

# ストレス性脳機能障害におけるウイルス持続感染の影響

平成 26 年 5 月 27 日受付

西 野 佳 以

齋 藤 敏 之

京都産業大学総合生命科学部

## 要 旨

ストレスによる過剰な副腎皮質ホルモン（CORT）の分泌は、脳の海馬や前頭前野において神経変性や萎縮をおこし、さらに心的外傷後ストレス障害（PTSD）等の脳機能障害にむすびつくと考えられている。本研究では、ストレスに起因すると思われる脳の調節系の破綻に絡む何らかの潜在性因子の一つとしての向神経性ウイルスに焦点をあて、ストレスとウイルス性脳機能障害発症との関連性を明らかにすることを目的とした。

ボルナ病ウイルス（Borna disease virus:BDV）は、動物に持続感染し運動障害、行動学的異常などの神経症状を引き起こす向神経性ウイルスである。野外では不顕性感染している動物が多く存在するが、感染動物が発症するメカニズムは明らかではない。本年度の研究では、過剰なストレスがBDV感染動物に与えられた場合の脳障害（発症）について調べるための培養細胞モデルとして、マウスの大脳皮質神経初代培養細胞を作製し、BDVを感染した後、CORTあるいはカイニン酸添加による影響について解析した。

その結果、BDV感染大脳皮質神経初代培養細胞にCORTを添加すると、神経細胞へのウイルスの拡散速度が早くなった。また、カイニン酸を添加すると、感染細胞の細胞障害率が上がった。これらの結果から、CORTはBDV感染神経初代培養細胞におけるウイルス伝播性を亢進すること、カイニン酸はBDV感染神経細胞に対しより強く興奮刺激を与える可能性が示唆された。以上の結果から、BDVが持続感染している動物において過剰なストレスが与えられると、脳内のウイルス感染が広がること、ウイルス感染細胞では神経伝達物質であるカイニン酸受容体やAMPA型グルタミン酸受容体を介するシグナル伝達が増強される可能性が示唆された。

キーワード：ボルナ病ウイルス、大脳皮質神経初代培養細胞、副腎皮質ホルモン、  
カイニン酸、ストレス

## 1. はじめに

ボルナ病はモノネガウイルス目ボルナウイルス科に属するボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) が中枢神経系に持続感染することにより起こる神経・精神疾患であり、鳥類やヒトを含む幅広い温血動物へ自然感染していることが知られている[10, 16]。感染動物は、運動障害、行動学的異常あるいは感覚異常を呈し、時に致死的な神経疾患を引き起こすが、不顕性感染動物も多く存在する[16]。感染動物の行動学的異常では、ヒトの自閉症、統合失調症あるいは気分障害などの疾患に類似の症状を示す[15, 16]。不顕性感染から顕性感染へと変わる機構は、これまで明らかにされていない。

BDV は培養細胞や動物の脳細胞に感染しても殺さずに持続感染する[3]。そのため、感染動物が発病する原因は、古典的には免疫応答依存性に認められる脳炎と考えられてきた[16]。しかしながら、現在はウイルス要因 (ウイルス株の毒性差)[13]や、宿主要因 (傍分泌因子やヒートショックタンパク質など感染細胞とその周辺因子)[5, 8, 14, 25]などの複数の要因が発症に関連することが示唆されている。

本研究では、ボルナ病の発症要因として、環境要因 (外的ストレスなどによって産生されるホルモンなどの内分泌因子) について着目している。なぜなら、過大なストレス刺激や長期のストレス刺激は脳に障害を与えることが知られているからである。なかでも海馬や前頭前野において神経障害やそれらの領域の萎縮を引き起こすことが知られている[18, 19, 23, 24, 26]。ストレス作用因子によって生じるストレス反応は、通常ネガティブフィードバック機構により収束するが[6, 21]、過大なストレス刺激により神経障害や関連した脳の領域が萎縮するような病態は、ストレス反応軸のフィードバック機構が破綻し、副腎皮質ホルモン (CORT) が過剰に分泌されることに起因すると考えられている[18, 19, 23, 24, 26]。

