

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 17 年度博士課程 入学

氏 名 山根 大典

指導教員名 明石 博臣

論文題目 Studies on molecular biological interactions between bovine viral diarrhea virus and innate immune system

(牛ウイルス性下痢ウイルスと先天性免疫機構との分子生物学的相互作用に関する研究)

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は、フラビウイルス科ペスチウイルス属に分類される。ペスチウイルス属には BVDV の他に、豚コレラウイルス、羊のボーダー病ウイルスが所属するが、いずれも宿主動物の病原体として非常に重要な存在である。特に BVDV はそのゲノム構造が人の病原体として重要視される C 型肝炎ウイルス (HCV) と類似しており、両者とも持続感染する特徴を持つことから、モデルウイルスとしてしばしば HCV 研究に用いられている。BVDV には細胞病原性 (cp) および非細胞病原性 (ncp) と生物学的性質の異なった 2 種類の生物型のウイルス株が存在する。ncp 株が胎子に持続感染を起こすと、子牛体内でやがて cp 株へと変異することによって致死的な粘膜病を引き起こすことが明らかとなっている。また、野外流行株は ncp 株であり、cp 株は持続感染を引き起こさないことが知られている。従って、BVDV の細胞病原性発現メカニズムを明らかに出来れば、牛群からの BVDV 排除法につながるばかりでなく、持続感染から粘膜病発症に至るプロセスを理解する上で有益な示唆を与えうると考えられる。

そこで、cp 株を中心にアポトーシスやインターフェロン (IFN) 等の先天性免疫誘導メカニズム及びウイルス-宿主間のタンパク相互作用を解析することにより、宿主先天性免疫応答を介した細胞病原性発症メカニズムについて研究を行った。

各章の要約は以下の通りである。

第一章：細胞病原性 BVDV 感染細胞における外因系因子 TNF α によるアポトーシス増強

BVDV の細胞病原性はアポトーシスを介していることが既に知られているが、アポトーシス誘導に至る経路については未解明である。BVDV 複製効率の良い、初代牛胎子由来筋肉(BFM)細胞における遺伝子発現誘導を網羅的な RT-PCR 法によって検出したところ、外因系因子である TNF α の過剰発現が cp 株感染細胞内において認められた。そこで、抗体や antisense 鎖を用いて TNF α を抑制したところ、アポトーシス誘導の減少が見られた。これまでアポトーシスは内因系経路が働いているとの報告があったが、これらの結果から外因系の関与も強く示唆された。同時に iNOS の誘導も RT-PCR により検出されたが、NOS 阻害剤である L-NMMA 添加によってはアポトーシス増強が見られたことから、iNOS は抗アポトーシス作用を誘導していることが示唆された。

第二章：細胞病原性 BVDV 感染細胞における 2 本鎖 RNA 誘導性アポトーシス経路の関与

cp 株感染細胞内において TNF α や iNOS の他、IFN 誘導因子である Mx1 や PKR、OAS-1 等の抗ウイルス因子の転写誘導が認められたことから、これらの発現誘導にどのようなウイルス因子が関与しているのかを調べた。cp 株感染細胞においては、ウイルス RNA 複製量が ncp 株と比較して顕著であったことから、ウイルス RNA 複製時に複製中間体として形成される 2 本鎖 RNA がアポトーシスの引き金なのではないかと考えた。これらの mRNA は全て、2 本鎖 RNA モデル化合物である poly(IC)によって誘導されることが示され、次に 2 本鎖 RNA に結合することで活性化しアポトーシスを誘導する宿主因子である OAS-1 と PKR 双方を RNAi によりノックダウンすると、cp 株感染細胞においてアポトーシス誘導が強く抑制されたことから、2 本鎖 RNA 形成量がアポトーシス誘導及び抗ウイルス応答の引き金として重要であることが強く示唆された。

第三章：BVDV 持続感染牛の脾臓におけるウイルス RNA レベルと先天性免疫誘導との関係

BVDV 持続感染(PI)牛におけるウイルス RNA 複製と先天性免疫誘導との関係を調べるため、PI 牛より得られた脾臓内におけるウイルス RNA 量と先天性免疫因子の転写量やアポトーシス誘導レベルとの関係を回帰分析により調べた。その結果、ウイルス RNA レベルと多くの先天性免疫因子の間には有意な正の相関が認められ、ウイルス RNA レベルが高い個体ほど顕著な臨床兆候が見られたことから、*in vivo* においてもウイルス RNA 複製量が宿主の先天性免疫誘導や病態形成に重要であることが示唆された。

