

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成22年度博士課程 入学

氏名 権賢貞

指導教員名 甲斐 知恵子

論文題目 Analyses of the measles virus inclusion body in muscle and nervous system
(筋肉・神経系における麻疹ウイルス封入体蓄積の影響の解析)

麻疹ウイルス(MV)はパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属する RNA ウイルスで、急性感染時は発熱、発疹、カタル症状、免疫抑制などを引き起こす。急性感染で発症した患者の一部は脳内持続感染により亜急性硬化性全脳炎(SSPE)を引き起こす。SSPE の患者から分離された麻疹ウイルスは変異により感染細胞からのウイルス粒子の放出がほとんど起きない。麻疹ウイルスの封入体は急性感染患者の組織と SSPE 患者の脳組織の両方から観察される。この封入体は麻疹ウイルスを構成するウイルスゲノムおよびタンパクが蓄積されたもので、その中で最もよく検出されるのは麻疹ウイルス N タンパク(MV-N)である。また、無症状のヒトからも MV-N の mRNA が検出された例が報告されているが、この mRNA が実際病原性を持っているかは不明である。本研究では麻疹ウイルス封入体の病理学的意義を調べるために、封入体の主な構成物である MV-N タンパクを発現するトランスジェニックマウスおよび細胞の解析を行った。本論文は以下 3 章より構成される。

第 1 章: MV-N 発現トランスジェニックマウスの作製

麻疹ウイルス封入体の機能を調べるために、遺伝子の全身性発現を誘導する CAG プロモーターの制御下で MV-N を発現するトランスジェニックマウス(MV-N Tg マウス)を作製した。作製の結果、

計 4 匹のファウンダーマウスが生まれ、各マウスの尻尾組織で MV-N mRNA が発現することを確認した。4匹のファウンダーマウスは約8週齢まで正常に成長したが、その後、2 匹のファウンダーマウスから緩慢な体重減少、行動量の減少などの症状が観察された。症状が現れた 2 匹のマウスは約4ヶ月齢で死亡した。H-E 染色で死亡マウスの組織を野生型マウスと比べた結果、心筋の変性、平滑筋・骨格筋の萎縮および脾臓の萎縮が観察された。この変化は無症状の MV-N Tg マウスでは観察されなかった。次に免疫組織化学染色法で MV-N の発現を調べた結果、症状のあった 2 匹のマウスでは MV-N の発現が心筋、骨格筋、及び平滑筋に限局されていた。無症状の MV-N Tg マウスでは筋肉系での MV-N 発現が認められなかった。これらの結果から、MV-N の発現が筋肉変性に関与し得ることが示唆された。今まで麻疹ウイルス感染において筋肉系はあまり注目されていなかったが、本実験の結果により無症状のヒトの筋肉組織に存在する MV-N が単独で筋肉変性に関与する可能性が示唆された。

第 2 章: MV-N の筋疾患への影響の解析

第 1 章で作製された MV-N Tg マウスにおいて、MV-N の発現の筋肉変性への影響を解析した。MV-N マウスの骨格筋および心筋は封入体ミオパチーなどの自己貪食空胞性ミオパチーと似た特徴を持っていた。自己貪食空胞性ミオパチーでは筋変性過程にオートファジーが関与することが強く疑われる。筆者はこの点に着目し、免疫組織化学染色法で MV-N Tg マウスの筋肉病変内の各種オートファジー関連分子の分布を調べた。その結果、MV-N Tg マウスの心筋および骨格筋の病変では ubiquitin、p62、LC3 などのオートファジー関連分子が蓄積することが分かった。

次に、MV-N による筋肉変性の機序を調べるためにマウス筋芽細胞株 C2C12 に MV-N を導入し、筋管細胞への分化を誘導した。その結果、MV-N が C2C12 細胞の筋管細胞への分化を阻害することが分かった。この傾向は MV 感染細胞からも確認された。また、MV-N を持続発現する C2C12 細胞でオートファジー関連分子の発現量をウェスタンブロッティングで評価した結果、MV-N 高発現細胞では LC3、p62 の発現量が非常に低下していることが分かった。p62 はオートファジーの選択的分解基質である。RT-PCR で MV-N 高発現細胞で p62 の mRNA 発現が減少しなかったことから、p62 の減少は MV-N 高発現細胞でのオートファジー活性の増加により分解されたと推測された。LC3 もオートファジーの進行により分解されるので、MV-N 高発現細胞での LC3 の発現量減少も持続的なオートファジー活性増加の結果だと考えられた。また p62 に対する蛍光免疫染色を行った結果、C2C12 細胞に筋管細胞への分化を誘導した時、一部の MV-N 持続発現細胞で p62 の凝集が増加した。これらのことから MV-N がオートファジー活性を変化させることにより筋分化を抑制する可能性が示唆された。MV-N Tg マウスの筋肉病変においてもオートファジー関連分子の蓄積が認められた

ので、MV-N によるオートファジーの活性変化は筋肉変性にも関わる可能性が高いと考えられる。

第 3 章: MV-N の神経変性への影響の解析

第 1 章で作製した MV-N Tg マウスのうち、無症状だった 2 匹のファウンダーマウスを交配維持し 49 匹のマウスを 1 年以上飼育した結果、2 匹のマウスから旋回運動を主徴とする神経症状が観察された。免疫組織化学法により発症 MV-N Tg マウスの脳内 MV-N 発現を 9 匹の無症状 MV-N Tg マウスと比べた結果、無症状 MV-N Tg マウスに比べて発症 MV-N Tg マウスでの MV-N 発現が増加したことがわかった。また MAP2、GFAP、TDP-43 に対する免疫染色、Luxol fast blue 染色を行った結果、発症 MV-N Tg マウスの脳における神経細胞の変性、消失、樹状突起の消失、脱髄、および TDP-43 proteinopathy などの病変が観察された。

次に、マウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞の神経突起伸長モデルに MV-N を導入し、その影響を調べた。N2a 細胞にレチノイン酸を添加し、4 日後に蛍光免疫染色で突起伸長率を評価した結果、MV-N 発現 N2a 細胞の突起伸長率は約 10% で、MV-N 非発現細胞の 40% に比べて著しく低下した。N2a 細胞の神経突起伸長率減少は MV 感染細胞でも確認された。また、ウェスタンブロッティングで N2a 細胞の神経細胞マーカーおよびオートファジー関連分子の発現量変化を評価した結果、MV-N 発現細胞では対照群に比べ神経細胞マーカーの発現量およびオートファジー活性の増加が観察された。神経突起伸長率はオートファジーの抑制または促進時に低下することが知られているので、MV-N 発現細胞でのオートファジー活性増加は神経突起伸長率の低下に関わっていると考えられる。

以上の結果は MV-N の神経変性への関与を示唆している。特に、発症マウスで観察された TDP-43 proteinopathy は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) などの神経変性疾患で報告されたもので、MV 持続感染による神経変性とこれらの疾患の発達機序に共通性があることが推測された。また、MV-N によって阻害される神経突起伸長の阻害は、SSPE などで見られる神経突起損傷損傷の機序に MV-N が直接的に関与していることも示唆する。

本研究において、MV-N 発現トランスジェニックマウスの作製とその解析により、MV-N 蓄積が筋肉変性および神経変性に関与することを示す結果が得られた。さらに、*in vitro* で C2C12 細胞および N2a 細胞へ MV-N を導入することにより MV-N が神経系および筋肉系の分化を阻害すること、オートファジー活性を変化させることが分かった。本研究の成果により、発症患者の封入体および無症状のヒトから検出される MV-N の機能および病原性発現への関与機構に関して新たな知見を与えたと考える。