

鳥インフルエンザウイルスの哺乳類適応を規定する細胞種特異的な自然免疫抑制機構

亀山 響子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：川口 敦史 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

A 型インフルエンザウイルスはウイルス粒子表面に存在する 2 種類のタンパク質、ヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の血清型によって 140 以上の亜型に分類され、全ての亜型は自然宿主であるカモで単離される。一方、季節性インフルエンザとしてヒト間で流行するのは H1N1、H1N2、H3N2 といった一部の亜型のみであり、これら以外の亜型がヒトに伝播した場合、新型インフルエンザウイルスとして大流行を引き起こす恐れがある。しかし、鳥インフルエンザウイルスが宿主域を越えヒトを含む哺乳動物に適応する分子機構は不明である。本研究では、A 型インフルエンザウイルスの哺乳類適応を規定する分子メカニズムを解明することを目的とする。特に、鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物への適応を規定する要因として宿主の自然免疫応答に着目し、免疫細胞であるマクロファージ及び非免疫細胞として 3T3 細胞 (マウス繊維芽細胞由来) でのウイルス感染時の *IFN-β* 転写量を測定した。

【材料と方法】

1. ウイルス株

1997年にH5N1亜型鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染事例で単離された、A/Hong Kong/483/97 (以下 HK483 と略記) と A/Hong Kong/486/97 (以下 HK486 と略記) を用いた。これらの鳥インフルエンザウイルス株は、アミノ酸配列の相同性が非常に高いが、HK483 は哺乳動物でよく増殖するのにに対し、HK486 は哺乳動物に適応しておらず、その増殖性は低い。

2. マウス腹腔マクロファージの採取

マウス (11 週令) に 4.05%チオグリコレート溶液を 2 ml 腹腔内投与し、投与から 3 日後に腹腔浸出液を回収した。回収した浸出液をディッシュに播種し、底面に接着した細胞を腹腔マクロファージとして実験に用いた。

3. ウイルス感染細胞における *IFN-β* 転写量の解析

3T3 細胞 (マウス繊維芽細胞由来)、及びマウス腹腔マクロファージに各ウイルスを MOI (多重感染度) =3 または 5 で感染させ、感染から 2、5、8 時間後に細胞を回収した。回収した細胞から AGPC 法によって RNA を抽出し、Oligo (dT)₂₀ プライマーを用いた逆転写反応後、リアルタイム PCR 法により *IFN-β* mRNA の転写量を検出した。

【結果と考察】

リアルタイム PCR の結果、3T3 細胞では、HK483 及び HK486 が感染しても *IFN-β* の発現は観察されなかった。よって、インフルエンザウイルスは非免疫細胞では自然免疫応答の抑制能をもつことが示唆された。一方、マクロファージでは HK486 感染によって顕著に *IFN-β* mRNA が誘導されるのに対し、HK483 感染では 3T3 細胞と同様に *IFN-β* 応答が抑制されていた。従って、HK483 はマクロファージでの *IFN-β* 産生抑制能を獲得したことにより、哺乳動物での効率的な増殖が可能になったと推測される。

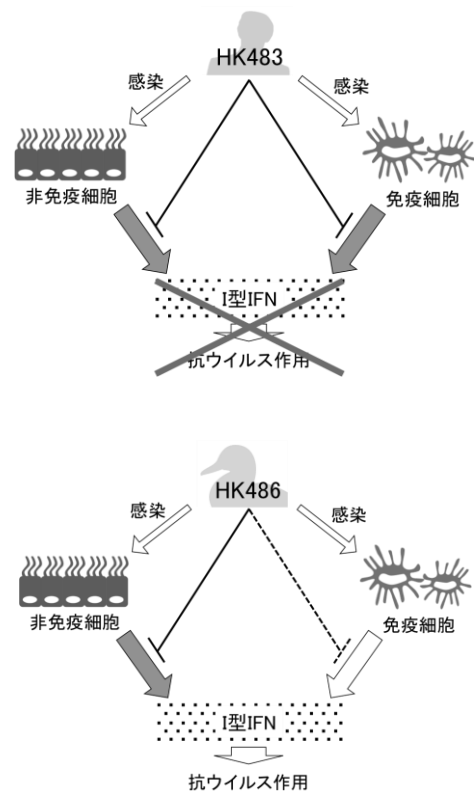


図 1. HK486 はマクロファージでの *IFN-β* 産生を抑制できない

次に、マクロファージでの *IFN-β* 産生を抑制するウイルス遺伝子を同定するため、HK486 に HK483 のウイルス遺伝子を 1 つずつ置換したキメラウイルスを用いて、ウイルス感染にตอบสนองした *IFN-β* mRNA 量を検出した。その結果、単独のウイルス遺伝子置換では、マクロファージにおける *IFN-β* 産生抑制能をもつ変異株は得られなかった。このことより、マクロファージでの *IFN-β* 産生抑制には HK483 由来の複数のウイルス遺伝子が必要であることが示唆される。現在は、複数のウイルス遺伝子を置換したキメラウイルスを作製し、責任遺伝子を探索中である。