本研究では、神経向性ウイルスである BDV が持続感染している動物に過剰なストレス刺激が与えられた場合のストレス性脳障害について調べることを目的としている。今年度は、その培養細胞モデルとして、マウス大脳皮質神経初代培養細胞を作製し、BDV を実験感染した後、過剰なストレス刺激として CORT を添加し、BDV 感染神経細胞が受ける影響について解析を行った。

## 2. 材料および方法

### (1) 大脳皮質神経初代培養細胞

イソフルラン吸入により ICR マウスあるいは C57BL/6NCrSlc マウス (日本 SLC、以下 C57BL/6 マウス) に全身麻酔を施した後、Aoyagi ら[1]の方法に準じて大脳皮質神経初代培養細胞を作製した。すなわち、胎齢 14 日前後のマウス胎児から大脳皮質を取り出し、0.25% トリ

プシン-EDTA および DNase 処理した。plating medium (10% 馬血清、10% 牛胎児血清 (FCS) 含 DMEM 培地) にて細胞を再懸濁し、細胞濃度  $1 \times 10^5$  個/ml に調整した後、あらかじめ 0.1% ポリエチレンイミンをコーティングした 24 穴プレートに 1 ml/穴、あるいは 8 穴チャンバースライドに 0.5 ml/穴の細胞懸濁液をそれぞれ分注し 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。1 時間後に、2%B-27 サプリメント (GIBCO 社) 含 NeuroBasal (以下 NB、GIBCO 社) に培地を置き換えて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、神経細胞からの樹状突起の伸長状況などを継時的に観察した。

本実験は、京都産業大学動物実験委員会の承認を得て行った。

## (2) 抗体

抗 BDV ポリクローナル抗体として BDV 感染ラット血清である R12[13]、抗 BDV-P タンパク質モノクローナル抗体として HP062[2]、抗グリア線維性プロテイン (GFAP) モノクローナル抗体 (ニチレイバイオサイエンス)、FITC 標識-tubulin モノクローナル抗体 (SIGMA-ALDRICH) を使用した。抗体は、Zenon Mouse IgG Labeling Kit (Molecular Probes 社) を用いて定法に従い Alexa Flour 555 あるいは Alexa Flour 488 を標識して用いた。

## (3) ウイルス

感染実験には、マウス順化 BDV 株である CRNP5-08J 株 (以下 BDV-CRNP5) を使用した。すなわち、BDV-CRNP4 株[17]を SJL マウス (日本チャールズリバー) に脳内接種し感染 5 週間後に採材した脳を乳剤化し、その遠心上清を BDV-CRNP5 原液とした[13]。ウイルス力価はラットグリオーマ細胞である C6 細胞を用いて計測した[13]。その結果、 $2 \times 10^5$  FFU/ml であった。ウイルスは使用するまで -80°C で保存した。本実験は、京都産業大学生物災害等防止安全委員会の承認を得て行った。

## (4) ウイルス感染

大脳皮質神経初代培養細胞は培養 4 日目に BDV-CRNP5 を感染した。すなわち、 $2 \times 10^3$  FFU/ml のウイルス (NB でウイルス原液を 100 倍希釈) を、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間吸着後、NB に置き換えて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

## (5) CORT あるいはカイニン酸の添加

CORT は、ジメチルスルホオキシド (DMSO) に溶解し 250 mM に調整した後、NB で 20 μM に調整した。大脳皮質神経初代培養細胞は、培養 8 日目に培養液を交換し、10 μM CORT を含む新鮮な NB に置き換えた。CORT 非添加の細胞には、CORT 添加に相当する量の DMSO を添加した。添加後の細胞は、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、形態観察を行った。

