

氏名(本籍)	きた うら かず たか 北 浦 一 孝 (東京都)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 5840 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	ウエストナイルウイルス感染マウス脳内浸潤 T 細胞における TCR レパト ア解析によるウイルス特異性に関する研究
主 査	筑波大学教授 薬学博士 永 田 恭 介
副 査	筑波大学教授 理学博士 岡 村 直 道
副 査	筑波大学教授 Doctor of Public Health 我 妻 ゆき子
副 査	筑波大学教授 (連携大学院) 医学博士 狩 野 繁 之 (独立行政法人 国立国際医療研究センター 研究所)

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

ウエストナイルウイルス (WNV) はフラビウイルス属のウイルスで、蚊と鳥の間で感染環が成立する。蚊の吸血によりヒトへ感染し、軽い発熱から急性熱性疾患、致死的な脳炎などの疾病を起こす。WNV は本来アフリカ地域の風土病であったが、1999 年にアメリカのニューヨークで大流行を起こし、多数の死者を発生させた。WNV が日本へ侵入した場合、同様の流行が発生する可能性があり、新興感染症としてその制御方策がもためられている。しかし、ヒトにおけるワクチンや特異的治療法は存在せず、脳炎発症のメカニズムも不明なままである。CD8⁺T 細胞がウエストナイル脳炎の防御において重要な役割を果たすと考えられているが、WNV と近縁のタイラーウイルスの感染マウスの脊髄に出現する CD8⁺T 細胞が脱髄と関連するという報告があり、必ずしも防御的に作用するとは限らない可能性が指摘されている。

最近、WNV と同じ日本脳炎血清群に含まれる日本脳炎ウイルス (JEV) 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞の研究により、特定の T 細胞レセプター (TCR) V 遺伝子をもつ抗原特異的 T 細胞の存在が見いだされた。WNV と JEV 間のアミノ酸配列の相同性は高く、JEV 不活化ワクチンの接種により、WNV 感染マウスの致死率を減少させるという報告もある。このことは、T 細胞レベルにおいても同ウイルス間で共通エピトープを認識する可能性があることを示唆している。

本研究の目的は、TCR レパトア解析を中心に、WNV 感染マウスモデルを用いて脳内浸潤 T 細胞の特異性を明らかにし、JEV およびダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 感染マウスモデルのそれと比較し、共通エピトープに対する認識性について考察することである。

(対象と方法)

WNV は NY99-6922 株を使用し、7 週雌 C3H/HeNjcl (H-2^k) マウスに感染させ、脳と脾臓を採取している。脳の組織学的解析 (HE 染色)、免疫組織学的解析 (CD3、CD4、CD8) を行っている。脾臓と脳から全 RNA を抽出し、リアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて、ウイルス RNA 量を定量す

るとともに、サイトカインバランスについても解析を行っている。WNV 感染による T 細胞の抗原特異性を評価するため、TCR レパトア解析、相補性決定領域 3 (CDR3) size spectratyping、CDR3 アミノ酸配列解析を実施している。JEV および TBEV で同様の解析により得られた結果をもとに、ウイルス間における脳内浸潤 T 細胞の特異性を比較している。WNV および JEV 感染マウス脳内浸潤 T 細胞を分離し、*in vitro* におけるそれぞれのウイルスに対する交差性を評価するために、感染腹腔細胞との共培養による IFN- γ 産生能を解析している。さらに共培養後の T 細胞について、クローナリティーの変化を調べている。

(結果)

本論文は、組織学および免疫組織学的解析により、WNV 感染マウスの脳では組織破壊と CD3⁺CD8⁺ 細胞の浸潤が認められたと述べている。リアルタイム定量 RT-PCR 解析により、WNV 感染マウスの脳では、WNV RNA 量が増加し、Th1/Tc1 タイプのサイトカインが亢進していることを明らかにしている。さらに CD3、CD8、CD25 (IL-2R)、CD69、Perforin、Granzyme A、および Granzyme B の発現レベルが経時的に増加することを観察している。

