

令和 4 年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究		
研究課題名		神経向性フラビウイルス感染モデルマウスを用いた脳内侵入機構の解明		
新規・継続の別		新規・継続		
研究代表者	所属	北海道大学・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・獣医学研究院	/	/
	職名・氏名	学部生・福田 幸音		○
	所属		/	/
	職名・氏名			
受け入れ教員	職名・氏名	教授・村上正晃		
概要 (100～150 字程度)		世界中で流行し、人獣共通感染症の原因となるフラビウイルスは脳炎や出血熱など重篤な症状を引き起こすため公衆衛生上、克服すべき重要な課題である。本課題では、神経向性フラビウイルスの脳への侵入メカニズムの解明を通じて疾患病態の解明を目指す。		
研究目的 (300 字程度)		ウエストナイルウイルス（WNV）などの神経向性フラビウイルスは、ヒトや動物に感染するとリンパ節や脾臓などの末梢組織で増殖後、中枢神経組織に侵入し、神経細胞の傷害および脳炎を引き起こすことが知られている。中枢神経組織には血液脳関門が存在しており、ウイルスなどの病原体や免疫細胞などを含む様々な物質の組織内への輸送が制限されている。一方で神経向性フラビウイルスは、血液脳関門による制限をすり抜けて脳内に侵入するが、そのメカニズムについてはほとんど明らかではない。 本研究では、神経向性フラビウイルス感染モデルマウスを用いてウイルスの侵入部位を特定し、さらに同部位における局所的な組織炎症および細胞応答を明らかにすることで、神経向性フラビウイルスの中枢神経組織の侵入メカニズムの解明を目指す。		
研究内容・成果 (1000 字程度・Web 会議の回数も記載)		村上教授の研究室では、免疫細胞及び神経細胞により惹起される神経組織周辺の血管における微小炎症が、免疫細胞の神経組織への進入路(ゲート)の形成を促し、それが免疫細胞の血液脳関門を超えた浸潤の原因となることを解明した。本課題では、フラビウイルスの中枢神経組織への進入においても、脳近傍の血管組織の微小炎症とゲート形成がウイルスの侵入の鍵になるのではないかと考えた。 感染細胞において蛍光タンパク質を発現する組換え WNV または野生型 WNV を腹腔内接種した C57BL/6 の脳組織を継時的に回収		

	し、組織透明化処置を実施した。透明化した組織を申請者が保有するウイルスに対する抗体を用いた染色により可視化し、シート顕微鏡を用いて、感染初期にウイルス抗原が検出される部位について解析した。ウイルス接種 5 日後まではウイルス抗原陽性像は認められなかったが、6 日後の視床および視床下部、延髄においてウイルス抗原陽性像が認められ、これらの結果からウイルスは接種後 6 日頃にこれらの部位から侵入することが示唆された。 続いて WNV 接種後 5 または 6 日後のマウスの視床および視床下部と延髄を含む脳幹部の組織切片を用いて、血管、アストロサイト、ミクログリアについて解析した。CD31 陽性の血管や GFAP 陽性のアストロサイトについてウイルス接種による構造の変化は認められなかったが、Iba1 陽性のミクログリアはウイルス接種による細胞質の肥大化を伴う活性化が認められた。これらの活性化したミクログリアはウイルス抗原が検出されないウイルス接種後 5 日目の視床や視床下部、延髄において認められた。これらの結果は、フラビウイルスの脳内侵入におけるミクログリアの活性化を伴う微小な炎症の存在を示唆している。今後は申請者がこれまでに明らかにしてきた脳炎病態の形成に関わるアミノ酸に変異を導入したフラビウイルスを用いて、微小炎症の誘導に関わるウイルス因子や宿主因子について解析することで、ウイルス感染によってゲートが形成される仕組みを明らかにする。 また研究代表者らは今年度内に、ダニ媒介脳炎ウイルス(TBEV)によるマウス脳炎の疾患病態を詳細に解析した。TBEV に感染した脳神経細胞は極度に肥大化し、ネクロシスによる細胞死が亢進することが判明した。またこれらの脳内ではアストロサイトやミクログリアの活性化が亢進しており、神経炎症症状が誘導されていることを明らかにした。また TBEV 感染した細胞におけるウイルスの複製にオートファジーが関与していることを解明した。 村上教授との共同研究に関する面談 直接面談：0 回、Web 会議：0 回 遺伝子組換え実験：有（2021-002）・動物実験：有（19-0742）
成果	【学会報告】 参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと辻野代、好井健太郎、梶山実紗、高橋有嗣、苅和宏明、小林進太郎、ダニ媒介性脳炎ウイルス感染によるネクロトーシスと脳炎病態形成との関連、第 56 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、レクトーレ湯河原、2022 年 6 月 11 日

前園佳祐、好井健太郎、田畑耕史郎、荏和宏明、小林進太郎、ウイルス様粒子を用いた特異性の高いウエストナイルウイルス感染の血清診断系の開発、第 56 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、レクトーレ湯河原、2022 年 6 月 11 日