カイニン酸は、生理食塩水に溶解し、2.5 mg/ml に調整後、NB で 400  $\mu$ M に調整した。大脳皮質神経初代培養細胞は、培養 7 日目に培養液を交換し、200  $\mu$ M カイニン酸を含む新鮮な NB に置き換えた。カイニン酸非添加の細胞には、カイニン酸添加に相当する量の生理食塩水を添加した。添加後の細胞は、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 45 分間培養した後、添加した培地を新鮮な NB に置き換えて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### (6) 直接蛍光抗体法

CORT 添加 24 時間、および 48 時間後に、大脳皮質神経初代培養細胞の培養液を除き 4% パラフォルムアルデヒドで室温、15 分間固定した。固定後、PBS (-) で洗浄し、0.25%Triton X-PBS (-) を室温で 10 分間処理した。PBS (-) で洗浄した後、10%FCS 含 PBS (-) を 10 分間反応し、蛍光標識 1 次抗体を暗湿箱で 2 時間反応した。PBS (-) 並びに蒸留水で洗浄した後に 4% パラフォルムアルデヒドで後固定し、再度風乾し、DAPI を含む封入剤 (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector 社) で封入し、蛍光イメージアナライザー (EVOS FL セルイメージングシステム、Life Technologies 社) にて解析した。

#### (7) Fluoro-Jade C 染色による細胞障害を受けた神経細胞の検出

大脳皮質神経初代培養細胞の培養液を除き、10% 中性緩衝ホルマリンで室温、15 分間固定した。固定後、PBS (-) で洗浄し、0.25%Triton X-PBS (-) を室温で 10 分間処理した。PBS (-) で洗浄した後、Fluoro-Jade C Staining Kit (biosensis 社) を用いて説明書に従って染色した。蛍光イメージアナライザーにて、DAPI で核染色される細胞のうち、Fluoro-Jade C で染色される細胞を障害された神経細胞として検出した。

#### (8) 統計解析

結果は、Fisher の直接確率法により検定を行い、1% の危険率で差が認められた場合を有意差とした。

### 3. 結果

#### (1) 大脳皮質神経初代培養細胞への BDV 感染ならびに CORT 添加の影響

本実験では、ICR マウスあるいは C57BL/6 マウスの胎齢 14 日の胎児の大脳皮質から神経初代培養細胞を作製した。昨年度からの課題として、より長期間初代神経細胞の培養が可能になるように工夫をした結果、培養 1 ないし 2 日目で樹状突起が伸長し始め、その後少なくとも 2~3 週間は神経突起が委縮することなく培養することが可能になった (図 1)。そこで、大脳皮質神経初代培養細胞を作製し BDV を感染した後、CORT を添加し、その影響について解析

した。

大脳皮質神経初代培養細胞は培養4日目にBDV-CRNP5を感染し、培養8日目（感染4日目）にCORTを添加した。細胞の形態についてCORT添加前と添加24時間、48時間、および96時間後を比較したところ、観察期間においてはBDV-CRNP5感染による神経細胞の明らかな形態学的変化は認められなかった。また、CORT添加による形態学的変化も、感染の有無に関わらず認められなかった。

次に、ウイルス感染大脳皮質神経初代培養細胞へのCORTの影響を調べるために、CORT添加による感染神経細胞の比率の変化について解析した。その結果、C57BL/6マウス由来大脳皮質神経初代培養細胞では、CORT添加48時間目においてウイルス感染率は10.8%、非添加条件では8.2%でありCORTを添加したほうが1.3倍感染率が高い傾向が示されたが、有意差は認められなかった（図2）。しかしながら、CORT添加24時間後に対し48時間後のウイルス感染率は2.3倍増加し（4.7%から10.8%）、有意差が認められた。一方、CORT非添加条件では感染率は1.3倍増加したが（6.4%から8.2%）、有意差は認められなかった（図2）。

