

| | | | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|
| 氏名(本籍) | モイ メン リン (マレーシア) | | |
| 学位の種類 | 博士(医学) | | |
| 学位記番号 | 博甲第5498号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成22年3月25日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 | | |
| 審査研究科 | 人間総合科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | Role of FcγRIIA in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection (FcγRIIA を介したデングウイルス感染における抗体依存性感染増強のメカニズムの解析) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 博士(医学) | 澁谷 彰 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 薬学博士 | 永田 恭介 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士(医学) | 伊藤 聡 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 医学博士 | 竹内 薫 |

論文の内容の要旨

(目的)

デングウイルス (DENV) は急性熱性疾患であるデング熱 (DF)、致死性疾患であるデング出血熱 (DHF)、デングショック症候群 (DSS) などの病態を示すフラビウイルスであり、DENV 1 - 4 型が存在する。DHF は再感染時に多く発生する。これは初感染時に誘導された中和能を有しない DENV 型交叉性抗体に起因する抗体依存性感染増強 (ADE) によると考えられている。ADE は DENV-IgG 複合体が FcγRIIA を介して感染することにより抗体非存在下での感染と比べて感染が増強される現象である。DHF の病態形成機序における感染増強抗体の役割を明らかにすることを最終的な目的として本研究を行った。本研究の構成は下記の通りである。

- (1) ADE における FcγRIIA のシグナリングシステムの役割の検討
- (2) FcγRIIA 恒常発現 BHK 細胞を確立し、本細胞を用いて ADE assays の確立
- (3) FcγRIIA 発現細胞を用いた DENV 中和抗体の測定。

(方法)

- (1) FcγRIIA の膜領域、細胞内領域のシグナル伝達に関与する部位に欠損変異体および点変異体を導入した。各 FcγRIIA 変異体を COS-7 細胞に導入し、その発現をウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法、抗原抗体蛍光染色法 (FA) にて確認した。また各 FcγRIIA 変異体発現細胞における DENV の ADE 発生を FA 及びフローサイトメトリー法 (FACS) にて検討した。さらに各 FcγRIIA 変異体におけるキャッピングを FA にて検討した。また FcγRIIA 各変異体における貪食能を FA 及び FACS にて定量した。
- (2) FcγRIIA を恒常発現する BHK 細胞を樹立し、プラーク法にて ADE 活性を検討した。
- (3) 本細胞を用いてプラーク法にて初感染および再感染患者血清における患者血清中の中和能を調べた。

(結果)

- (1) 各 FcγRIIA 変異体の COS-7 細胞における発現率は 50% 以上であった。次に各 FcγRIIA 変異体における

DENV の ADE 発生を観察したところ野生型 Fc γ RIIA および ITAM を有する欠損変異体導入細胞では ADE、細胞表面 Fc γ RIIA のキャッピング及びファゴサイトシスが観察された。しかしながら ITAM 領域の欠損変異体及び点変異体では ADE、キャッピング及びファゴサイトシスが観察されなかった。また Fc γ RIIA パルミトイル化に関与するアミノ酸に変異を導入した点変異体においても ADE、キャッピング及びファゴサイトシスが観察されなかった。

- (2) DENV-2 のウイルス価をブランク法にて測定したところ、BHK-Fc γ RIIA 細胞を用いた抗フラビウイルス抗体 (mAb-4G2) 条件下での DENV-2 ウイルス価は mAb-4G2 を加えない場合と比較して高値で、DENV-2 の mAb-4G2 による ADE が観察された。しかしながら BHK 細胞ではこの現象は観察されなかった。同様の現象は抗 DENV-IgG 陽性患者血清でも観察されたが抗 DENV-IgG 陰性期の患者血清では観察されなかった。
- (3) モノクローナル抗体の中和抗体価を検討したところ、BHK-Fc γ RIIA 細胞を用いた中和抗体価は野生株 BHK 細胞を用いた場合に比べ低値であった。さらに、BHK-Fc γ RIIA 細胞を用いて測定した抗 DENV-IgG 陽性患者血清の抗体価は BHK 細胞を用いて測定した抗体価に比べ、低値であった。

(考察)

- (1) 以上の結果により、COS-7 細胞では Fc γ RIIA を介するシグナリングシステムは ADE の機序において重要であることが明らかとなった。DENV の ADE 発生機序においては DENV - 抗 DENV-IgG 抗体複合体が Fc γ RIIA と相互作用するだけでなく、相互作用により誘導される Fc γ RIIA を介したシグナル伝達が重要であることが示唆された。今後、Fc γ RIIA を介する DENV の細胞侵入過程により誘導された因子並びにその因子の特異的な役割について検討をしていく予定である。
- (2) 感染増強抗体は樹立した BHK-Fc γ RIIA 細胞によって測定可能であった。さらに BHK-Fc γ RIIA 細胞を用いて測定した中和活性は ADE 活性を合わせた生物活性が測定できることが明らかとなった。DENV の感染ターゲット細胞の多くが Fc γ RIIA 陽性細胞であることから、本測定法により測定した中和抗体価は生体において有意義の抗体価であることが示唆された。従って、本細胞を用いてデング出血熱発症機序における抗体の役割を解明することが可能である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、デング出血熱の発症機構における Fc γ RIIA の役割を解明した学術的に極めて価値の高いものである。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。