

3. ダニ媒介性フラビウイルスの病原性発現機序に関する研究

好井 健太郎

ダニ媒介性フラビウイルスの病原性発現機序に関する研究

人や動物に病原性を示すダニ媒介性フラビウイルスの多くは、媒介節足動物であるマダニの吸血後に末梢組織で増殖し、中枢神経系に侵入して脳炎による重篤な症状を示す。しかしこれらのウイルスがどのようにして中枢神経系で病原性を発現していくのか、その機序は殆ど不明である。本稿では、ダニ媒介性フラビウイルスの神経細胞での特徴的なウイルス複製のメカニズムとそれによる神経病態の発現についての知見を、我々の研究成果を中心に概説する。

はじめに

フラビウイルス科フラビウイルス属の多くは吸血性の節足動物（ダニ・蚊）によって媒介され、人や動物に病原性を示す多くの重要なウイルスが属している^{1,2)}。フラビウイルス属のウイルスは遺伝子学的・生態学的に、ダニ媒介性(tick-borne)フラビウイルス、蚊媒介性(mosquito-borne)フラビウイルス、そして脊椎動物特異的(No known vector)フラビウイルス、そして昆虫特異的(insect-specific)フラビウイルス³⁾の4つのグループに分けられている。蚊媒介性フラビウイルスには、デングウイルス、日本脳炎ウイルス(JEV)、西ナイルウイルス(WNV)、黄熱ウイルス、ジカウイルス等が挙げられる。近年、これらのフラビウイルスの流行地域の拡大が報告されており、世界人口の大部分が、一つ以上のフラビウイルスの流行地に居住している状況であり、世界的に公衆衛生上重要な問題となっている^{4,5)}。

フラビウイルス属のウイルス遺伝子は+鎖、一本鎖のRNAであり、約11,000塩基で構成される。ウイルス遺伝子RNAは1つのORFをコードしており、ここから約3,400アミノ酸の一つの蛋白質として翻訳された後、宿主又はウイルスのプロテアーゼにより3つの構造蛋白(C, prM, E)

と7つの非構造蛋白(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)へと切断される⁶⁾。

ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)はダニ媒介性フラビウイルスの中で最も医学的に重要なウイルスであり、ダニ媒介性脳炎(TBE)患者はユーラシア大陸の広域で年間一万人前後発生している、患者報告地域も拡大している⁷⁾。TBEVは遺伝子性状から、ヨーロッパ型、シベリア型、極東型の3つのサブタイプに分類される。各サブタイプの地理的分布については、重複する領域もあり、韓国でヨーロッパ型が分離されていたりする等⁸⁾、ユーラシア大陸内でのTBEVの頻繁な移動が示唆されている。

TBEVは自然界ではマダニによって媒介されており、主にIxodes属^{9,12)}、Dermacentor属^{9,13)}、Haemaphysalis属¹⁴⁾等の幅広い種のマダニが媒介可能であると報告されている。TBEVはマダニの中で、経齢間伝達¹⁵⁾及び経卵巣伝達¹⁶⁾することが知られており、マダニの中で世代を超えて長期間ウイルスが維持されることが可能である。

小型野生げっ歯類を中心に様々な野生動物とマダニの間で感染環が維持されているが、感染マダニの吸血により伴侶動物、家畜動物や人を含めた幅広い動物種に感染する。特に小型野生げっ歯類はウイルス血症を起こし、これにより吸血時のダニへの感染を引き起こすとされているが¹⁷⁻¹⁸⁾、ウイルス血症を起こしていない動物においても、感染マダニと非感染マダニが同じ場所で吸血することにより(co-feeding)、非感染マダニがウイルスを保有しうる事も知られている。さらに、TBEVに感染した家畜動物の生乳及びチーズを介した人への感染がヨーロッパで報告されている¹⁹⁻²⁰⁾。

