向であった。一方、AKAV 接種群でアポトーシス関連因子の陽性像は確認できず、またその発現レベルは AKAV 接種群と非接種群とで差は認められなかった。しかし、ネクロトーシス関連因子の発現レベルは AKAV 接種群で非接種群と比べ、有意ではないものの上昇していた。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。

近年、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。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。そこで第 3 章では、ALS などの神経変性疾患において神経向性ウイルス感染の病態への関与を評価する目的で、AKAV Iriki 株を SOD1^{G93A} 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 感染により脊髄腹角における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 の強陽性像が多く観察された。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、LC3-II/LC3-I 比は、Tg と WT マウスにおいて日齢に関わらず、AKAV 接種により統計学的に有意ではないが上昇した。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や、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。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することができないと考えられた。以上のことから、AKAV 感染は ALS の病態を増悪するが、その発症には直接関連しないことが示された。

今回の一連の研究により、AKAV の Iriki 株は中枢神経への侵入性、増殖性とも OBE-1 株より強く、その感染部位は週齢が進むにつれ脳幹に局在することが分かった。さらに AKAV を脳内接種すると、接種量や接種部位にかかわらず、AKAV 抗原が脳幹部の特定領域に局在し、脊髄では頸髄～腰髄の主に腹角に局在した。これらの結果は牛の野外感染例と一致し、マウスの感染実験系はアカバネウイルス生後感染モデルとして有用であることが示された。これまで、培養細胞による実験からブニヤウイルス感染における細胞死は、アポトーシスによるものと考えられていた。しかし、本研究の結果から AKAV 感染によるマウス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く、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。さらに、Tg マウスでは、AKAV の感染がオートファジーの亢進や、細胞小器官の傷害を介して、異常タンパク質の蓄積・凝集を促進し、病態が進行すると推測されたことから、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が示された。

今回の研究で、AKAV の神経病原性の発生機序を完全に解明することはできなかったが、AKAV 感染症の病態の検索に、マウス感染モデルが有効であることは明らかになった。また、ALS モデルマウスを用いた AKAV 感染実験の結果から、ALS の病態進行に神経向性ウイルス感染が関与する可能性が推察された。この成果は、AKAV の病理発生だけでなく、ブニヤウイルス全体の感染機構、および神経変性疾患とウイルス感染症との関係についての理解を大いに深めると考えられた。