

論文の内容の要旨

論文題目 マクロファージガラクトース型 C 型レクチン(MGL/CD301)の細胞内ドメインの SNP によるエボラウイルス感染に対する感受性の違い

氏名 藤岡宏樹

第1章 背景と目的

免疫初期過程において、糖鎖と糖鎖認識分子は、細胞間の認識、免疫細胞の移動と分布の調節、外来抗原の取り込みなどに重要な役割を果たしている。マクロファージガラクトース C 型レクチン(MGL/CD301)は、カルシウム依存的結合を示す糖鎖認識分子であり、未成熟マクロファージ、マクロファージ、及び未成熟樹状細胞に発現している。ヒトにおける MGL(hMGL)は、単糖では galactose や *N*-acetylgalactosamine に特異性をもち、hMGL は腫瘍糖鎖抗原である Tn 抗原を認識すること(Suzuki, N. 1996)、未成熟樹状細胞は hMGL を介して O-結合型糖鎖を豊富にもつムチン様分子を認識し取り込むことが知られている(Higashi, N. 2002)。

ムチン様分子を発現する病原体として、フィロウイルスがある。フィロウイルスは出血熱を起こす致死率の高いウイルスであり、治療法が確立していない。フィロウイルスに属するウイルスとして、エボラウイルス、Murburg ウイルスがあり、エボラウイルスには、Zaire, Sudan, Ivory Coast, 及び Reston の亜種がある。エボラウイルスの感染は単球、マクロファージ、樹状細胞などを第一標的にすると考えられている(Mahanty, S. 2004)。表面タンパク上のムチン様分子を欠くエボラウイルスは感染力が低下することから、ムチン様分子と相互作用を示す分子は感染に関与すると考えられた(Yang, Z. 2000)。

これらのことから、エボラウイルスの感染に hMGL が関与している可能性を考え、それを明らかにし、予防・治療法の開発に役立てていくことを目標として本研究を行なった。

第2章 マクロファージガラクトース型 C 型レクチン(MGL/CD301)はエボラウイルスの感染を促進する

【目的】

hMGLを発現するhMGL(Arg³⁵)トランスフェクタント細胞クローンを作製し、hMGLがフィロウイルスの感染を促進するか、ムチン様領域と相互作用を起こし感染が起きるか、さらに抗hMGL抗体によって、感染を阻害できるかを明らかにし、フィロウイルス感染の予防や治療に役立てることを目的とした。

【方法と結果】

hMGL 発現細胞クローンの作製

hMGL がエボラウイルスのエントリーサイトとしての働きをしているかを明らかにするため、恒常的にhMGLを発現するK562トランスフェクタントを作製しクローン化した。そのクローンの中で、抗 MGL 抗体 mAb MLD-1 の結合性をもとに、hMGL の発現量の異なる CR4-4(低発現細胞クローン)と CR4-10(中発現細胞クローン)を選択した。

擬似ウイルスの感染

感染実験に用いる擬似ウイルスとして、外郭タンパク(VP40及びGlycoprotein: GP)はエボラウイルスであるが内部の遺伝子をブタ水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus: VSV)のGタンパクを除く部位で構成されたウイルスを用いた(VSV ΔG*-Ebola GP)。

Zaire 型擬似ウイルス VSV ΔG*-Zaire GP の感染はhMGL発現細胞クローン CR4-4, CR4-10で検出され、その感染価は hMGL の発現の高い CR4-10で高かった(図 1.)。

