

令和2年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究		
研究課題名		神経向性フラビウウイルスの脳内侵入部位および機構の解明		
新規・継続の別		新規		
研究代表者	所属	北海道大学大学院獣医学研究院	40 歳 以下○	35 歳 以下○
	職名・氏名	准教授・小林進太郎	○	
研究分担者 (適宜行を追加し て下さい)	所属	北海道大学遺伝子病制御研究所		
	職名・氏名	助教・長谷部理絵		
	所属	北海道大学獣医学研究院		
	職名・氏名	学部 6 年・前園佳佑		○
受け入れ教員	職名・氏名	教授・村上正晃		
概要 (100～150 字程度)		神経向性フラビウウイルス感染マウスを用いて、透明化处理し、ウイルスの中枢神経組織の侵入部位を特定することを目的とする。今年度は、そのために感染細胞で蛍光タンパク質を発現するウイルスを作製し、生体において蛍光タンパク質の発現を確認できた。今後、本ウイルスを使用して、侵入部位の特定や同部位における炎症反応についての解析を実施する。		
研究目的 (300 字程度)		世界中で流行しているウエストナイルウイルス (WNV) などの神経向性フラビウウイルスは、末梢組織で増殖後、中枢神経組織に侵入し、重篤な脳脊髄炎を引き起こす。ウイルスなどの病原体や免疫細胞などの中枢神経組織への侵入は血液脳関門によって厳しく制限されており、神経向性フラビウウイルス感染による脳脊髄炎において、ウイルスによる血液脳関門の通過のメカニズムおよび侵入部位についてはほとんど明らかになっていない。本研究では WNV が脳内に侵入する分子機構を明らかにするために、透明化した WNV 感染モデルマウスの中枢神経組織を用いてウイルスの侵入部位を特定する。さらに特定した WNV の侵入部位の組織を用いて、炎症反応誘導の分子機構を解析する。		
研究内容・成果 (1000 字程度・Web 会議の回数 も記載)		当該年度は WNV を接種したマウスを用いて、脳組織の透明化处理や染色の条件などの検討を中心に実施した。 1. 脳組織の透明化处理による侵入部位の特定 WNV を脳内に接種したマウスの脳組織を、CUBIC 試薬などを用いて透明化処置し、蛍光標識抗体を用いて染色し、遺伝子病制御研究所のシート顕微鏡を用いてウイルス抗原の脳内分布を観察した。同様の処理を実施した脳組織を用いた凍結切片ではウイルス抗原のシグナルが検出できたが、シート顕微鏡を用いた観察ではシグナルを検出することはできなかった。		

	2. レポーター発現遺伝子組換え WNV の作製 透明化した中枢神経組織内でウイルスの感染部位を特定するために、感染細胞において蛍光タンパク質が発現するレポーター発現遺伝子組換え WNV の作製を試みた。WNV のウイルスゲノムの中に蛍光タンパク質である mCherry の遺伝子配列を組み込み、培養細胞にウイルスゲノムを形質導入した。形質導入した細胞の上清を接種した培養細胞において、mCherry およびウイルス抗原の発現が認められたことから、遺伝子導入細胞で mCherry を発現する遺伝子組換え WNV (mCherry-WNV) が作製されたと考えられた。mCherry-WNV のウイルスの性状を野生型と比較すると、培養細胞における増殖性は低かったが、5 回継代しても mCherry の発現は安定的に確認された。 続いて mCherry-WNV をマウスの脳内に接種し、マウスにおける mCherry の発現および脳炎病態の形成能について解析した。mCherry-WNV を接種したマウスは、野生型 WNV を接種したマウスと同様の神経症状を示し死亡した。神経症状を示したマウスの脳組織では、mCherry 陽性でウイルス抗原陽性の細胞が大腦皮質や海馬を中心に認められ、これらの細胞の周囲には CD3 陽性細胞の浸潤やアポトーシスが観察された。以上の結果から、mCherry-WNV は、生体の感染細胞で蛍光タンパク質を発現し、野生型と同様の脳炎病態形成能を有することが明らかになった。今後は、mCherry-WNV の末梢組織接種による脳炎病態形成能を評価し、透明化処理による中枢神経組織への侵入部位の特定を実施する予定である。 Web 会議の回数：なし
成果	【学会報告】 なし 【論文発表】 なし 【新聞報道】 なし