

**研究助成 2021 – 感染症領域 –**  
**研究成果報告書（最終） <概要>**

<b>所 属</b>	北海道大学大学院獣医学研究院 獣医学部門 衛生学分野 公衆衛生学教室
<b>氏 名</b>	小林 進太郎
<b>研究テーマ</b>	神経向性フラビウイルス感染によるタンパク質の核内輸送の抑制が脳炎病態の形成に与える影響の解析

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。  
 （図表、写真などの貼付を含む）

**【研究目的】**

ヒトに脳炎や出血熱など重篤な症状を惹起するフラビウイルス感染症の病態発症機構は不明な点が多く、有効な特異的治療法は存在しない。神経向性フラビウイルスは神経細胞の変性を起点にフラビウイルス性脳炎の病態を形成させることから、脳炎病態の発症機構を明らかにするために、細胞変性機構を理解することは重要である。

これまでに、神経向性フラビウイルスの感染による神経細胞死が、細胞質内のタンパク質凝集体の蓄積によって起こることを明らかにしている。タンパク質の凝集体の細胞質内蓄積は、タンパク質の核内輸送の阻害が関連することが報告されている。タンパク質の核内輸送はウイルスの増殖抑制に繋がるインターフェロン（IFN）を中心とした自然免疫の誘導と関連しており、神経向性フラビウイルスは、自然免疫を抑制することで自身の増殖に繋げている。

以上から、「**神経向性フラビウイルスは自身の増殖のために自然免疫関連因子を含む宿主タンパク質の核内輸送を妨げ、その結果、細胞傷害に関わるタンパク質の凝集体が細胞質内に蓄積し、細胞死及び脳炎病態が惹起されるのではないか？**」という仮説の設定に至った。本研究では、①**神経向性フラビウイルスによるタンパク質の核内輸送の阻害機構**、②**タンパク質の核内輸送の阻害がウイルスの増殖及び、細胞の生存に与える影響**、について解析することで、神経向性フラビウイルスの細胞変性及び脳炎病態の形成機構の解明を目指した。

**【研究手法】**

「**神経向性フラビウイルスの感染によるタンパク質の核内輸送への影響**」を明らかにするために、ウイルス感染細胞やウイルスタンパク質発現細胞を用いて免疫染色を実施し、核膜局在タンパク質を中心に、細胞内局在変化を超解像度顕微鏡により解析した。さらに「**核内輸送の阻害による病態形成への影響**」を明らかにするために、タンパク質の核内輸送阻害による細胞の生存関連因子や自然免疫関連因子の発現、ウイルスの増殖への影響を解析した。

**【研究成果】**
**神経向性フラビウイルス感染によるタンパク質の核内輸送阻害の分子機構の解明**

フラビウイルスの感染によって、本来は核内に局在する TDP-43 が神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）と同様に細胞質に蓄積することが明らかになった。TDP-43 の細胞質内蓄積は、タンパク質の核内輸送を担う核膜孔複合体の局在変化を伴う核膜の消失と関連した。また、フラビウイルスの C タンパク質は、核膜の消失につながる核ラミナの構成タンパク質のリン酸化を促進することで、その重合を抑制することが明らかになった。以上から、フラビウイルス感染によるタンパク質の核内輸送の阻害に関わるウイルス因子及び宿主因子が明らかになった。

**神経向性フラビウイルス感染によるタンパク質の核内輸送の阻害による脳炎病態形成に与える影響の解明**

ALS の病態において、核内輸送阻害による TDP-43 の細胞質内蓄積は神経保護因子の STMN2 の発現を抑制し、細胞死を誘導することが示唆されている。フラビウイルス感染により STMN2 の発現が抑制されることが明らかになった。また C タンパク質の発現は IFN の発現誘導に関わる、転写因子の核内局在及び、IFN のプロモーター活性を抑制した。以上より、タンパク質の核内輸送の阻害による細胞の生存やウイルス増殖への影響が明らかになった。

今後、C タンパク質による核ラミナ構成因子のリン酸化に関わる因子を特定し、特定因子や STMN2 の発現制御によるフラビウイルスの増殖への影響について生体を用いて解析することで、病態形成機構の解明へと繋げたい。