日本では1948年に発生した日本脳炎流行時に、日本脳炎疑い患者からTBEVの一遺伝子型である跳躍病ウイル

連絡先

〒060-0818

札幌市北区北18条西9丁目

北海道大学 大学院獣医学研究院 公衆衛生学教室

TEL: 011-706-5212

FAX: 011-706-5213

E-mail: kyoshii@vetmed.hokudai.ac.jp

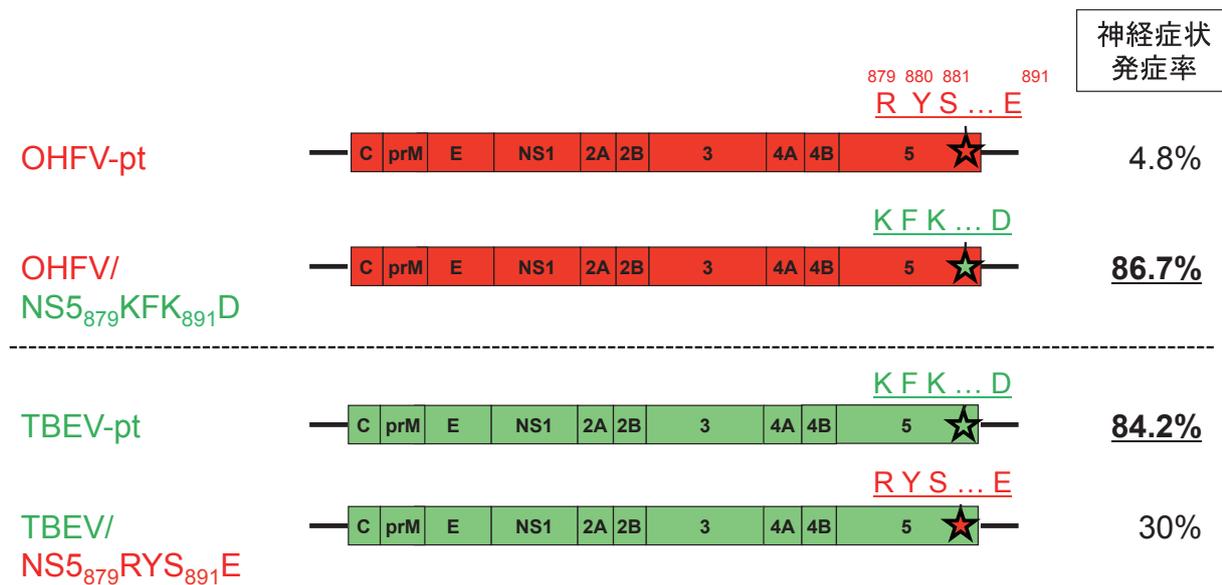


図1 キメラウイルス感染マウスにおける神経症状発症
各ウイルスをBALB/cに10,000 pfu皮下接種し、神経症状の発症を観察

スが2株分離されている²¹⁻²²⁾。そして北海道においては、1993年に道南において国内初の確定診断症例が発生しており²³⁾、2016-2017年においては札幌市および函館市において2-4例目となる確定診断症例が発生しており、そのうち2名が死亡している²⁴⁻²⁵⁾。我々は国内初のTBE確定診断症例の発覚以来、継続的に動物を対象とした血清疫学調査を行ってきているが、北海道の広範な地域及び西日本において、抗TBEV抗体を保有する動物が生息している事を明らかにしており、北海道のみならず日本の広域にTBEVの流行帯が存在している可能性を示してきている^{23,26-27)}。

ダニ媒介性フラビウイルスは、ダニの宿主への吸血時のかなり初期に宿主に感染するものと考えられている。吸血された皮膚の部位において好中球や単球、樹状細胞などに感染し、所属リンパ節に輸送されて増殖後、ウイルス血症や末梢臓器への体内伝播を起こすものと考えられている²⁸⁾。その後、神経向性ダニ媒介性フラビウイルスは中枢神経系(CNS)に侵入し、増殖すると考えられている。しかしダニ媒介性フラビウイルスが、どのようにして病原性を発現していくのか、その機序は殆ど不明である。

ダニ媒介性フラビウイルスにおける神経病態を決定するウイルス因子の同定

ダニ媒介性フラビウイルスの多くはTBEVに代表されるように、感染した人や動物に脳炎を引き起こし、それに付随して生じる様々な神経症状が認められる。それに対し、キャサヌール森林熱ウイルス(KFDV)、オムスク出血熱ウイルス(OHFV)及びAlkhumra virus(ALKV)の3つのダニ媒介性フラビウイルスは、発熱や頭痛、筋肉痛など

の初期に認められるインフルエンザ様症状は脳炎ウイルスと共通しているものの、感染した人に内臓の出血等の出血熱様症状を引き起こす事が知られている²⁹⁾。またマウスモデルにおいても感染した人と同様に、TBEVは四肢の麻痺等の神経症状を伴う脳炎を引き起こすのに対し、OHFVでは脳でのウイルス増殖が認められるものの神経症状は認められず、内臓指向性の出血熱様症状を引き起こすことが明らかになっている³⁰⁻³¹⁾。

TBEVとOHFVはアミノ酸配列全長にして90%以上の相同性があるにも関わらず³²⁾、何故このような病態の違いが起きるのか、それを決定するウイルス因子については長年不明であった。そのため、我々は両ウイルスの感染性cDNAによるリバーシジェネティクス法を確立し³³⁻³⁵⁾、マウスモデルを利用することで、両ウイルスの病態の違いを決定する因子の同定とその機序の解明を試みた³⁶⁾。

1. TBEVのNS5がマウスモデルにおける神経症状発現に重要である。

まずTBEVのOshima 5-10株及びOHFVのGuriev株に由来する感染性cDNAを利用して、エンベロープ膜蛋白(prM-E)領域をTBEV-OHFV間で組換えたキメラウイルス(TBEV/OHF-ME, OHFV/TBE-ME)を作製した。親株由来であるTBEV-pt、またはOHFV-ptを10,000 pfu皮下接種した5-6週令のBALB/cマウスでは、殆ど全て体重減少を示したが、TBEV-ptでは高率に神経症状として四肢の麻痺や平衡感覚の異常などを示したのに対し(81.0%)、OHFV-ptでは殆どのマウスは神経症状を示さなかった(6.4%)。そしてこの神経症状を示した割合は、

