

内田玲麻 論文内容の要旨

主 論 文

The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response.

(Double stranded-RNA concealing によるデングウイルスの I 型 IFN 誘導回避機構)

内田 玲麻、Lyre Anni Espada-Murao、高松 由基、岡本 健太、早坂 大輔、
余 福勲、鍋島 武、Corazon C. Buerano、森田 公一

(Scientific Reports 2014 年 12 月 10 日掲載予定)

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】

デング熱/デング出血熱はフラビウイルス科、デングウイルス (DENV) による急性の熱性感染症である。患者は軽度な発熱症状の場合でも高いウイルス血症を示し、自然界においてウイルスはヒト-カの感染環により維持される。一方、デングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス (JEV) のヒト感染ではウイルス血症は極めて低く、感染環において、ヒトは終末宿主である。フラビウイルス感染の自然免疫応答においては、ウイルスの産生する二本鎖 RNA (dsRNA) が、RIG-I, MDA5 といった細胞質内パターン認識受容体 (PRRs) により認識され I 型 IFN 誘導を引き起こす。近年、フラビウイルス属のダニ媒介性脳炎ウイルスおよび JEV において、ウイルスの産生する dsRNA が細胞内の小胞構造中に保持されることで、PRRs による認識を回避し、I 型 IFN の誘導を遅延させる事が報告されてきた (Overby, A. K. *et al.*, 2010 and Espada-Murao, L. A. & Morita, K., 2011)。本研究は DENV が他のフラビウイルスに比べヒトで高い増殖性を示す要因を明らかにするため、ヒト培養細胞を用いた実験系により I 型 IFN 誘導特異性とウイルス由来 dsRNA の細胞内局在に焦点をあて解析した。

【対象と方法】

DENV2 16681 株および JEV JaOArS982 株を用い、ヒト培養細胞 (HeLa cells) におけるウイルス感染の拡大をフォーカス形成試験により評価した。また、両ウイルス感染に対する I 型 IFN の影響を明らかにするため、ヒト組み換え IFN- β または抗 IFN- α/β 抗体存在下でのフォーカス形成を検証した。さらに、細胞内のウイルス RNA 量、宿主 IFN- β mRNA 量を経時的にリアルタイム RT-PCR 法により定量した。ウイルスが産生する dsRNA の IFN- β 誘導能を評価するため、感染細胞よりフェノール・クロロホルム法によりウイルス由来 dsRNA を抽出し、HeLa 細胞にトランスフェクション後、

IFN- β mRNA を定量した。細胞内における dsRNA 局在を明らかにするため、二種類の異なる界面活性剤（1%NP-40 および 0.5mM Digitonin）により選択的に細胞膜を透過処理し、抗 dsRNA 抗体を用いた免疫蛍光染色法により感染細胞の観察を行った。

【結 果】

1. フォーカス形成は、DENV では感染 6 日後まで継続的に拡大したのに対し、JEV では感染 4 日後まで一旦拡大し、6 日後には消失、感染の収束を見た。
2. ヒト組み換え IFN- β により、DENV、JEV ともにフォーカス形成が抑制され、IFN- β に対する同等の感受性が確認された。
3. 抗 IFN- α/β 抗体投与により DENV 感染では、フォーカス形成の増強は見られなかったが、JEV 感染ではフォーカス数、サイズの増大が見られた。
4. DENV では感染 48 時間後まで細胞内ウイルス RNA が増加(1.66×10^8 copies/1 μ g of total RNA)したが、IFN- β はほとんど誘導されなかった。JEV では感染 24 時間後までウイルス RNA は増加し (5.01×10^8 copies)、高い IFN- β 誘導が見られた。
5. 両ウイルスにおいて、感染細胞から精製した dsRNA の IFN- β 誘導能は同等であった。この IFN- β 誘導は dsRNA 分解酵素である RNase III の前処理により消失した。
6. 免疫蛍光染色時、1%NP-40 で透過処理した細胞では DENV、JEV ともに感染 36 時間後、約 80%の細胞で細胞内に dsRNA が認められた。
7. 一方、0.5mM Digitonin で細胞膜のみを透過処理した場合には、DENV は感染 72 時間後までほとんど dsRNA が観察されなかったのに対し、JEV では感染 24 時間後以降、細胞質への dsRNA の露出が観察された。

【考 察】

ヒト細胞における DENV 感染では I 型 IFN が誘導されない、もしくは非常に誘導が弱いため、感染フォーカスは持続的に拡大したが、JEV 感染では感染早期に I 型 IFN が誘導され感染が収束したと考えられた。DENV、JEV ともに感染後、高いウイルス RNA 合成がみられ、感染細胞から精製した dsRNA は同等の I 型 IFN 誘導能を示したことから、両ウイルスの I 型 IFN 誘導能の相違は dsRNA の量的、質的差に依るものではないと結論された。細胞内 dsRNA の免疫蛍光染色で、JEV は感染早期に dsRNA が細胞質に露出するのに対し、DENV では感染 72 時間後でも、細胞質内に露出する dsRNA はほとんど確認されなかったことから、DENV は、dsRNA を細胞内小胞構造中に長時間保持することで、PRRs による検出を回避し I 型 IFN 誘導を遅らせ、ヒト細胞での効率的な増殖能を獲得していると結論した。

これまでに DENV の非構造蛋白質、NS2B-3 が I 型 IFN 誘導経路を抑制することや、NS4B が IFN 誘導後の JAK-STAT 経路を抑制することで細胞の自然免疫系を回避するメカニズム (Yu, C. Y. *et al.* 2012 and Munoz-Jordan, J. L. *et al.* 2003) が報告されているが、本研究結果では DENV の新たな免疫回避機構として、dsRNA concealing が存在する事を示した。今後、この回避機構に関わる宿主因子の探索等を通して、DENV のヒト感染特異性の分子基盤の解明が期待される。