## 研究助成 2021 – 感染症領域 –

## 研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	北海道大学大学院獣医学研究院 獣医学部門 衛生学分野 公衆衛生学教室
氏	名	小林 進太郎

## 1. 論文発表実績

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。  
なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- 国内外雑誌を問わない。
- 印刷中は in press と記入、投稿中の論文はその旨を記載すること。なお学会のアブストラクトは含めない。
- 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

1	<u>Kobayashi S*</u> , Kawakami R, Takeda C, Sawa H, Yoshii K, Kariwa H, Ubiquitin accumulation induced by the finger and palm sub-domains of NS5 modulates the replication of West Nile virus, <b><i>Virology</i></b> , <b>588</b> : 109902, 2023 (*corresponding author) (査読有り)
2	Tabata K, Itakura Y, Ariizumi T, Igarashi M, Kobayashi H, Intaruck K, Kishimoto M, <u>Kobayashi S</u> , Hall WW, Sasaki M, Sawa H, Orba Y, Development of flavivirus subviral particles with low-cross-reactivity by mutations of a distinct antigenic domain, <b><i>Applied Microbiology and Biotechnology</i></b> , <b>107</b> : 7515-7529, 2023 (査読有り)
3	Thammahakin P, Maezono K, Maekawa N, Kariwa H, <u>Kobayashi S*</u> , Detection of disease-associated microglia among various microglia phenotypes induced by West Nile virus infection in mice. <b><i>Journal of Neurovirology</i></b> , <b>29</b> : 367-375, 2023 (*corresponding author) (査読有り)
4	<u>Kobayashi S*</u> , Fukuda Y, Yoshii K, Thammahakin P, Maezono K, Eyer L, Růžek D, Kariwa H, Development of recombinant West Nile virus expressing mCherry reporter protein. <b><i>Journal of Virological Methods</i></b> , <b>317</b> :114744, 2023 (*corresponding author) (査読有り)
5	Itakura Y, Tabata K, Saito T, Intaruck K, Kawaguchi N, Kishimoto M, Torii S, Itakura Y, Tabata K, Saito T, Intaruck K, Kawaguchi N, Kishimoto M, Torii S, <u>Kobayashi S</u> , Ito N, Harada M, Inoue S, Maeda K, Takada A, Hall WW, Orba Y, Sawa H, Sasaki M. Morphogenesis of Bullet-Shaped Rabies Virus Particles Regulated by TSG101. <b><i>Journal of Virology</i></b> , <b>12</b> : e0043823, 2023 (査読有り)
6	Tsujino D, Yoshii K, Kajiyama M, Takahashi Y, Maekawa N, Kariwa H, <u>Kobayashi S*</u> , Necroptosis of neuronal cells is related to the neuropathology of tick-borne encephalitis. <b><i>Virus Research</i></b> , <b>321</b> : 198914, 2022 (*corresponding author) (査読有り)
7	Tamiya K, <u>Kobayashi S*</u> , Yoshii K, Kariwa H. Analysis of the relationship between replication of the Hokkaido genotype of Puumala orthohantavirus and autophagy. <b><i>Virus Research</i></b> , <b>318</b> : 198830, 2022 (*corresponding author) (査読有り)
8	Berankoba Z, Kopecky J, <u>Kobayashi S</u> , Lieskovska J, Dual control of tick-borne encephalitis virus replication by autophagy in mouse macrophages. <b><i>Virus Research</i></b> , <b>315</b> : 198778, 2022 (査読有り)
9	Kawano K, Sakaguchi K, Madalitso C, Ninpetch N, <u>Kobayashi S</u> , Furukawa E, Yanagawa Y, Katagiri S. Effect of heat exposure on the growth and developmental competence of bovine

	oocytes derived from early antral follicles. <b><i>Scientific Reports</i></b> , <b>12</b> : 8857, 2022 (査読有り)
10	Nishiyama S, Hirano M, Muto M, Kambara M, Ito N, <u>Kobayashi S</u> , Kariwa H, Yoshii K. Y-shaped RNA secondary structure of a noncoding region in the genomic RNA of tick-borne encephalitis virus affects pathogenicity. <b><i>Microbiology and Immunology</i></b> , <b>66</b> : 234-237, 2022 (査読有り)
11	Takahashi Y, <u>Kobayashi S</u> , Nakao R, Kariwa H, Yoshii K. Characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from tick infesting dog in central Hokkaido in 2018. <b><i>Ticks and Tick-Borne Diseases</i></b> , <b>13</b> : 101900, 2022 (査読有り)