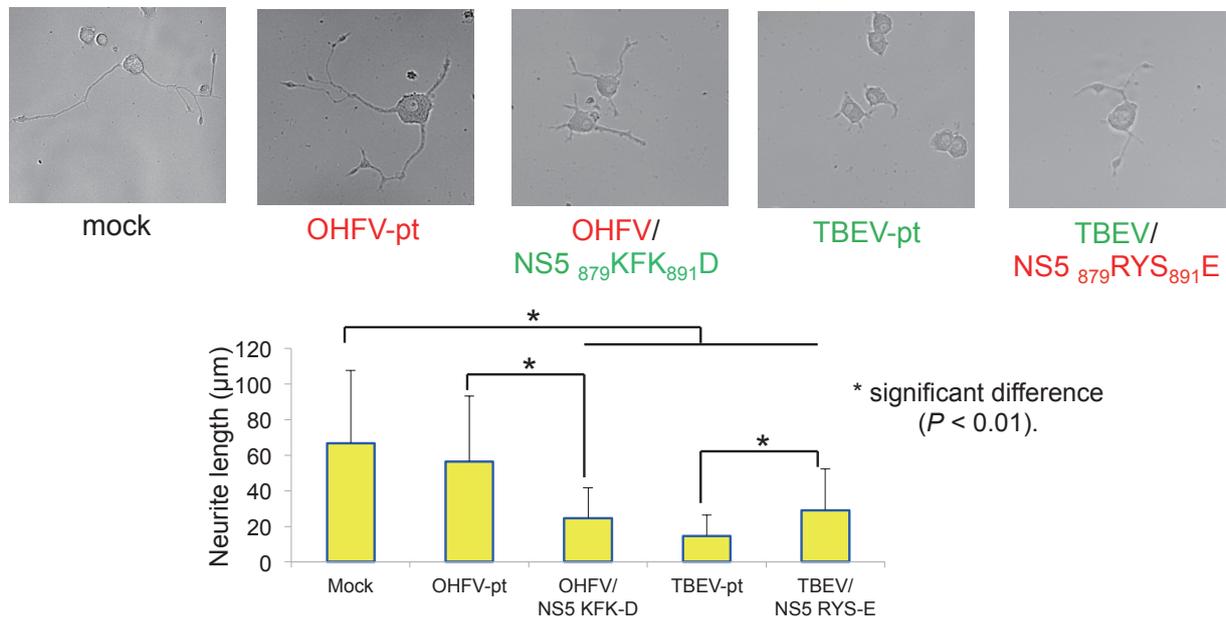


図2 キメラウイルス感染PC12細胞における神経突起伸長

各ウイルスをPC12細胞に感染させ、NGF存在下における神経突起の伸長への影響を観察

TBEV/OHF-ME, OHFV/TBE-ME を接種したマウスにおいても、それぞれの親株由来である TBEV-pt, OHFV-pt と殆ど変わらず、prM-E 領域は両ウイルスの病態の違いには関与していないことが示された。

同様に OHFV-pt をベースとして各ウイルス蛋白をコードする領域を組換えたキメラ OHFV を作製し、マウスに接種した所、C, NS1, NS2A, NS2B, NS4AB 領域の組換えは、接種マウスの神経症状を示した割合には殆ど影響を与えていなかった。しかし、NS3 領域の組換えにより 45.5%まで上昇し、さらに NS5 領域の組換えでは 88.9%と TBEV-pt 感染マウスと殆ど同じ割合で神経症状を発症するようになり、TBEV の NS5 に神経症状発症に関わるウイルス因子が存在することが示された。

さらに NS5 領域について詳細に解析していった所、OHFV の NS5 の 879-881 番目のアミノ酸 RYS 及び 891 番目のアミノ酸 E を、それぞれ TBEV 由来である KFK 及び D に置換したウイルス (OHFV/NS₈₇₉KFK₈₉₁D) を接種したマウスの内、80.8%が神経症状を示した (図1)。また TBEV から同部位のアミノ酸を OHFV 由来のものに置換したウイルス (TBEV/NS₈₇₉RYS₈₉₁E) を接種したマウスでは、神経症状を示す割合が低下した (81% → 30%)。これらの結果より、TBEV の NS5 の 4 つのアミノ酸 (KFK-D) がマウスモデルにおける神経症状発症に重要であることが示された。

2. TBEV の NS5 の 4 アミノ酸は神経突起の伸長に影響を与える。

TBEV の NS5 の 4 つのアミノ酸 (KFK-D) が、どのよ

うな機序でマウスモデルにおける神経症状発症に影響を与えているのか解析を行った。TBEV-pt, OHFV-pt, TBEV/NS₈₇₉RYS₈₉₁E, OHFV/NS₈₇₉KFK₈₉₁D について、ハムスター腎臓由来培養細胞である BHK 細胞及びマウス神経芽腫由来培養細胞 NA 細胞を用いて、ウイルスの増殖性を検討したが 4 つのアミノ酸置換による影響は認められなかった。さらに各ウイルスを感染させたマウスにおいて、血液、脾臓及び脳におけるウイルス量の経時変化を解析したが、同じく 4 つのアミノ酸置換による影響は認められなかった。さらに脳の組織病理解析においても、ウイルスの神経細胞への分布や炎症反応には 4 つのアミノ酸置換による影響は認められなかった。以上のことから NS5 の 4 つのアミノ酸の置換による神経症状発症率の変化は、ウイルスの増殖性や、脳内における神経細胞への感染指向性、炎症反応の誘発等に起因しているものでは無いことが示された。

そこで我々は、神経成長因子存在下で神経突起を伸長し神経細胞のモデルとして使用されるラット副腎髄質由来の褐色細胞腫である PC12 細胞を用いて、ウイルス感染による神経突起伸長への影響を解析した。BHK 細胞や NA 細胞と同じく、NS5 の 4 つのアミノ酸の置換によるウイルスの増殖性は認められなかった。TBEV-pt 感染細胞では、神経成長因子存在下での PC12 細胞の神経突起伸長が大きく阻害されたのに対し、TBEV/NS₈₇₉RYS₈₉₁E 感染では、その阻害効果が減弱していた。また OHFV-pt 感染細胞では神経突起伸長への影響は殆ど認められなかったのに対し、OHFV/NS₈₇₉KFK₈₉₁D 感染細胞では神経突起伸長が

