

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 Ronald Tarigan

論 文 題 目

The innate immune response against RNA viruses in bat cell lines

(コウモリ細胞株における RNA ウイルスに対する自然免疫応答)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 本道 栄一

委 員 名古屋大学教授 西島 謙一

委 員 名古屋大学教授 山本 直之

委 員 名古屋大学助教 飯田 敦夫

委 員 名古屋大学助教 大谷 仁志

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

コウモリ由来のウイルス感染症が世界的な問題になっている。エボラ出血熱、マールブルグ病、ヘニパウイルス感染症、SARS, MARS, 狂犬病およびその関連感染症が特に深刻であるが、2013年のデータでは、人獣共通感染症となる61種のウイルスをコウモリが保有しているとされている。現在、猛威を振るっている新型コロナウイルスの自然宿主もコウモリが疑われている。

コウモリの問題点は、自身では発症せず、広い範囲に病原体を飛散させることであるが、なぜ自身では発症しないのかについては不明である。

本学位論文申請者は、この点に興味を持ち、特にコウモリの自然免疫反応に注目して研究を行った。コウモリは、哺乳類全体の約1/4を占める種数が報告されているため、複数種のコウモリでの自然免疫反応の違いを知る必要があり、この点についても検討を加えた。哺乳類の初期免疫反応は、パターン認識受容体を介して行われるため、申請者は、ウイルス感染後の本遺伝子群の発現と動物種差について明らかにしようとした。使用したウイルスは、コウモリ由来人獣感染症ウイルスとして知られる日本脳炎ウイルス(JEV)、コウモリオルソレオウイルス(PRV)、脳心筋炎ウイルス(EMCV)である。JEVはヒトに脳炎を引き起こし、PRVおよびEMCVはヒトでインフルエンザ様症状を示す。

コウモリ類は、古くから大翼手亜目と小翼手亜目に分けられており、申請者は前者のルーセットオオコウモリ(DMKT1)、ヤエヤマオオコウモリ(FBKT1)、後者のキクガシラコウモリ(BKT1)、ユビナガコウモリ(YUBMKT1)の細胞株を材料として用いた。比較の対照として、ヒト由来HEK293細胞株、ハムスター由来BHK-21細胞株を用いた。研究開始当初、それぞれの細胞がどの組織由来のものが不明だったため、様々な細胞マーカーを使って、すべての細胞が腎尿細管上皮細胞であることを明らかにした。ここに至り、すべての細胞がウイルス感染後の免疫応答の比較対象として利用可能であることを示した。

申請者は、それぞれの細胞にJEV、PRV、EMCVのそれぞれのウイルスを添加し(MOI=1.0)、その細胞変性効果を観察した。JEVとEMCVに関してはヒト、ハムスターおよびヤエヤマオオコウモリの細胞がそれぞれ感染後2日、1日で細胞変性効果が認められた(細胞死)一方、キクガシラコウモリ、ルーセットオオコウモリ、ユビナガコウモリではJEVで7日、キクガシラコウモリではEMCVで4日、ルーセットオオコウモリおよびユビナガコウモリではEMCVで7日と、生存時間の延長が認められた。それと対応して、細胞変性効果が速く出現する細胞ほど複製されるウイルス量は多くなっていた。すなわち、それぞれのウイルスに対し、ヤエヤマオオコウモリを除くすべてのコウモリで耐性があることが示唆された。

次に、それぞれのウイルス感染後の自然免疫応答について、パターン認識受容体およびインターフェロンの発現量の変化を調べた。これまで、コウモリ細胞に対して実

論文審査の結果の要旨

際のウイルスを感染させた後の自然免疫応答を検討した研究がほとんどなく、新しい研究であると位置づけられた。パターン認識受容体については、TLR3, RIG-1, MDA5、インターフェロンについては IFNbeta, lambda その他炎症性サイトカインとして TNFalpha に着目したが、研究開始時点で、今回用いた 4 種のコウモリにおいてすべての遺伝子配列が不明だったため、クローニングを行い（一部サブクローニング）塩基配列の決定を行った。続いて、それぞれの基底レベルの mRNA 発現量を測定した。その後、各分子 mRNA の発現量を qPCR にて測定した。結果、RIG-1 の発現は、BKT1 細胞で EMCV および PRV 感染後に著しく上昇し、CEMKT1 細胞では EMCV 感染、YUBFKT1 細胞では JEV および PRV 感染後に著しく上昇した。一方、ヒトおよびハムスターの細胞株では、基底レベルの RIG-1 mRNA 量が少ないだけでなく、ウイルスによる応答が著しく低かった。MDA5 については、すべての細胞で基底レベルの mRNA 量が少なかったが、EMCV 感染後の DMKT1 細胞で、また PRV 感染後の YUBKT1 細胞で 10 倍以上に上昇した。TLR3 については、コウモリ細胞における基底レベルの mRNA 量が、ヒトやハムスターに比べて非常に高かったが、それぞれのウイルスによる mRNA の上昇率は大きく変わっていなかった。INFbeta および lambda 応答性は、INFbeta では、BKT1, DMKT1 および YUBFKT1 細胞でヒト細胞に比べて高かったものの INFlambda では大きくは変わらなかった。特筆すべきは、ヤエヤマオオコウモリでのウイルス応答性が、ヒトとハムスターの細胞に非常に類似していたことである。ヤエヤマオオコウモリが属する Pteropus 属は、ヒトに致死性を示すニパウイルス、ヘンドラウイルス、オーストラリアコウモリリッサウイルスの自然宿主となっており、ヒトとの自然免疫応答性に違いがみられると予想されたが、他のコウモリ細胞株の方が敏感に応答した。TNFalpha mRNA の著しい上昇はヒトの細胞でのみ認められた。EMCV 感染に対しての応答が顕著だった。ヒトが EMCV や PRV に感染してインフルエンザ様症状を強く示すのは、TNFalpha に原因があるかもしれないと申請者は指摘した。

最後に、BKT1 細胞を用いて、それぞれのパターン認識受容体に対して s-oligoDNA を用いた遺伝子ノックダウンを行ったところ IFNbeta mRNA の減少を伴って、各ウイルスへの細胞の感受性が上昇し、細胞変性効果が早期に出現、コウモリの持つウイルス耐性の一端は、申請者が調べた経路にあることが明らかとなった。

以上より、現在世界的に大きな問題となっているコウモリ由来感染症ウイルスに対し、コウモリ細胞の自然免疫反応の特徴の一端を申請者は明らかにした。申請者は、コウモリの免疫系のみならず生理学に関する知識、他の動物との比較における洞察力に優れており、提出の論文、口頭試問による学識を慎重に審査した結果、申請者は博士の学位に値する学識を備えていると判断した。