<b>2. 学会発表実績</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>● 国内外を問わない。</li> <li>● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	<b>発表時期</b>	<b>発表学会名、発表者名、演題</b>
1	2023年12月	第46回日本分子生物学会年会、 <u>小林進太郎</u> 、前園佳祐、Passawat Thammahakin、好井健太郎、澤洋文、苺和宏明、核内膜タンパク質の小胞体局在によるウエストナイルウイルスの増殖への影響（ポスター発表）
2	2023年12月	第46回日本分子生物学会年会、前園佳祐、Passawat Thammahakin、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルス感染による核膜の構造異常を伴う TDP-43 の細胞質内への異所性局在と病態形成との関連（ポスター発表）
3	2023年12月	第46回日本分子生物学会年会、江口悠人、前園佳祐、Passawat Thammahakin、石橋和夫、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルス感染で形成される複製複合体内に局在する二本鎖 RNA を標的とした抗ウイルス効果の検討（ポスター発表）
4	2023年9月	第70回日本ウイルス学会学術集会、前園佳祐、Passawat Thammahakin、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、核膜孔複合体の機能障害に着目した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-細胞質間輸送の障害機構の解析（口頭発表）
5	2023年9月	第70回日本ウイルス学会学術集会、河合星来、福田幸音、前園佳祐、Passawat Thammahakin、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルス感染における Rab27a の役割の解明（口頭発表）
6	2023年9月	第70回日本ウイルス学会学術集会、 <u>小林進太郎</u> 、前園佳祐、Passawat Thammahakin、好井健太郎、苺和宏明、核内膜タンパク質の小胞体局在によるウエストナイルウイルスの増殖との関連（口頭発表）
7	2023年9月	第70回日本ウイルス学会学術集会、江口悠人、前園佳祐、Passawat Thammahakin、石橋和夫、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルス感染で形成される複製複合体内に局在する二本鎖 RNA を標的とした抗ウイルス効果の検討（口頭発表）
8	2023年9月	第70回日本ウイルス学会学術集会、梶山実紗、福田幸音、佐々木道仁、Passawat Thammahakin、前園佳祐、長谷部理絵、村上正晃、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルスの脳内侵入機構の解明につながる脳組織の病理組織学的解析（ポスター発表）
9	2023年9月	第70回日本ウイルス学会学術集会、Passawat Thammahakin、Keisuke Maezono、Naoya Maekawa、Hiroaki Kariwa、 <u>Shintaro Kobayashi</u> 、Detection of disease-associated microglia among various microglia phenotypes induced by West Nile virus infection in mice（ポスター発表）
10	2023年9月	第29回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、梶山実紗、福田幸音、佐々木道仁、

		Passawat Thammahakin、前園佳祐、長谷部理絵、村上正晃、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルスの脳内侵入機構の解明につながる脳組織の理組織学的解析（口頭発表）
11	2023年9月	第29回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、江口悠人、前園佳祐、タマハキン パサワット、石橋和夫、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルス感染で形成される複製複合体内に局在する二本鎖 RNA を標的とした抗ウイルス効果の検討（口頭発表）
12	2023年9月	第29回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、前園佳祐、Passawat Thammahakin、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルス感染による核膜の構造的異常に伴う TDP-43 の細胞質内への異所性局在と病態形成との関連（口頭発表）
13	2023年9月	Sapporo Summer Symposium for One Health 2023、Keisuke Maezono、Passawat Thammahakin、Kentarō Yoshii、Hiroaki Kariwa、 <u>Shintaro Kobayashi</u> 、Examination of inhibition mechanism of nucleocytoplasmic protein transport by West Nile virus infection and the relationship with the pathogenesis（ポスター発表）
14	2023年9月	Sapporo Summer Symposium for One Health 2023、Passawat Thammahakin、Keisuke Maezono、Naoya Maekawa、Hiroaki Kariwa、 <u>Shintaro Kobayashi</u> 、Detection of disease-associated microglia among various microglia phenotypes induced by West Nile virus infection in mice（ポスター発表）
15	2023年9月	第166回日本獣医学会学術集会、河合星来、福田幸音、前園佳祐、Passawat Thammahakin、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルス感染時の Rab27a の役割の解明（口頭発表）
16	2023年9月	第166回日本獣医学会学術集会、梶山実紗、福田幸音、佐々木道仁、Passawat Thammahakin、前園佳祐、長谷部理絵、村上正晃、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルスの脳内侵入機構解明のための脳組織の病理組織学的解析（口頭発表）
17	2023年9月	第166回日本獣医学会学術集会、江口悠人、前園佳祐、Passawat Thammahakin、石橋和夫、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、ウエストナイルウイルス感染で形成される複製複合体内に局在する二本鎖 RNA を標的とした抗ウイルス効果の検討（口頭発表）
18	2023年9月	第166回日本獣医学会学術集会、前園佳祐、Passawat Thammahakin、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、核膜孔複合体の機能障害に着目した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-細胞質間輸送の障害と病態形成との関連の解析（口頭発表）
19	2022年12月	第45回日本分子生物学会年会、 <u>小林進太郎</u> 、前園佳祐、高橋侑嗣、Thammahakin Passawat、好井健太郎、苺和宏明、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（ポスター発表）
20	2022年12月	第45回日本分子生物学会年会、前園佳祐、好井健太郎、高橋侑嗣、Passawat Thammahakin、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、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（ポスター発表）
21	2022年12月	第45回日本分子生物学会年会、Passawat Thammahakin、Yuji