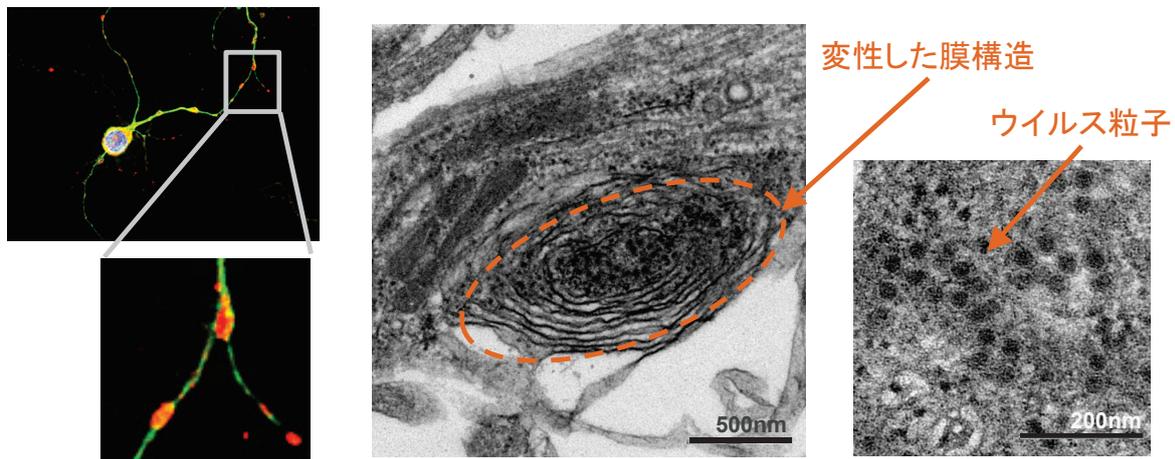


図3 TBEV感染マウス初代神経細胞の樹状突起におけるウイルス抗原の蓄積

TBEVをマウス初代神経細胞に感染させ、ウイルス抗原の分布を観察した(左図:赤)。樹状突起(MAP2:緑)に結節状のウイルス抗原の蓄積が認められる。電子顕微鏡下(中・右図)では、樹状突起上のウイルス抗原蓄積部位と考えられる所に、異常な内膜由来構造が認められ、内部にウイルス粒子と思われる構造物が見られる。

阻害されていた(図2)。従って、NS5の4つのアミノ酸は神経突起の伸長に影響を与える事が示された。

神経症状発症等の神経病態の表現型の発現には、何らかの神経科学的な機能不全や変性が関与しているものと考えられている。今回同定されたKFK-D配列は、神経突起の伸長に大きく影響を与えることが示された。神経突起の伸長の阻害は、神経突起の分化発達や、シナプス可塑性・小胞輸送に大きく影響を与える事が知られており³⁷⁻³⁸⁾、これがウイルス感染マウスの神経病態の表現型発現につながったものと考えられる。

今回同定されたKFK-Dの4つのアミノ酸はTBEVの殆どの自然界分離株に保存されており、OHFVで見られるRYS-Eの配列はKFDV、ALKVを含む出血熱性のダニ媒介性フラビウイルスに高度に保存されている。この4つのアミノ酸配列はNS5のC末端部に位置しているが、各ウイルスの進化・分岐の過程においてそれぞれの媒介マダニ・自然宿主哺乳動物に適應する形で選択されていったと推定される。今後はこれらのアミノ酸が相互作用する宿主因子を解析してその機序を明らかにしていくことで、ダニ媒介性フラビウイルスの病態発現機序に有益な知見が得られるものと考えられる。

TBEVの神経細胞内における特異的な複製機構の解析

フラビウイルスは感染した人や動物に様々な症状を引き起こすが、その中でもCNSに感染した際に起こる脳炎は症状も重篤化し致死率も高い傾向にある。主な脳炎を引き起こすフラビウイルス(TBEV, JEV, WNV)はCNSにおいて神経細胞を標的細胞として増殖するが、表現型として現れる中枢神経症状は各ウイルスで傾向が異なることが知られている³⁹⁻⁴¹⁾。しかし神経細胞でのウイルス複製が

どのようにしてこのような神経学的症状の違いにつながっているのか、その機序は不明である。

1. ダニ媒介性フラビウイルスは神経細胞の樹状突起で局所的に複製し膜構造の変性を引き起こす。

マウス初代培養神経細胞にTBEV, JEV又はWNVを感染させた所、全てのウイルスが神経細胞で顕著な増殖性が認められた。神経細胞内におけるウイルス抗原の分布を解析した所、蚊媒介性フラビウイルスであるJEV, WNVは神経細胞体においてウイルス抗原は認められ、樹状突起上には殆ど認められなかったのに対し、TBEVを感染させた神経細胞では、細胞体のみではなく樹状突起においてもウイルス抗原が蓄積しているのが認められた(図3)。さらにOHFVやLangat virus等の他のダニ媒介性フラビウイルスを用いて解析を行った所、TBEVと同様に樹状突起へのウイルス抗原の蓄積が観察され、この性質はダニ媒介性フラビウイルスに共通するものであることが明らかになった。

この樹状突起上でのウイルス抗原の蓄積部位には、ウイルスの構造蛋白及び非構造蛋白の双方が存在しており、さらにウイルスRNA複製時に生成される2本鎖RNAも観察された。従って、この部位において局所的にTBEVのゲノムRNA複製が行われウイルス蛋白が産生されていることが示された。さらに電子顕微鏡を用いて解析した所、樹状突起内にER由来と考えられる膜構造の変性が認められ、層状の膜構造が観察され内部にウイルス粒子と推定される粒子構造物が多数認められた。