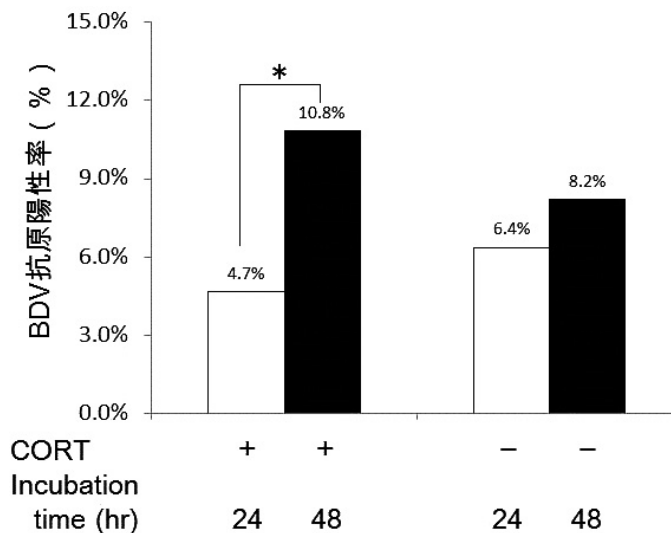


図2 CORT添加後のC57BL/6マウス由来神経初代培養細胞におけるBDV抗原陽性率  
\*印は $P < 0.01$ .

一方、ICRマウス由来大脳皮質神経初代培養細胞では、CORT添加48時間目においてウイルス感染率は17.2%、非添加条件では13.1%でありCORTを添加したほうが1.3倍感染率が高い傾向が示されたが、有意差は認められなかった（図3）。また、CORT添加24時間後と48時間後のウイルス感染率は、CORT添加条件では4.3%から17.2%に感染率が4.0倍増加し、非添加条件でも6.1%から13.1%に2.2倍感染率が増加した。双方ともに有意に感染率が増加したが、CORT添加条件の方がウイルス感染細胞の増加率はより高かった（図3）。

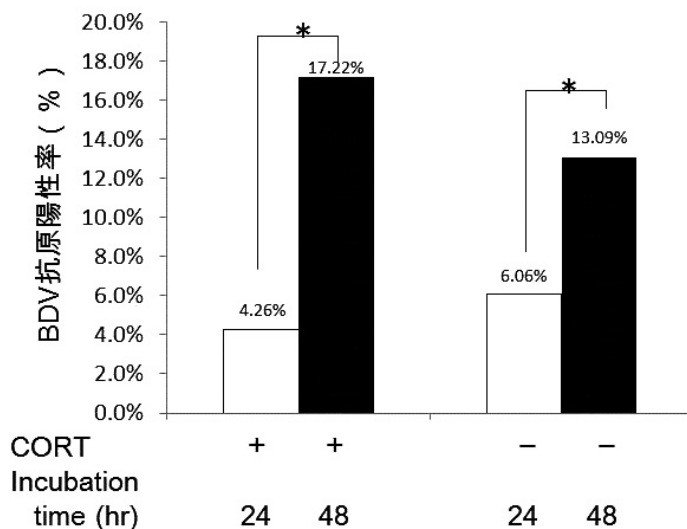


図3 CORT添加後のICRマウス由来神経初代培養細胞におけるBDV抗原陽性率  
\*印はP<0.01.

(2) ウイルス感染した大脳皮質神経初代培養細胞におけるカイニン酸の影響

大脳皮質神経初代培養細胞におけるカイニン酸誘導性の神経細胞障害について解析するために、C57BL/6マウス由来の大脳皮質神経初代培養細胞を作製し、培養4日目にBDV-CRNP5を感染し、培養7日目(感染3日目)にカイニン酸を添加し45分間培養した。カイニン酸添加時間を含め24時間後にFluoro-Jade C染色を行い、神経細胞障害を検出し、神経細胞障害率を算出した。その結果、カイニン酸による細胞障害が認められる神経細胞の比率は、非感染