第四章：BVDV 感染 MDBK 細胞における酸化ストレスを介した ERK 活性化

細胞のシグナル伝達においては様々なキナーゼによるリン酸化カスケードが重要な役

割を担う。BVDV 感染細胞内においてどのようなキナーゼシグナルが働いているかを調べたところ、cp 株感染 MDBK 細胞において extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化による活性化が認められた。また、cp 株感染細胞上清に ERK リン酸化誘導能が認められたことから、cp 株感染細胞は上清中に ERK 活性化因子を放出していることが示された。ERK リン酸化は過酸化水素の添加や血清除去によっても誘導され、一方で抗酸化物質である N-acetylcysteine やグルタチオン処理によって抑制されたことから、上清中に放出された Reactive oxygen species が ERK リン酸化を誘導していることが示された。MDBK 細胞において ERK リン酸化は生存や増殖を促進することが認められたが、ERK シグナルは NFκB を初めとする炎症シグナルを誘導することも知られていることから、ERK の異常な活性化は病態形成との関連が示唆される。

第五章： BVDV 感染により誘導される細胞型特異的シグナル経路のマイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイを用いて MDBK 細胞及び BFM 細胞内における BVDV 感染時の遺伝子発現パターンの網羅的な解析を行った。その結果、ncp 株感染においては遺伝子発現変化が殆ど無いのに対し、cp 株感染細胞では顕著な遺伝子発現誘導が両細胞において認められた。cp 株は両細胞において同様に細胞死を誘導するが、両細胞間において大きく異なる遺伝子発現パターンが見られた。線維芽細胞である BFM 細胞においては、主に IFN 誘導因子や炎症性サイトカインの発現レベルが顕著であった。それに対し、上皮系細胞である MDBK 細胞においては小胞体ストレス関連因子の発現が特徴的である一方、IFN 応答は BFM と比較して遥かに弱いレベルであった。更に、免疫制御、アポトーシス、代謝、MAP キナーゼや転写因子等の mRNA についても、両細胞間において異なるパターンの発現誘導が見られ、細胞タイプ毎に異なる機序で細胞病原性が誘導されていることが示された。

第六章： BVDV NS3 によるスフィンゴシンキナーゼ活性抑制は細胞病原性と複製の増強に関与する

BVDV の NS3 タンパク発現は cp 株でのみ顕著に認められるが、NS3 の細胞内における宿主因子との相互作用については未だ知られていない。そこで、酵母 2 ハイブリッド法を用いてスクリーニングを行い、NS3 と結合する因子としてスフィンゴシンキナーゼ 1 (SphK1) を同定した。NS3 は SphK1 の酵素活性を著しく抑制することが示され、また SphK1 活性の抑制はウイルス複製を増強することが認められた。更に SphK1 の過剰発現によってアポトーシス誘導が弱まったことから、NS3 による SphK1 活性制御はウイルス複製に寄与するのみならず、細胞病原性発現にも深く関与していると考えられた。しかしなが

ら、非開裂の NS2-3 も同様に SphK1 に結合、抑制することから、ncp 株によっても同様に SphK1 活性が制御されていると考えられた。

本研究において、BVDV 感染により誘導されるアポトーシスやストレス経路等の細胞シグナル伝達その他、ウイルスタンパクによる直接的な宿主タンパクの機能制御メカニズムを明らかとした。近縁の HCV 感染によっても同様なストレスが引き起こされることが多数報告されているが、いずれの場合においても引き金となる因子については不明のままである。細胞へのストレスは細胞傷害を伴うことから病態形成への関与が強く示唆されており、これらの現象に繋がるウイルス-宿主間相互作用を見出すことは、普遍的な病態形成メカニズムの理解へと繋がると考えられる。これまでに宿主因子制御機構が半明しているウイルス因子は N^{pro} や E^{ms} に限られるが、これら 2 因子による IFN シグナル制御のみでは BVDV の持続感染成立を説明できないことが既に示されている。今後、他のウイルスタンパクについても宿主との相互作用を解明していくことが必須であると言える。BVDV は生涯を通じて持続感染する特異な性質を持つことから、未だ知られていない多様な先天性免疫制御機構を備えていると考えられる。これまでの研究は IFN 経路を中心とした流れであったが、持続感染をしない A 型肝炎ウイルスにおいても HCV や BVDV と同様に IFN 経路の遮断機構を備えていることが最近見出されている。このことから、IFN 経路の制御は持続感染に不可欠であるというよりむしろ、ウイルスが宿主内で複製を行うために最低限必要な機能なのかもしれない。今後は、未だ多くの機能が不明な BVDV の分子間相互作用を解析することにより、新たな持続感染メカニズムを追究することで、BVDV に限らず多くのウイルスに普遍的に通じる持続感染戦略の発見へと繋がることに期待したい。