

岡本 健太 論文内容の要旨

主 論 文

DEN2 16681 strain utilizes specific glycochain of Syndecan-2 proteoglycan as a receptor

デング 2 型ウイルス 16681 株は、Syndecan-2 の特異的糖鎖をウイルス受容体として用いる。

Kenta Okamoto, Hitomi Kinoshita, Maria del Carmen Parquet,
Muhareva Raekiansyah, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui,
Mohammed Alimul Islam, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita

岡本健太、木下一美、Maria del Carmen Parquet、Muhareva Raekiansyah、木村大輔、
由井克之、Mohammed Alimul Islam、長谷部太、森田公一

Journal of General Virology
(2012 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】

蚊媒介性病原性ウイルスであるデングウイルス (DENV) は、その流行域の拡大傾向や重篤な出血熱の原因となることから熱帯地域では深刻な公衆衛生上の問題となっている。DENV はさまざまなヒト由来の細胞に感受性があることが知られている。このような感受性細胞は、患者体内における DENV の増殖や伝播、また病原性発現に関与すると考えられる。しかし、DENV 受容体は C 型レクチンである DC-SIGN 分子やヘパラン硫酸などのさまざまな因子が知られているが、まだ未同定のウイルス受容体も多く存在すると考えられており、DENV 感受性細胞の多様性および DENV 感染機構と病原性発現機序の詳細な解明のため新規ウイルス受容体の解明が必要である。本研究では、*in vitro* や *in vivo* でしばしば研究に用いられる、デング 2 型ウイルス (DEN2) 16681 株を用いて、DENV 感染機構の解明を目的として研究を実施した。

【対象と方法】

DEN2 16681 株に低い感受性を示す、ヒト前骨髄性白血病細胞 K562-rcb0027 細胞

(RIKEN, BioResource Center)を限界希釈法を用いて、DENV に高感受性の 5 系統のクローン化 K562 細胞を樹立した (K562-clone1~5)。また、Syndecan-2 (SDC2)の安定発現 K562rcb0027 細胞 (K562-rcb0027/SDC2-WT)、および SDC2 の部位特異的糖鎖ノックアウト細胞 (K562-rcb0027/SDC2-S41 HS (-), K562-rcb0027/SDC2-S53/S55/S57 HS (-))を樹立した。各種細胞に対する DENV の結合性・感受性はフローサイトメトリー法を用いて解析した。DENV 高感受性・高結合性を示した K562-clone3 細胞のウイルス受容体の探索には、K562-rcb0027 細胞と K562-clone3 細胞を、マイクロアレイ法による細胞膜タンパク質の比較ゲノミクス法により解析した。個々の受容体遺伝子候補は siRNA (invitrogen) によるノックダウンにより、DEN2 の感受性の変化を解析した。DEN2 16681 株のヘパラン硫酸特異性は、K562-clone3 細胞に各種ヘパラン分解酵素 (IBEX Technology Inc., Heparinase I, Heparinase III)を処理することにより解析した。SDC2 感受性の DENV 株特異性の解析には、フィリピン・タイ・バングラデッシュ・ベトナムの臨床分離株を含む、23 株の DENV を使用した。

【結 果】

- 1) DEN2 16681 株の感受性が亢進した 5 つのクローン化 K562 細胞のうち、K562-clone3 細胞において、感染性・結合性が最大であった。
- 2) 比較ゲノミクス解析の結果、11 種類の細胞膜タンパク質が K562-clone3 細胞にのみ顕著に強く発現していた。これら遺伝子を、それぞれ抑制した結果、SDC2 遺伝子を抑制したときのみ、DEN2 16681 株の結合性・感染性が顕著に減少した。
- 3) K562-rcb0027/SDC2-WT 細胞は、K562-rcb0027 細胞に比べ、DEN2 16681 株の結合性・感染性が増加した。
- 4) K562-clone3 細胞は、Heparinase III で処理したときのみ特異的に DENV 結合性が消失した。また、SDC2 の Ser41 に修飾されるヘパラン硫酸糖のみを特異的に消失した細胞 (K562-rcb0027/SDC2-S41 HS (-))は、DENV 感受性が減少した。
- 5) 23 株の DENV のうち、DEN2 16681 株、NGB 株が、SDC2 ノックイン細胞 (K562-rcb0027/SDC2-WT)への高い結合性・感染性を示した。

【結論と考察】

ヘパラン硫酸は DENV 受容体として報告されてきた。しかし、数多く存在するヘパラン硫酸結合性プロテオグリカンが存在するなかで、はじめて SDC2 を DENV の特異的受容体として同定した。さらに、このヘパラン硫酸を介した DENV の感染機構は非常に限定された位置に修飾された糖鎖構造を認識していると結論づけた。また、SDC2 に対する感受性は、DENV 株特異的であり、広く研究に利用されている DEN2 16681 株は、SDC2 高感受性 DENV であると結論づけた。SDC2 は血管内皮細胞や肝細胞などに発現しており、SDC2 を介した感染は DENV 感染の病態に影響すると考えられる。今後は、これらの SDC2 高感受性 DENV が患者の血清にどの程度存在し、患者の病態に関与しているか解析していく必要がある。