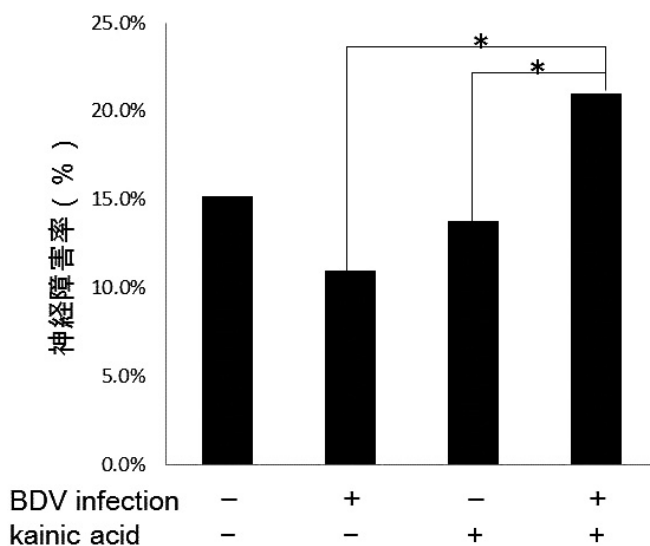


図4 カイニン酸添加後のC57BL/6マウス由来神経初代培養細胞の神経障害  
\*印はP<0.01.

細胞で 13.7% であったのに対し、BDV 感染細胞で 21.0% であり、カイニン酸による細胞障害は BDV 感染細胞の方が非感染細胞よりも有意に 1.5 倍高かった (図 4)。さらに、BDV 感染細胞における細胞障害性は、カイニン酸添加により 10.9% から 21.0% に 1.9 倍増加し、有意差が認められた (図 4)。

#### 4. 考察

今年度、マウス的大脑皮質神経初代培養細胞を 2-3 週間培養維持することが可能になったため、BDV 感染後に CORT あるいはカイニン酸を添加しその影響を解析した。また、目的の抗原を直接蛍光抗体法により三重染色する系が確立できたため、神経細胞、グリア系細胞 (主に星状膠細胞)、BDV-P タンパク質、および核の染色を目的に応じて同時に行い解析した。以下に、最終年度に実施した研究結果に基づいて考察する。

BDV 感染神経初代培養細胞は、CORT の添加 24 および 48 時間後のウイルス感染率はそれぞれ添加の有無において有意差は認められなかった。しかしながら、CORT を添加した場合、24 時間後から 48 時間後にかけてのウイルス感染率の上昇は有意に高かった。この原因として、CORT 添加による 1) ウイルス感染神経細胞の増殖性亢進、2) ウイルスの細胞内増殖性の亢進、あるいは 3) 非感染細胞へのウイルス伝播速度の亢進が可能性として考えられる。初代神経細胞は自己複製性 (増殖性) が元来低いことを考慮すると、2) あるいは 3) の可能性が高い。実際に、神経向性ウイルスである単純ヘルペスウイルスでは、マウスに脳内接種した直後から 0.2 mg/ml CORT を含む飲水を与えると、ウイルス複製が増して脳内で広がることが報告されている [22]。

大脑皮質神経初代培養細胞は、BDV 感染によりカイニン酸による細胞障害率が上昇した。この結果は、BDV 感染により神経細胞のカイニン酸に対する反応性が亢進したことを意味する。カイニン酸は、カイニン酸型グルタミン酸受容体 (以下、カイニン酸受容体) あるいは AMPA 型グルタミン酸受容体を介して神経細胞にシグナルを伝達する。これらの受容体はイオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つであり、神経伝達物質であるグルタミン酸との結合により  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  に対する透過性を増大させて脱分極させる受容体である。カイニン酸によって誘導される神経細胞死は、細胞内への  $\text{Na}^+$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の流入量が増加することによって起こる [7, 12]。カイニン酸受容体は生体における存在様式や機能的役割については未だ不明な点が多いが、AMPA 型グルタミン酸受容体と NMDA 型グルタミン酸受容体が興奮性シナプス伝達に直接的に寄与するのに対し、カイニン酸受容体はシナプス前部を脱分極させることで神経伝達物質の放出を調整するというメカニズムで神経細胞の興奮性やシナプス伝達の調節因子とし