フラビウイルスは一般的に感染した細胞のERにおいてウイルス複製が行われ、これに伴いER膜構造の変性が起こる。上記の成績から、TBEVのウイルスゲノムRNAは

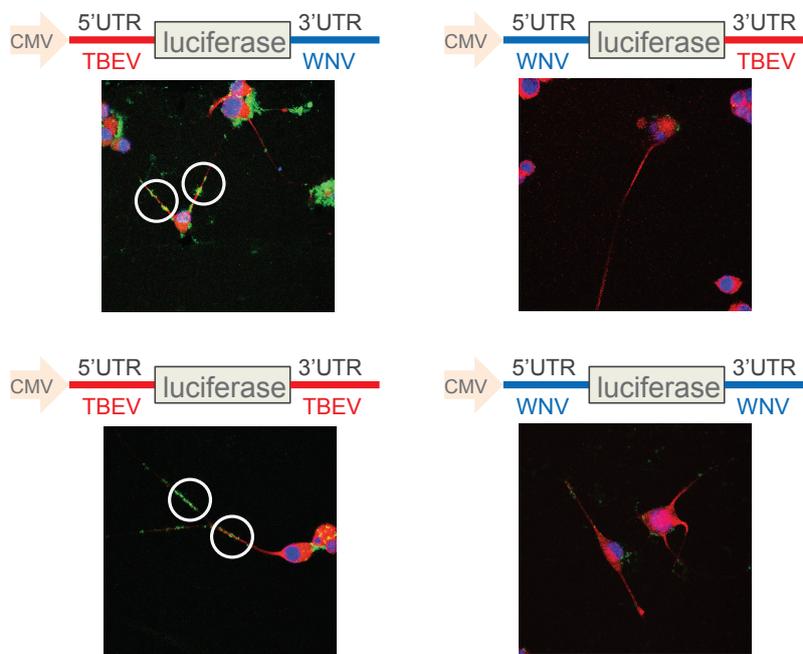


図4 神経突起内の TBEV 由来 RNA の輸送に関わる RNA 領域の同定

TBEV/WNV の 5'UTR/3'UTR を持つ RNA を、神経突起を伸展させた PC12 細胞内で発現させ、神経突起 (MAP2: 赤) における発現 RNA の輸送 (緑) を FISH 法により検出した。

何らかのメカニズムにより感染神経細胞中の樹状突起内を輸送され、局所的にウイルス RNA の複製が起こっていると考えられる。この複製は樹状突起内の ER 由来の膜構造において行われ、細胞体での複製と同様に、ウイルス複製に伴う膜構造の変性を引き起こしており、これが樹状突起の機能変性につながっているものと推定される。この現象は蚊媒介性フラビウイルスである JEV, WNV では認められず、ダニ媒介性フラビウイルスに特異的に認められたことから、フラビウイルス性脳炎においても TBEV 特異的な中枢神経症状の発現に関与しているものと考えられる⁴²⁾。

2. ダニ媒介性フラビウイルス RNA は neuronal granule により樹状突起内を輸送され、神経病態に影響を与える。

前項までの結果から、ダニ媒介性フラビウイルスは樹状突起内で局所的にウイルス複製が起こっていることが明らかになっており、これはウイルス RNA が樹状突起内を輸送されることを示されている。このようなウイルス RNA の輸送のメカニズムや神経病態の発現への影響等についてはこれまで殆ど不明であった。そこで我々はこのウイルス RNA がどのように運ばれているか、その分子機序を解析し、神経病態への影響との関連性について解析を行った⁴³⁾。

神経成長因子存在下で神経突起を伸長させた PC12 細胞に、ウイルス RNA を発現させて神経突起への輸送を FISH 法で解析した所、ウイルス蛋白及びウイルス蛋白をコードする領域の RNA ではなく、非翻訳領域 (UTR) の RNA が神経突起への輸送に重要であることが明らかに

なった。さらに UTR 中の輸送に重要な領域を絞り込んでいった所 5'UTR の特定の配列が輸送の決定因子であることが明らかになった (図 4)。

またウイルス RNA の輸送機序の解析において、我々は Neuronal granule と呼ばれる RNA-蛋白複合体に着目した。神経細胞は、樹状突起上で局所的に蛋白翻訳を行う機能を持ち、これにより複雑な神経ネットワークの制御を行っている⁴⁴⁻⁴⁵⁾。この局所翻訳機構において細胞体から樹状突起への宿主 RNA の輸送を担っているのが Neuronal granule であり、我々は TBEV のウイルスゲノム RNA は Neuronal granule を利用して樹状突起上へ運ばれているのではないかと仮説のもと解析を行った。樹状突起上でのウイルスゲノム RNA と neuronal granule の構成要素である RNA 結合蛋白 (FMRP) との局在について解析した所、両者の共局在が認められた (図 5)。またプルダウンアッセイにより 5'UTR との相互作用も確認された。さらに、ウイルス RNA の Neuronal granule による輸送が、本来運ばれるはずだった宿主 mRNA の輸送に影響しているか解析した所、TBEV 感染により樹状突起上のこれらの宿主 mRNA の分布量が減少しており、TBEV ゲノム RNA と宿主 mRNA の樹状突起上の輸送は競合する事が示された。