TCR レパトア解析により、WNV 感染マウスの脳で、TCRAV1-1、TCRAV 2-1、TCRBV5-2、TCRBV 8-2 の有意な増加を観察している。CDR3 size spectratyping 解析により、TCRAV1-1、TCRAV 2-1、TCRBV5-2 ではクローナリティーが非常に高く、TCRBV8-2 はオリゴクローナルであったことを明らかにしている。CDR3 アミノ酸配列解析によっては、TCRAV1-1 で複数の同一クローンが個体間で認められ、それらの相似性は高いが、CDR3 領域内の N 領域において 1 アミノ酸の相違を持つことを明らかにしている。TCRAV2-1 においても類似の傾向が認められたと述べている。TCRBV5-2 および TCRBV 8-2 では同一クローンを認めていない。WNV、JEV、TBEV 間の脳内浸潤 T 細胞を比較し、共通の TCR クローンを持つ T 細胞は存在しないことを見いだしている。

WNV 脳内浸潤 T 細胞と WNV 感染腹腔細胞の共培養系で IFN- γ 産生誘導を確認したとしているが、JEV 感染腹腔細胞との共培養では有意な産生は認めていない。WNV 感染腹腔細胞との共培養により、WNV 脳内浸潤 T 細胞のクローナリティーは亢進し、限られた TCR クローンで占められるようになると述べている。

(考察)

WNV 感染マウスモデルにおいては、CD3、CD8 mRNA 発現量の増加とも相関して、脳組織の破壊、CD3⁺CD8⁺ 細胞の浸潤などが認められていることから、WNV 感染による脳内では Th1/Tc1 タイプで、IL-2 により活性化された細胞傷害性 T リンパ球がウイルス感染細胞の排除のため作用していると考察している。TCR レパトア解析は、WNV 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞は、特定の TCR ファミリーを高度に使用し、抗原特異的であることを示していると結論している。また個体間で共通して得られた TCR クローンが、複数の V α 鎖、V β 鎖から構成されていることから、WNV エピトープが複数であると推測している。クローンレベルの解析は、脳内浸潤 T 細胞では TCR α 鎖が限定的であるのに対して、TCR β 鎖が多様であることを示しており、WNV 抗原の認識において TCR α 鎖が重要であると結論している。WNV、JEV、TBEV それぞれが感染した個体の脳内に浸潤する T 細胞は、異なる抗原エピトープを認識していることから、ウイルス特異的に反応していると考察している。*in vitro* における T 細胞による IFN- γ 誘導能を指標にした交差性の検討により、WNV と JEV の間で交差性は全く認められないことから、WNV 初回感染時では、MHC によって提示されるウイルス関連ペプチドにより選択されて脳内に浸潤する T 細胞は、他の近縁なウイルスとは交差性を示さないことが証明されたと述べている。これにより、ワクチンを設計するうえで、JEV および WNV の共通エピトープを用いた場合、初回感染における免疫賦活効果が弱い可能性を述べている。WNV 感染マウス脳内浸潤 T 細胞の WNV 感染腹腔細胞との共培養によるクローナリティーの亢進は、その T 細胞が WNV 特異的であり、再刺激によって特異性が増強されたことを示唆していると考えことから、初回感染時の WNV 感染マウス脳内に浸潤する T 細胞は、他の血清学的に類似するフラビウイルスと交差することなく、

ウイルス特異的であると結論している。

最後に、本研究によって得られた知見をもとに、免疫賦活効果の高いワクチンの開発には、ウイルス間共通配列部位ではなく、異なる部位で検討することを提案している。しかし、脳内浸潤 T 細胞が脳組織において防御と破壊のどちらにシフトするかの検討が重要であることを指摘し、今後これら T 細胞の移入実験、さらに既存のワクチンによって誘導される T 細胞との比較検討が重要であることを述べている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、WNV 感染マウス脳内に CD3⁺CD8⁺T 細胞の浸潤を認め、誘導される T 細胞の TCR レパトアは WNV に対して極めて特異性が高く、また *in vitro* の解析においてもこの T 細胞は WNV に特異性を持つことを示し、加えて WNV、JEV、TBEV 感染により誘導される脳内浸潤抗原特異的 T 細胞は、非常に限定された TCR α 鎖と比較的多様な TCR β 鎖によって構成されることが明らかにし、今後の WNV に対するワクチン開発研究に基盤を与える点で、価値ある研究と考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。