て機能すると考えられている[9, 11, 20]。また、カイニン酸受容体は、海馬 CA3 野苔状線維シナプス（歯状回顆粒細胞の苔状線維終末）などの限られたシナプスに局在する傾向がある[4]。海馬の歯状回顆粒細胞および錐体神経細胞は BDV の高局在部位であり、神経細胞傷害が明らかに認められる部位であることから、BDV 感染個体の海馬神経細胞ではカイニン酸受容体あるいは AMPA 型グルタミン酸受容体の機能異常が引き起こされている可能性も予測される。

## 5. 今後の展開

### (1) 個体レベルでの研究

昨年度からの検討により、マウスの脳を対象にした Timm 染色法や、マウス個体でより侵襲の少ない方法で長期間、ストレスホルモンレベルを上昇させることが可能となっている（本所報第 2 号に報告）。今年度の細胞レベルの研究により、向神経性ウイルスである BDV が感染した神経初代培養細胞における、CORT の影響によるウイルス伝播性およびカイニン酸への反応性の亢進が示された。今後は、マウス個体において、人為的な短期ならびに長期のストレスホルモン処置による海馬等の神経機能変化、神経変性を定性的に解析するための研究、さらに、BDV 感染個体におけるストレスホルモン処置が病態に与える影響を解析したい。

### (2) 培養細胞レベルでの研究

ストレスホルモンが BDV 感染細胞において、ウイルス複製あるいは伝播速度を亢進する可能性についてさらに検討し、そのメカニズムを明らかにしたい。また、カイニン酸に対する感受性が感染細胞の方が高かったメカニズムを明らかにするために、カイニン酸受容体および AMPA 型グルタミン酸受容体におけるアンタゴニストを用いた抑制試験、ならびに受容体の発現量について解析を進めたい。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、本学総合生命科学部学生である市川みなみさん、小野隆祐君、大和慎治君および河北尚輝君の多大なる貢献に深謝します。

## 参考文献

- [1] Aoyagi N., Uemura K., Kuzuya A., Kihara T., Kawamata J., Shimohama S., Kinoshita A., and Takahashi R. PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 (2010) 1240-1245.
- [2] Bahmani M.K., Nowrouzian I., Nakaya T., Nakamura Y., Hagiwara K., Takahashi H., Rad M.A., and