我々はさらに、5'-UTR の SL2 に変異を導入することにより、神経突起上のウイルスゲノム RNA 輸送と局所翻訳機能が欠損した TBEV を作製した。この変異ウイルスのマウスモデルにおける神経病理性発現への影響を解析した所、野生型と比較して死亡率や平均生存期間は影響を受け

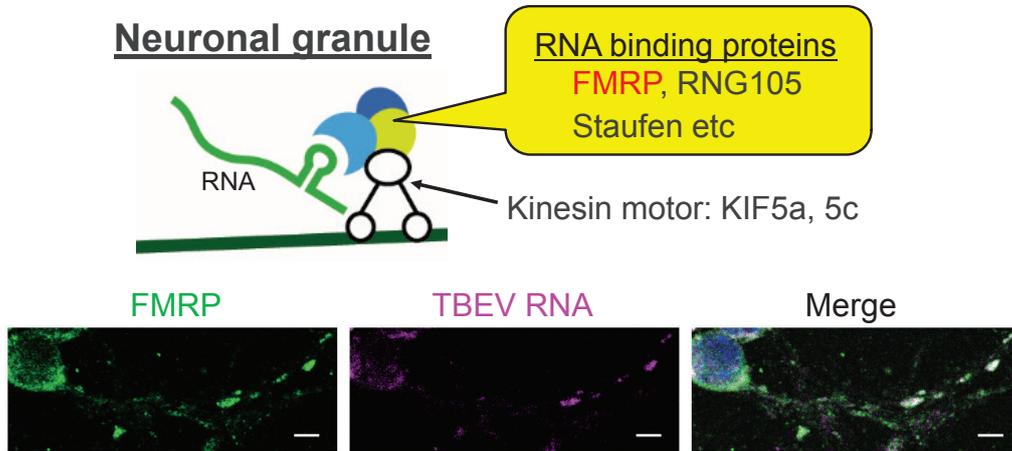


図5 樹状突起内の TBEV RNA と neuronal granule 構成蛋白の共局在解析

マウス初代培養神経細胞に TBEV を感染させ、樹状突起内における TBEV RNA (マゼンダ) と Neuronal granule を構成する RNA 結合蛋白である FMRP (緑) の局在を解析した。

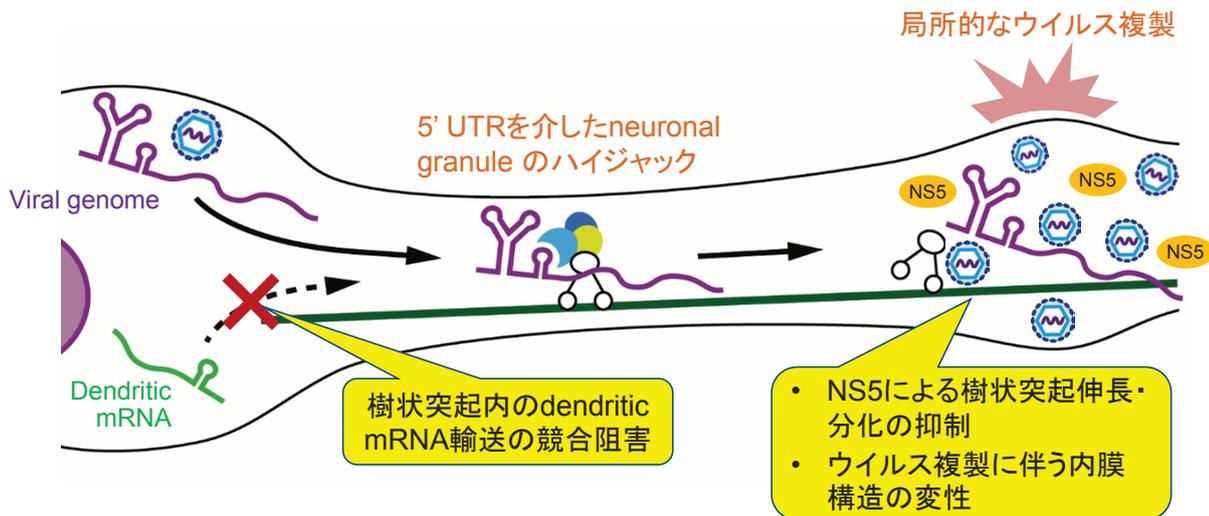


図6 樹状突起内の TBEV RNA 輸送メカニズムと樹状突起の機能変性の模式図

神経細胞において、TBEV の RNA は neuronal granule の RNA 輸送機構をハイジャックすることで樹状突起内を輸送され、これは本来運ばれる dendritic mRNA の輸送を競合阻害する。樹状突起内では輸送されたウイルス RNA が局所的に複製され、これが樹状突起の伸長・分化を抑制し、細胞内膜構造を編成させる。

なかったが、神経症状を示した個体数や神経症状の重篤度等が減少していることが示された。

以上の結果を総合して、TBEV が感染した神経細胞において、ウイルスゲノム RNA は Neuronal granule により樹状突起内を輸送され、これにより本来運ばれていた宿主 mRNA 輸送を競合し局所蛋白翻訳の阻害を引き起こすとともに、神経突起上における TBEV ゲノム RNA の複製・翻訳により誘導される宿主膜構造の変性に起因する樹状突起の障害によって、TBEV 特異的な中枢神経系の病態発現へとつながっていると考察される (図6)。