高橋優奈、神谷亘、好井健太郎、前園佳祐、荏和宏明、小林進太郎、ウエストナイルウイルスのカプシドタンパク質と相互作用する宿主因子の脳炎病態形成における機能の解析、第 165 回日本獣医学会学術集会、麻布大学、2022 年 9 月 6 日

高橋侑嗣、小林進太郎、中尾亮、荏和宏明、好井健太郎、2018 年に北海道道央地域で犬に付着していた吸血マダニから分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスの性状解析、第 165 回日本獣医学会学術集会、麻布大学、2022 年 9 月 6 日

小林進太郎、前園佳祐、タマハキンパサワット、好井健太郎、荏和宏明、ウエストナイルウイルスの感染で認められる TDP-43 の細胞質内蓄積による脳炎病態形成への影響の解析、第 28 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、長崎タクシー会館、2022 年 11 月 12 日

前園佳祐、タマハキンパサワット、好井健太郎、荏和宏明、小林進太郎、ウエストナイルウイルス感染による宿主タンパク質の核内輸送阻害機構の解析、第 28 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、長崎タクシー会館、2022 年 11 月 12 日

小林進太郎、好井健太郎、荏和宏明、ウエストナイルウイルスの感染で認められる TDP-43 の細胞質内凝集機構および脳炎病態形成への影響の解析、第 69 回日本ウイルス学会学術集会、出島メッセ長崎、2022 年 11 月 13 日

前園佳祐、好井健太郎、田畑耕史郎、荏和宏明、小林進太郎、ウイルス様粒子を用いた特異性の高いウエストナイルウイルス感染の新規血清診断系の開発、第 69 回日本ウイルス学会学術集会、出島メッセ長崎、2022 年 11 月 13 日

PASSAWAT THAMMAHAKIN, Hiroaki Kariwa, Shintaro Kobayashi, Histopathological analysis of microglia in West Nile virus infected mouse, 第 69 回日本ウイルス学会学術集会、出島メッセ長崎、2022 年 11 月 13 日

高橋優奈、神谷亘、好井健太郎、前園佳祐、荏和宏明、小林進太郎、ウエストナイルウイルスのカプシドタンパク質と相互作用する宿主因子の脳炎病態形成における機能解析、第 69 回日本ウイルス学会学術集会、出島メッセ長崎、2022 年 11 月 13 日

福田幸音、高橋侑嗣、佐々木道仁、長谷部理絵、村上正晃、荏和宏明、小林進太郎、透明化した脳組織を用いたウエストナイルウイルスの中枢神経組織侵入機構の解析、第 69 回日本ウイルス学会学術集会、出島メッセ長崎、2022 年 11 月 13 日

小林進太郎、前園佳祐、高橋侑嗣、THAMMAHAKIN Passawat、好井健太郎、荏和宏明、ウエストナイルウイルスの感染で認められる TDP-43 の細胞質内蓄積による脳炎病態形成への影響の解析、第 45 回日本分子生物学会年会、幕張メッセ、2022 年 11 月 30 日

前園佳祐、好井健太郎、高橋侑嗣、Thammahakin Passawat、荏和宏明、小林進太郎、ウエストナイルウイルス感染による宿主タンパク質の核内輸送阻害機構の解析、第 45 回日本分子生物学会年会、幕張メッセ、2022 年 12 月 1 日

Passawat Thammahakin, Yuji Takahashi, Keisuke Maezono, Hiroaki Kariwa, Shintaro Kobayashi, Analysis of microglia heterogeneity and its association with virus-infected neurons in West Nile virus infected mouse, 第 45 回日本分子生物学会年会、幕張メッセ、2022 年 12 月 1 日

【論文発表】

著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のこと

Shoko Nishiyama, Minato Hirano, Memi Muto, Mao Kambara, Naoto Ito, Shintaro Kobayashi, Hiroaki Kariwa, Kentaro Yoshii
Y-shaped RNA secondary structure of a noncoding region in the genomic RNA of tick-borne encephalitis virus affects pathogenicity. Microbiology and immunology 66 5 234 – 237
IF:2.962

Kohei Kawano, Kenichiro Sakaguchi, Chelenga Madalitso, Nattapong Ninpetch, Shintaro Kobayashi, Eri Furukawa, Yojiro Yanagawa, Seiji Katagiri Effect of heat exposure on the growth and developmental competence of bovine oocytes derived from

	early antral follicles. Scientific reports 12 1 8857 - 8857 IF:4.997 Kazuma Tamiya, Shintaro Kobayashi, Kentaro Yoshii, Hiroaki Kariwa Analysis of the relationship between replication of the Hokkaido genotype of Puumala orthohantavirus and autophagy. Virus research 318 198830 – 198830 IF: 6.286 Zuzana Beránková, Jan Kopecký, Shintaro Kobayashi, Jaroslava Lieskovská Dual control of tick-borne encephalitis virus replication by autophagy in mouse macrophages. Virus research 315 198778 – 198778 IF: 6.286 Dai Tsujino, Kentaro Yoshii, Misa Kajiyama, Yuji Takahashi, Naoya Maekawa, Hiroaki Kariwa, Shintaro Kobayashi Necroptosis of neuronal cells is related to the neuropathology of tick-borne encephalitis. Virus research 321 198914 - 198914 IF:6.286 【新聞報道】
--	--