

## 審査の結果の要旨

氏名 村田 洋介

### 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。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て、アカバネ病の病理発生には依然不明な点が多い。また、AKAV を始めとするオルソ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。また、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 Superoxide dismutase 1 (SOD1) を強制発現させた SOD1<sup>G93A</sup> 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、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、SOD1<sup>G93A</sup> 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、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、Iriki 株脳内接種マウスでは、AKAV 抗原は接種量や接種部位にかかわらず、脳幹部の特定部位に多く局在し、脊髄では頸髄～腰髄の主に腹角に分布していた。さらに、線条体内接種では、感染初期に、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<sup>G93A</sup> 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<sup>G93A</sup> 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 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章においては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<sup>G93A</sup> 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、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質の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。

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 株より強毒であることが示された。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。また、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。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。