エボラウイルスムチン様領域との相互作用

ムチン様領域を欠くVSV ΔG*-Zaire GP Δmucの感染はCR4-4, 4-10ともに成立した。その感染価はCR4-10の方が高く、VSV ΔG*-Zaire GPの感染価に比べ1/4以下になった(図1.)。

hMGLを介した感染であることの確認

これらhMGL発現細胞クローンの感染がhMGLを介したものであることを確かめるために、ブロッキング抗体mAb MLD-1を用いて感染を阻害する実験を行

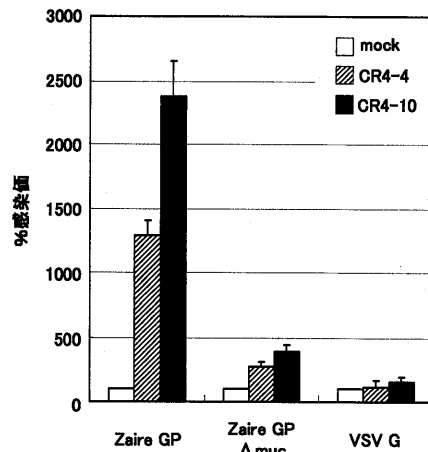


図1. 各トランスフェクタント細胞クローンに対するZaire型擬似ウイルスの感染

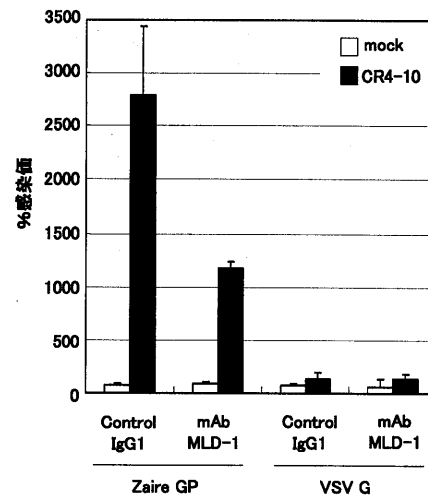


図2. Zaire型擬似ウイルスの感染と抗MGL抗体による感染阻害

なった。mAb MLD-1は、ウイルスと共培養を始める30分前に加えた。mAb MLD-1を加えることによって感染価が低下したこと、及びVSV ΔG^* -VSV Gの感染には影響を与えなかったことから、擬似ウイルスVSV ΔG^* -Zaire GPの感染には、hMGLの発現が関与していることが示された(図2)。

hMGLを介したフィロウイルスの感染

他のフィロウイルスの感染もhMGLを介しているかを明らかにするため、フィロウイルスを用いて同様の検討を行なった。どのウイルスでもCR4-10で感染が成立しており、とりわけZaire, Sudan, Ivory Coastで感染価が高く、RestonやMarburgウイルスに比べ、著しく感染価が上昇した($P < 0.05$)(図3)。

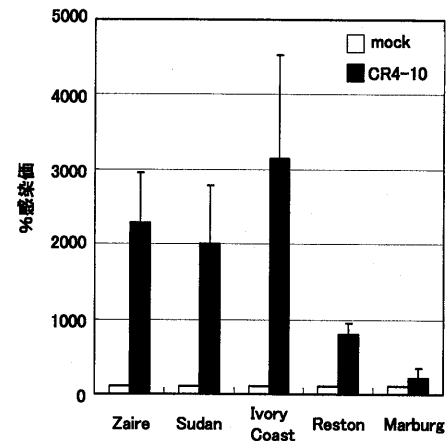


図3. フィロウイルスの感染

第3章 マクロファージガラクトース型 C 型レクチン(MGL/CD301)の細胞内ドメインの SNP によるエボラウイルス感染に対する感受性の違い

【目的】

hMGLのSNPは現在までに5箇所報告されており、そのうち第35番アミノ酸に関わるSNP(JSNP ID: IMS-JST119213)はArg/Cysのアミノ酸変異を伴うことが知られている。SNPによって機能に違いを与えている可能性が考え、本実験を行なった。このため、第35番アミノ酸がArg/CysであるhMGLを導入したヒト白血病細胞株K562細胞のクローンを作製し、ムチン様分子の結合や取り込みの差異を検討した。また、エボラウイルスの感染がSNPによって異なる可能性を考え、それぞれのクローンに対する、エボラ擬似ウイルス感染の検討を行なった。

