

氏名（本籍）	白井 顕治（千葉県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7134 号		
学位授与年月	平成26年 8月31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	日本脳炎ウイルス感染における致命的病態を誘導する脳内浸潤 T細胞のマウスモデルにおける解析		
主査	筑波大学教授（連携大学院）	医学博士	狩野 繁之
副査	筑波大学准教授	医学博士	竹内 薫
副査	筑波大学助教	博士（医学）	田原 聡子
副査	筑波大学教授	博士（医学）	大久保一郎

論文の内容の要旨

（目的）

日本脳炎は、日本脳炎ウイルス（Japanese Encephalitis Virus: JEV）が蚊によって媒介されてヒトに感染して起こるが、ほとんどの例は不顕性感染に終わる。発症するのは JEV 感染者 1、000 人に 1～2 人程度と報告されているが、一端発症すると致死率が 20%に達する重篤なウイルス性疾患である。救命できた生存者の約半数は神経症状を主とした後遺症を残し、なかには神経麻痺などの重篤な後遺症を残す場合もある。この重症化のメカニズムに関しては不明な点が多く、病原体側と宿主側要因で議論が多い。例えば、マウスの日本脳炎モデルでは、感染成立最小ウイルス量の閾値がある一方、その閾値を超えると、ウイルス接種量と相関せずに致死率は 30%程度で一定である。また、脳内浸潤 T細胞が脳炎時の JEV 除去に有効であるという報告と、T細胞の細胞障害活性が脳炎を助長しているという報告もある。そこで本論文では、マウス感染モデルでの JEV 感染後の死亡群・生存群間の T細胞クローンの違いを明らかにすることで、宿主側の重症化要因としての脳内の免疫機序の一端を明らかにすることを目的とした。

（対象と方法）

- 1) モデルマウスとしては C57BL/6j（雌、7週齢）を用いた。
- 2) JEV 接種は、 10^4 pfu を皮下接種した。
- 3) 感染後のマウス個体体重を指標として、死亡群・生存群の比較統計解析を行った。
- 4) 上記によりマウス感染実験エンドポイントを決定し、sacrifice 時に全血、脾臓、脳を採取した。
- 5) 脳内ウイルス量の測定はプラーク法を用いた。
- 6) Total RNA 抽出後、定量リアルタイム PCR（qRT-PCR）で発現量を解析した免疫学的指標は：

Th1 型サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ)、Th2 型サイトカイン (IL-4、IL-5)、サイトカイン上位転写制御因子 (T-bet、GATA3)、CD マーカー (CD3、CD4、CD8、CD25、CD69)、細胞障害因子マーカー (Perforin、Granzym (Gzm) A、Gzm B、FasL)、制御性 T 細胞関連遺伝子 (TGF- β 1、Foxp3)

7) TCR のレパトア解析は、Adaptor-ligation PCR、Microplate hybridization assay で行い、T 細胞の特異的抗原認識を評価した。

8) TCR 抗原認識部位のアミノ酸配列の特異性評価は、CDR3 シークエンス解析を行った。

(結果)

1) JEV 接種後 13 日の時点で、接種時と比較して体重が 25%以上減少した個体は、感染後 21 日目までに全頭死亡した (死亡群)。一方、感染後 13 日目に体重減少が 25%未満だった個体に死亡した個体は存在しなかった (生存群)。よって、JEV 感染後 13 日目をエンドポイントとして、感染が進行した後の死亡群と生存群を分けることが出来、上記の免疫学的解析はすべて 13 日目採取の検体 を用いた。

2) 脳内ウイルス量は、プラーク法及び RNA 発現量共に、死亡群- 生存群間で差がなかった。

3) qRT-PCR による CD 抗原の定量性に、死亡群- 生存群間で差がなかった。

4) Th1/Th2 サイトカインバランスは、死亡群では Th1 側に偏っていた。サイトカイン上位転写制御因子 (T-bet、GATA3) も、この結果を支持した。

5) 細胞障害因子マーカーでは、Perforin、Gzm A、Gzm B が死亡群で発現量が優位に増加していた。FasL の発現には差がなかった。

6) TCR レパトア解析では、JEV 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞は、VA8-1、VA10-1、VB2-1 を高発現していたが、死亡群- 生存群間で相対頻度に差がなかった。

7) CDR3 アミノ酸配列解析では TCR AV・BV とともに、生存群と死亡群の間で優勢に発現している CDR3 クローン型が明確に異なった。

(考察)

JEV 感染マウスにおいて、感染後の体重変化を指標にした死亡- 生存群分けは、単純かつ有用な手法であると判断出来た。

解析に使用したマウスにおいては、死亡- 生存群間で脳内ウイルス価に差が見られなかったことから、感染後の予後決定要因としては、宿主側の要因が大きく関与していることが示唆された。

サイトカインや細胞障害活性でも、死亡- 生存群では異なる脳内免疫応答が起こっていることが示唆された。また、Treg 活性が生存群で優位に増加していたことと、死亡- 生存群では異なるクローンの T 細胞が浸潤していたことから、これらの違いが異なる脳内免疫環境を誘発し、JEV 感染マウスの予後 (死亡、生存) を決定するものと考えた。

今後の研究として、脳局所ではなく (感染初期の) 末梢血の免疫応答解析、特に上述した脳内への Treg の誘導の機序を明らかにしてゆく必要があると考えられる。脾臓という大きなリンパ組織プールの中に特異的 T 細胞が存在していることにより、末梢血では様々な指標が検出限界以下である可能性は残されるが、JEV による脳炎の予後決定因子を感染初期から検出する手法の開発が求められる。より感度を高めた TCR 解析手法として、次世代シーケンサーを用いた TCR スクリーニング法の確立が、その実現を可能とするものとする。

審査の結果の要旨

(批評)

1960年代、日本脳炎はわが国で年間1,000例を超す発生が報告されていたが、有効なワクチンが開発され、そしてその普及によって、近年は毎年数名の発生にとどまっている。しかしながら、いまだにJEV感染蚊がわが国に存在する可能性（JEV抗体陽性豚の広い分布）、さらにはワクチン副作用による接種率の激減で、今後日本脳炎の国内再流行が起こることが危惧されている。さらには開発途上国では、有効なワクチンがそれを必要としている貧困・辺境の住民に届かない保健医療上の問題がある。

このような現状にあって、本学位論文は、日本脳炎の重症化のメカニズムに関して重要な示唆を与える新たな知見を提供し、いまだ治療法が確立していない日本脳炎の臨床管理上きわめて有用な免疫学上の成果を示している。この成果をもって、今後さらなる宿主側の重症化要因の解明、その病態の克服を目指した研究手法の開発が喫緊の課題である。

本学位論文は、医学の発展に寄与するオリジナルな研究成果であり、論文の形式もふさわしい形で纏められ、成果の信頼性、考察の妥当性も評価された。

平成26年6月30日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。