

Lyre Anni Espada-Murao 論文内容の要旨

主 論 文

Delayed cytosolic exposure of Japanese encephalitis virus double-stranded RNA impedes interferon activation and enhances viral dissemination in porcine cells

(日本脳炎ウイルス感染ブタ細胞ではウイルス 2 本鎖 RNA の細胞質内暴露の遅延によりインターフェロン発現が妨害されウイルス増殖が促進される)

Lyre Anni Espada-Murao and Kouichi Morita

(Journal of Virology, 2011 年掲載予定)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻

(主任指導教員：森田 公一 教授)

【緒 言】

日本脳炎は我が国では 1980 年代から超低流行状態が維持されているが、東南アジアの開発途上国では年間 3 万～5 万人の感染者が発生していると見積もられており保健衛生上重要な蚊媒介性ウイルス感染症の 1 つである。日本脳炎ウイルスはブタの体内ではよく増殖し媒介蚊へのウイルス供給源となっている。一方、ヒトにおける感染では発症した場合、重篤な脳炎へと進行するが神経細胞以外でのウイルス増殖は低く、血液中のウイルス量は低レベルであり蚊へのウイルス供給源とはならず終宿主 (dead-end host) と呼ばれる。実際、培養細胞レベルの実験においてもブタ由来細胞で日本脳炎ウイルスは高い増殖性と伝搬性を示すが、ヒトを含む霊長類由来の培養細胞においては限局した感染を示す。我々はこの日本脳炎ウイルス感染における種特異性を解明するためウイルス増殖を抑制する細胞因子であるインターフェロン (IFN) の動向に着目し、日本脳炎ウイルスが持つブタ細胞における効率の良い増殖、伝搬メカニズムを細胞、分子レベルで明らかにすることを目的としてこの研究を実施した。

【対象と方法】

霊長類培養細胞としてサル由来 LLC-MK2 細胞、ヒト由来 HeLa 細胞、ブタ由来培養細胞として PS、PK、ESK、LLC-PK1 細胞を用いた。ウイルスの定量はプラーク法とフォーカス染色法を併用した。IFN 産生は real-time PCR 法、フォーカス減少法により測定した。IFN の作用抑制には種特異的抗 IFN 抗体を用いた。dsRNA の定量は dsRNA 特異的抗体を用いた免疫吸着法と real-time PCR 法を組み合わせた定量系を構築した。また細胞内への RNA 導入にはリポフェクタミン法を用いた。ヒト培養細胞の RIG-I, MDA5 遺伝子抑制にはサンタクルーズバイオテクノロジー社製 siRNA を用い、発現検出は特異抗体を用いたイムノブロット法により実施した。ウイルス E タンパクと dsRNA の細胞内局在の観察は膜特異的可溶化剤処理をした感染細胞を免疫染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。

【結 果】

- 1) 霊長類培養細胞における日本脳炎ウイルス感染では一過性の感染フォーカス形成と IFN の早期産生が観察された。一方、ブタ由来細胞では継続的な感染フォーカスの形成とそれに続くプラーク形成がみられ IFN の産生遅延が観察された。
- 2) 霊長類細胞における一過性の感染フォーカスの形成は、抗 IFN 抗体を添加することで継続的なフォーカス形成、プラーク形成へと変化した。
- 3) IFN 産生が遅延しているステージの日本脳炎ウイルス感染ブタ細胞へウイルス RNA を直接導入した場合には迅速な IFN の誘導とウイルス増殖抑制が観察された。この IFN 誘導は dsRNA 分解酵素で処理したウイルス RNA では消失した。
- 4) ウイルス感染の初期に dsRNA は小胞体内に存在しており、感染後期には細胞質内に露出していた。
- 5) ウイルス dsRNA の合成量はブタ細胞、霊長類細胞でおおきな差異はなかったが、その細胞質内への露出時期は霊長類細胞では感染後 24 時間で最大となり、ブタ細胞では感染後 36 時間で最大であり IFN の誘導時期と相関していた。

【考 察】

日本脳炎ウイルスのブタ細胞における高増殖性、伝搬性は感染細胞での IFN 産生の遅延が原因と結論された。RIG-I, MDA5 をノックダウンした霊長類細胞でウイルス感染による IFN 発現がブロックされたこと、dsRNA を導入したブタ細胞では高度の IFN 発現が確認されたことから、この系ではウイルス由来 dsRNA が最も重要な IFN 誘導因子であると結論づけた。

ブタ細胞での IFN 産生の抑制はウイルス側因子による IFN 発現系への積極的な抑制ではなく dsRNA の細胞質内への露出が遅れていること、すなわち感染初期にその dsRNA を小胞体に長時間隠すことにより細胞質内パターン認識受容体による発見を遅らせ、IFN の産生が遅延して高いウイルス増殖性を獲得していると結論づけた。

フラビウイルスはそれぞれ感染する動物種や臓器に特異性が見られることから、今回発見したウイルス dsRNA 露出遅延現象の種特異性がフラビウイルスの感染動物や臓器特異性に関与する可能性について今後検討する必要がある。