【方法と結果】

Arg³⁵及びCys³⁵-hMGL発現細胞クローンの作製

前章で作製したArg³⁵-hMGLを発現するトランスフェクタント細胞に加え、Cys³⁵-hMGLを発現するK562トランスフェクタントを作製した。クローン化を行ない、Cys³⁵-hMGL発現細胞クローンを15種類取得した。それらのクローンの中で、抗hMGL抗体 mAb MLD-1結合性の同様なクローンを、Arg³⁵-hMGL及びCys³⁵-hMGLを発現するクローンからそれぞれ選択した(それぞれ、KC9: Arg³⁵-1, 4T-15: Cys³⁵-1)。

ムチン様分子・ウイルス様粒子の結合及び取り込み

前章でhMGL発現細胞クローンに対して、ムチン様領域を欠く擬似ウイルスの感染価が大きく低下したことから、hMGLがムチン様領域に結合し、取り込まれることが感染を引き起こす原因になることが示唆された。このため、ムチン様分子やウイルス様粒子がArg³⁵-hMGL及びCys³⁵-hMGLと結合し、取り込まれるかどうかを明らかにするために、ムチン様分子のモデルとしてポリアクリルアミドに α -N-acetylgalactosamine(GalNAc)が複数個結合したポリマー(α -GalNAc-PAA)を、ウイルス様

粒子はウイルス様外郭タンパクに GFP が組み込まれたものを用いて、結合及び取り込みの測定を行なった。結合量及び取り込み量ともに、Arg³⁵-1 細胞に比べ Cys³⁵-1 細胞の方が高かった。

擬似ウイルスの感染

SNP の違いによって見られた、ムチン様分子やウイルス様粒子の結合や取り込みの差が、エボラウイルスの感染に影響を与えるかどうかを明らかにするため、擬似ウイルスを用いて感染実験を行なった。

擬似ウイルス VSV ΔG*-Zaire GP の感染は、どちらの細胞クローンでも見られ、Cys³⁵-1 細胞の方が Arg³⁵-1 細胞より感染価が高くなった。Mock 細胞における感染は、ほとんど見られなかった(細胞 10000 個に対し 1~5 個)。また、VSV ΔG*-Zaire GP に比べ、VSV ΔG*-Zaire GP Δmuc の感染はほとんど見られず、VSV ΔG*-Reston GP の感染価は低かった。また、どの擬似ウイルスに対しても mAb MLD-1 によって、その感染は阻害された(図4)。

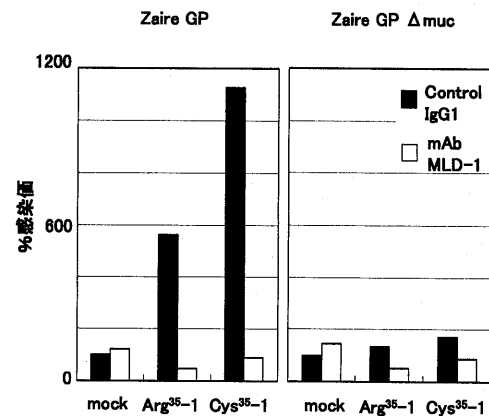


図4. 各トランスフェクタント細胞クローンに対する Zaire型擬似ウイルスの感染

第4章 総括

本研究によって、

1. エボラウイルスの感染が 4 亜種全てに対し、hMGL を介して起こること
2. hMGL を介した感染の大部分は、エボラウイルスのムチン様領域と相互作用によって成立すること
3. SNP による 35 番アミノ酸の変異によって、ムチン様分子及びウイルス様粒子の結合や取り込みに影響を与え、Arg 型を発現した細胞に比べ、Cys 型の hMGL を発現した細胞で多くなること
4. Arg 型を発現した細胞に比べ、Cys 型の hMGL を発現する細胞でエボラウイルスの感染が高くなること
5. エボラウイルスの感染は、抗 hMGL 抗体 mAb MLD-1 によって阻害できることを示した。

エボラウイルスの治療法は確立しておらず、hMGL を介した感染を明らかにしたこと、SNP による感染性の違いを示唆したこと、抗 hMGL 抗体によって感染が阻害できることなど、本研究で得られた知見は大変重要であると考えられる。