		Takahashi, Keisuke Maezono, Hiroaki Kariwa, <u>Shintaro Kobayashi</u> , Analysis of microglia heterogeneity and its association with virus-infected neurons in West Nile virus infected mouse (ポスター発表)
22	2022年11月	第69回日本ウイルス学会学術集会、 <u>小林進太郎</u> 、好井健太郎、苺和宏明、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 (口頭発表)
23	2022年11月	第69回日本ウイルス学会学術集会、寺内悠里乃、 <u>小林進太郎</u> 、苺和宏明、消毒薬や不活化処理による SARS-CoV-2 の不活化機構の解析 (ポスター発表)
24	2022年11月	第69回日本ウイルス学会学術集会、高橋優奈、神谷巨、好井健太郎、前園佳祐、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、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 (ポスター発表)
25	2022年11月	第69回日本ウイルス学会学術集会、福田幸音、高橋侑嗣、佐々木道仁、長谷部理絵、村上正晃、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、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 (ポスター発表)
26	2022年11月	第69回日本ウイルス学会学術集会、前園佳祐、好井健太郎、田畑耕史郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、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 (ポスター発表)
27	2022年11月	第69回日本ウイルス学会学術集会、Passawat Thammahakin, Hiroaki Kariwa, <u>Shintaro Kobayashi</u> , Histopathological analysis of microglia in West Nile virus infected mouse (ポスター発表)
28	2022年11月	第28回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、 <u>小林進太郎</u> 、前園佳祐、タマハキン パサワット、好井健太郎、苺和宏明、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 (口頭発表)
29	2022年11月	第28回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、前園佳祐、タマハキン パサワット、好井健太郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、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 (口頭発表)
30	2022年9月	第165回日本獣医学会学術集会、高橋優奈、神谷巨、好井健太郎、前園佳祐、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、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、(口頭発表、優秀発表賞を受賞)
31	2022年9月	第165回日本獣医学会学術集会、寺内悠里乃、 <u>小林進太郎</u> 、苺和宏明、消毒薬や不活化処理による SARS-CoV-2 の不活化メカニズムの解析 (口頭発表)
32	2022年9月	第165回日本獣医学会学術集会、高橋侑嗣、 <u>小林進太郎</u> 、中尾亮、苺和宏明、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 (口頭発表)
33	2022年6月	第56回日本脳炎ウイルス生態学研究会、辻野代、好井健太郎、梶山実紗、高橋侑嗣、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、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 (口頭発表)
34	2022年6月	第56回日本脳炎ウイルス生態学研究会、前園佳祐、好井健太郎、田畑耕史郎、苺和宏明、 <u>小林進太郎</u> 、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 (口頭発表)
35	2022年3月	第9回日本獣医病理学専門家学会学術集会、 <u>小林進太郎</u> 、ウイルス性脳炎における神経細胞の傷害メカニズム (招待講演)

### 3. 投稿、発表予定

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		
5		
6		