おわりに

一般にウイルス性脳炎は重篤化する傾向があり、致死率も高くなり回復後も重篤な後遺症が残ることも多い。一口に脳炎と言っても発現する神経学的な臨床症状はウイルス毎に異なる事も多く、それぞれのウイルスに特異的な病態発現機序が存在することが近年指摘されている。しかしこのようなウイルス性脳炎における神経学的な解析は難しい点が多く、詳細な機序は殆ど分かっていないため特異的な

治療法も存在していない。我々の研究で解析したように、脳炎ウイルスが感染した CNS に対してどのような機序で機能不全を起こして神経学的な症状の発現につながるかが明らかになれば、その機序を標的とすることによって症状の軽減を図れるような治療法の開発にも繋がると考えられる。今後も精力的に研究を推進し、フラビウイルスをはじめとするウイルス性感染症の制御に貢献し社会に還元できるように努力していきたい。

謝辞

本稿の研究は、北海道大学の高島郁夫先生、荻和宏明先生、及び The University of Texas Medical Branch の Michael R Holbrook 先生の下で進めてきました。研究のご指導を賜るだけでなく、学部学生時代からの恩師である高島先生には研究者として感染症研究に当たるべき姿勢についてをご教授いただき、そして留学先での上司である Holbrook 先生には研究を進める上で必要な柔軟な発想やユーモアの精神を学ばせていただき、これが今の私の基盤となっております。また研究室の内外のここには書ききれないほど多くの皆様の御指導・ご協力によって、一連の研究が遂行できましたことに心より感謝しております。そして私事になりますが、いつも傍で支えてくれている家族にも改めて感謝しております。最後に、杉浦奨励賞にご推薦いただいた国立感染症研究所の西條政幸先生、神奈川県衛生研究所の高崎智彦先生、北海道大学の荻和宏明先生に深く感謝申し上げます。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- Porterfield JS. [Arboviruses - structure and classification (author's transl)]. *Med Trop (Mars)* 40: 493-8.1980.
- Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371: 500-9.2008.
- Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses* 7: 1927-59. 2015.
- Hollidge BS, Gonzalez-Scarano F, Soldan SS. Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5: 428-42. 2010.
- Wilson MR. Emerging viral infections. *Curr Opin Neurol* 26: 301-6.2013.
- Heinz FX, Mandl CW. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. Review article. *APMIS* 101: 735-45.1993.
- Suss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond-the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13.2008.
- Kim SY, Jeong YE, Yun SM, Lee IY, Han MG, Ju YR. Molecular evidence for tick-borne encephalitis virus in ticks in South Korea. *Med Vet Entomol* 23: 15-20. 2009.
- Demina TV, Dzhioev YP, Verkhozina MM, Kozlova IV, Tkachev SE, Plyusnin A, Doroshchenko EK, Lisak OV, Zlobin VI. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *Journal of medical virology* 82: 965-76.2010.
- Suss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks Tick Borne Dis* 2: 2-15.2011.
- Takeda T, Ito T, Chiba M, Takahashi K, Niioka T, Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. *J Med Entomol* 35: 227-31.1998.
- Lichard M, Kozuch O. Persistence of tick-borne encephalitis virus in nymphs and adults of *Ixodes arboricola* and its transmission to white mice. *Acta Virol* 11: 480.1967.
- Kozuch O, Nosek J. Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. *Acta Virol* 15: 334.1971.
- Yun SM, Lee YJ, Choi W, Kim HC, Chong ST, Chang KS, Coburn JM, Klein TA, Lee WJ. Molecular detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome and tick-borne encephalitis viruses in ixodid ticks collected from vegetation, Republic of Korea, 2014. *Ticks Tick Borne Dis* 7: 970-978.2016.
- Danielova V, Daniel M, Schwarzova L, Materna J, Rudenko N, Golovchenko M, Holubova J, Grubhoffer L, Kilian P. Integration of a tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in the altitudinal limit of distribution of their vector, *Ixodes ricinus* (Krkonoše mountains, Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 223-30.2010.
- Radda A, Hofmann H, Pretzmann G. Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol* 13: 74-7.1969.
- Rosa R, Pugliese A, Norman R, Hudson PJ. Thresholds for disease persistence in models for tick-borne infections including non-viraemic transmission, extended feeding and tick aggregation. *J Theor Biol* 224: 359-76. 2003.
- Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, Kozuch O, Fuchsberger N, Lysy J, Nuttall PA. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219: 357-66.1996.
- Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases* 3: 430-41.2015.
- Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K, Werner P, Mischak A, Zainer B, Netzer M, Koppi S, Bechter E, Heinz FX. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis* 15: 1671-3.2009.