- Ikuta K. Varied prevalence of Borna disease virus infection in Arabic, thoroughbred and their cross-bred horses in Iran. *Virus Res.* 45 (1996) 1-13.
- [3] de la Torre, J.C. Molecular biology of Borna disease virus and persistence. *Front. Biosci.* 7 (2002) D569-D579.
- [4] Ferkany J.W., Zaczek R., Coyle J.T. Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature.* 298 (1982) 757-759.
- [5] Hans, A., Syan, S., Crosio, C., Sassone-Corsi, P., Brahic, M and Gonzalez-Dunia D. Borna disease virus persistent infection activates mitogenactivated protein kinase and blocks neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7258-7265.
- [6] Herman J.P. and Cullinan W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in Neurosci.* 20 (1997) 78-84.
- [7] Hoyt, K.R., Stout, A.K., Cardman J.M and Reynolds I.J. The role of intracellular Na<sup>+</sup> and mitochondria in buffering of kainate-induced intracellular free Ca<sup>2+</sup> changes in rat forebrain neurones. *J. Physiol.* 509 (Pt 1) (1998) 103-116.
- [8] Kamitani, W., Shoya, Y., Kobayashi, T., Watanabe, M., Lee, B. J., Zhang, G., Tomonaga, K. and Ikuta, K. Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1. *J. Virol.* 75 (2001) 8742-8751.
- [9] Kamiya H. and Ozawa S. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *J. Physiol.* 523 (Pt 3) (2000) 653-665.
- [10] Kishi, M., Tomonaga, T., Lai, P. and de la Torre, J.C., in: Carbone, K.M. (Ed.), *Borna Disease Virus and Its Role in Neurobehavioral Disease* (ed.), ASM Press, Washington, D.C., (2002) pp. 23-43.
- [11] Lauri S.E., Delany C., Clarke V.R.J, Bortolotto Z.A., Ornstein P.L., Isaac J.T.R. and Collingridge G.L. Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuropharmacology.* 41 (2001) 907-915.
- [12] Niebauer, M. and Gruenthal, M. Neuroprotective effects of early vs. late administration of dantrolene in experimental status epilepticus. *Neuropharmacology* 38 (1999) 1343-1348.
- [13] Nishino, Y., Kobasa, D., Rubin, S.A., Pletnikov, M.V., and Carbone, K.M., Enhanced neurovirulence of borna disease virus variants associated with nucleotide changes in the glycoprotein and L polymerase genes. *J. Virol.* 76 (2002) 8650-8658.
- [14] Nishino Y, Ooishi R, Kurokawa S, Fujino K, Murakami M, Madarame H, Hashimoto O, Sugiyama K. and Funaba M. Gene expression of the TGF-beta family in rat brain infected with Borna disease virus. *Microbes Infect.* 11 (2009) 737-743.
- [15] Pletnikov, M.V., Moran, T.H. and Carbone K. M. Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders. *Front. Biosci.* 7 (2002) D593-D607.
- [16] Rott, R. and Becht, H. in: Koprowski, H. and Lipkin, W.I. (Eds.) *Borna Disease.*, Springer Verlag KG, Berlin. (1995) pp. 17-30.
- [17] Rubin, S.A, Waltrip, R.W., Bautista, J.R. and Carbone, K.M. Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression, *J. Virol.* 67 (1993) 548-552.
- [18] Sapolsky R.M. and Pulsinelli W.A. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science* 229 (1985) 1397-1400.
- [19] Sapolsky, R.M., Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp.*

- Gerontol. 34 (1999) 721-732.
- [20] Schmitz D., Mellor J. and Nicoll R.A. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science*. 291 (2001) 1972-1976.
- [21] Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br. J. Exp. Pathol.* 17 (1936) 234-248.
- [22] Sergerie Y., Boivin G., Gosselin D. and Rivest S. Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *J. Infect. Dis.* 195 (2007) 817-825.
- [23] Sorrells S.F., Caso J.R., Munhoz C.D. and Sapolsky, R.M. The Stressed CNS: When Glucocorticoids, Aggravate Inflammation. *Neuron* 64 (2009) 33-39.
- [24] Uno H., Tarara R., Else J. G., Suleman M. A. and Sapolsky R. M. Hippocampal Damage Associated with Prolonged and Fatal Stress in Primates. *J. Neurosci.* 9 (1989) 1705-1711.
- [25] Yamashita M., Kamitani W., Yanai H., Ohtaki N., Watanabe Y., Lee B.J., Tsuji S., Ikuta K. and Tomonaga K. Persistent borna disease virus infection confers instability of HSP70 mRNA in glial cells during heat stress. *J. Virol.* 79 (2005) 2033-2041.
- [26] Zhe D., Fang H. and Yuxiu S. Expressions of Hippocampal Mineralocorticoid Receptor (MR) and Glucocorticoid Receptor (GR) in the Single-Prolonged Stress-Rats. *Acta Histochem. Cytochem.* 41 (2008) 89-95.

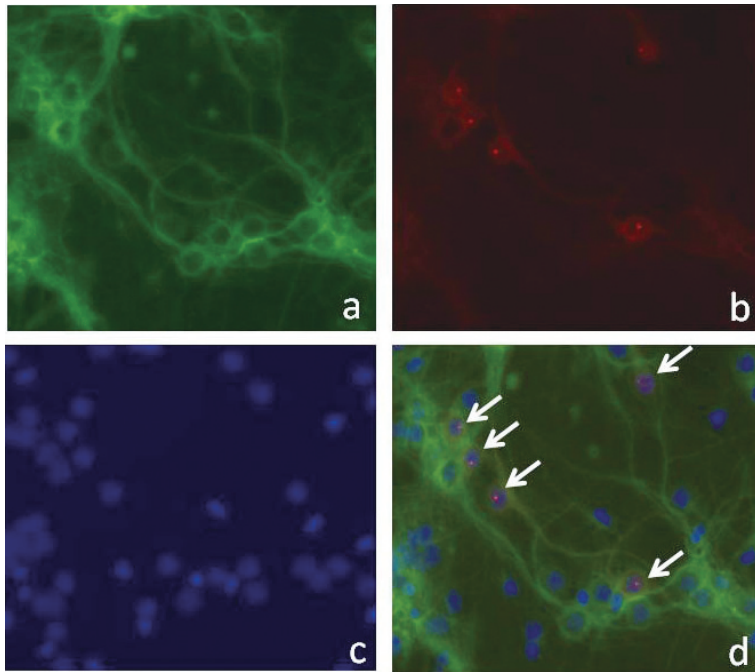


図1 大脳皮質初代神経培養細胞におけるBDV抗原の検出

ICRマウス由来大脳皮質初代神経培養細胞は、培養4日目にBDV-CRNP5を感染し、感染5日目に4%パラフォルムアルデヒドで固定後、0.25%Triton X処理をして、FITC標識 $\beta$ -Tubulin抗体(a)、Alexa Flour 555標識HP062モノクローナル抗体(b)、およびDAPI(c)と反応させ、蛍光イメージアナライザーで撮影した。dはa-cを重ね合わせた画像。矢印はBDV抗原を示す。

## Influence of virus infection in stress-induced neuronal dysfunction in the mouse brain

Yoshii NISHINO  
Toshiyuki SAITO

### Abstract

Recently, number of patients tends to increase suffering from such neuronal dysfunction as major depression, and post-traumatic stress syndrome (PTSD). Severe or repeated-stress possibly causes the brain malfunction possibly due neuronal degeneration and atrophy in the prefrontal cortex and hippocampus caused by prolonged secretion of glucocorticoid. However, factors remain to be unevaluated yet to cause the neuronal dysfunction under stressful condition. One possibility may be viral infection in the brain, which is inapparent infection and does not cause any disease in individuals yet. The purpose of this study is to examine and to evaluate whether viral infection may cause apparent damage in neurons of the brain of the animals that are exposed to stress hormone.

Borna disease virus (BDV) is a neurotropic virus that infects persistently; BDV infection induces behavioral abnormality and movement disorders. Inapparent infection has been reported in many species of animals, but precise mechanism underlying onset of neurological disorders is not known yet. BDV infection may modulate stress-induced encephalopathy. Thus, the present study examined effects of corticosterone or kainic acid in mouse primary cerebral cortex neurons infected with BDV. Treatment with corticosterone increased invasion of BDV into neurons, and kainic acid increased the ratio of neuronal damage in infected with BDV. These results suggest that corticosterone upregulates transmission efficiency of BDV in neurons, and that kainic acid exposure enhances neuronal excitotoxicity induced by BDV infection. High amount of corticosterone during stress may widespread BDV replication in the brain, and enhance signal transduction mediated by kainic acid receptor and AMPA receptor.

**Keywords:** Borna disease virus, primary cultured cortical neurons, glucocorticoid, kainic acid, stress