- 21) Ando K, Kuratsuka K, Arima S, Hironaka N, Honda Y, Ishii K. Studies on the viruses isolated during epidemic of Japanese B encephalitis in 1948 in Tokyo area. *Kitasato Arch Exp Med* 24: 557-62; English transl 429-41.1952.
- 22) Venugopal K, Buckley A, Reid HW, Gould EA. Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of Negishi virus shows very close homology to louping ill virus. *Virology* 190: 515-21.1992.
- 23) Takashima I, Morita K, Chiba M, Hayasaka D, Sato T, Takezawa C, Igarashi A, Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Hashimoto N. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J Clin Microbiol* 35: 1943-7.1997.
- 24) Yoshii K, Tajima Y, Bando K, Moriuchi R. A confirmed case of tick-borne encephalitis in Hokkaido in 2016. *Infectious Agents Surveillance Report* 38: 126.2016.
- 25) Yamaguchi H, Komagome R, Miyoshi M, Ishida S, Nagano H, Okano M, Shimada K, Fukami M, Tanaka K, Takeuchi N, Yoshii K, Kobayashi S, Kariwa H. tick-borne encephalitis in Hokkaido in 2017. *Infectious Agents Surveillance Report* 39: 46-47.2018.
- 26) Takeda T, Ito T, Osada M, Takahashi K, Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepizootiologic survey in Hokkaido, Japan. *Am J Trop Med Hyg* 60: 287-91.1999.
- 27) Yoshii K, Mottate K, Omori-Urabe Y, Chiba Y, Seto T, Sanada T, Maeda J, Obara M, Ando S, Ito N, Sugiyama M, Sato H, Fukushima H, Kariwa H, Takashima I. Epizootiological study of tick-borne encephalitis virus infection in Japan. *J Vet Med Sci* 73: 409-12.2011.
- 28) Weber E, Finsterbusch K, Lindquist R, Nair S, Lienenklaus S, Gekara NO, Janik D, Weiss S, Kalinke U, Overby AK, Kroger A. Type I interferon protects mice from fatal neurotropic infection with Langat virus by systemic and local antiviral responses. *J Virol* 88: 12202-12.2014.
- 29) Burke DS, Monath TP, Flaviviruses. In *Field's virology*, 4 ed.; Knipe, D. M.; Howley, P. M., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2001; pp 1043-125.
- 30) Holbrook MR, Aronson JF, Campbell GA, Jones S, Feldmann H, Barrett AD. An animal model for the tickborne flavivirus--Omsk hemorrhagic fever virus. *The Journal of infectious diseases* 191: 100-8.2005.
- 31) Tigabu B, Juelich T, Bertrand J, Holbrook MR. Clinical evaluation of highly pathogenic tick-borne flavivirus infection in the mouse model. *Journal of medical virology* 81: 1261-9.2009.
- 32) Lin D, Li L, Dick D, Shope RE, Feldmann H, Barrett AD, Holbrook MR. Analysis of the complete genome of the tick-borne flavivirus Omsk hemorrhagic fever virus. *Virology* 313: 81-90.2003.
- 33) Yoshii K, Igarashi M, Ito K, Kariwa H, Holbrook MR, Takashima I. Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. *Virus research* 155: 61-8.2011.
- 34) Hayasaka D, Gritsun TS, Yoshii K, Ueki T, Goto A, Mizutani T, Kariwa H, Iwasaki T, Gould EA, Takashima I. Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. *The Journal of general virology* 85: 1007-18.2004.
- 35) Takano A, Yoshii K, Omori-Urabe Y, Yokozawa K, Kariwa H, Takashima I. Construction of a replicon and an infectious cDNA clone of the Sofjin strain of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Archives of virology* 156: 1931-41.2011.
- 36) Yoshii K, Sunden Y, Yokozawa K, Igarashi M, Kariwa H, Holbrook MR, Takashima I. A critical determinant of neurological disease associated with highly pathogenic tick-borne flavivirus in mice. *J Virol* 88: 5406-20.2014.
- 37) Roche JP, Packard MC, Moeckel-Cole S, Budnik V. Regulation of synaptic plasticity and synaptic vesicle dynamics by the PDZ protein Scribble. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 6471-9.2002.
- 38) Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses. *Nature reviews. Neuroscience* 5: 771-81.2004.
- 39) Sejvar JJ, Haddad MB, Tierney BC, Campbell GL, Marfin AA, Van Gerpen JA, Fleischauer A, Leis AA, Stokic DS, Petersen LR. Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA* 290: 511-5.2003.
- 40) Ooi MH, Lewthwaite P, Lai BF, Mohan A, Clear D, Lim L, Krishnan S, Preston T, Chieng CH, Tio PH, Wong SC, Cardosa J, Solomon T. The epidemiology, clinical features, and long-term prognosis of Japanese encephalitis in central sarawak, malaysia, 1997-2005. *Clin Infect Dis* 47: 458-68.2008.
- 41) Czupryna P, Moniuszko A, Pancewicz SA, Grygorczuk S, Kondrusik M, Zajkowska J. Tick-borne encephalitis in Poland in years 1993-2008--epidemiology and clinical presentation. A retrospective study of 687 patients. *Eur J Neurol* 18: 673-9.2011.
- 42) Hirano M, Yoshii K, Sakai M, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *The Journal of general virology* 95: 849-61.2014.
- 43) Hirano M, Muto M, Sakai M, Kondo H, Kobayashi S, Kariwa H, Yoshii K. Dendritic transport of tick-borne flavivirus RNA by neuronal granules affects development of neurological disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 9960-9965.2017.
- 44) Shiina N, Yamaguchi K, Tokunaga M. RNG105 deficiency impairs the dendritic localization of mRNAs for Na⁺/K⁺ ATPase subunit isoforms and leads to the degeneration of neuronal networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 12816-30.2010.
- 45) Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, Desgroseillers L, Lacaille JC. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28: 2896-907.2008.

Pathogenic mechanisms of Tick-borne Flaviviruses

Kentaro YOSHII

Laboratory of Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University
Kita-18 nishi-9 kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0818, Japan

Many tick-borne flaviviruses causes fatal encephalitis in humans and animals with severe sequelae. However, it remains unclear how viral replication and pathogenicity contribute to the neurologic manifestations. In this paper, I summarized the specific replication mechanism of tick-borne flaviviruses in neurons and their effect on the pathogenicity of neurological disease. Our findings of the unique virus-host interaction in central nerve system will improve further understanding of the molecular mechanisms of viral replication and the pathogenicity of neurotropic viruses.

