



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on cell tropism of hemorrhagic fever viruses and mechanisms of entry into cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	齋藤, 健
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14553号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81662
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_SAITO_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：齋藤 健

審査委員	主査 教授	澤 洋文
	副査 教授	高田 礼人
	副査 教授	木村 享史(獣医学院)
	副査 講師	松野 啓太

学位論文題名

Studies on cell tropism of hemorrhagic fever viruses and mechanisms of entry into cells

(出血熱ウイルスの細胞指向性と細胞侵入メカニズムに関する研究)

フィロウイルス科に属する Ebola virus (EBOV) と Marburg virus (MARV) およびアレナウイルス科に属する Lujo virus (LUJV) はヒトに致死率の高い出血熱をひき起こすことが知られており、Biosafety level (BSL)-4 施設で扱わなければならない病原体である。これらのウイルスの細胞侵入過程において、表面糖蛋白質 (GP) が宿主細胞の受容体に結合することが必須である。GP はウイルスのトロピズム決定に重要であるとともに、中和抗体や治療薬の標的である。また、GP と受容体の相互作用は宿主特異性を規定する因子でもある。本論文では EBOV、MARV および LUJV の GP により規定される細胞指向性と細胞侵入メカニズムに関する研究を行った。

EBOV と MARV を用いた実験は BSL-4 施設で行う必要があるため研究の障害となっており、これらのウイルスに対するワクチンや治療法開発が進まない原因の一つとなっている。第一章では BSL-2 施設で抗フィロウイルス薬のスクリーニングが可能な代替動物実験モデルの確立を試みた。まず、水疱性口炎ウイルス (VSV) の G 蛋白質遺伝子を EBOV および MARV の GP 遺伝子に置換したウイルス (rVSV/EBOV および rVSV/MARV) を作出した。rVSV/EBOV をマウス、ラットおよびハムスターに接種したところ、ハムスターでのみ顕著な体重減少が認められ、感染後 4 日以内に死亡することが分かった。rVSV/MARV も同様にハムスターに対して致死的感染を引き起こした。rVSV/EBOV および rVSV/MARV 感染ハムスターでは、全身の臓器でウイルスの増殖が認められた。病理学的解析から、野生型 VSV が肝細胞、単球、リンパ球および神経細胞といった様々な細胞に感染したのに対し、rVSV/EBOV および rVSV/MARV は肝細胞、マクロファージおよび単球系細胞といった実際の EBOV および MARV が標的とする細胞に感染する傾向があった。また、rVSV/EBOV 感染ハムスターでは血小板数減少および AST や ALP の上昇がみられ、ヒトの EBOV 感染でみられる臨床所見との類似点が認められた。以上の結果から、rVSV/EBOV と rVSV/MARV の組織特異性や

病原性には GP が強く関与していることが示唆された。次に、rVSV/EBOV 感染前後に抗 EBOV 中和抗体を投与したところ、体重減少の消失と致死率の低下が認められた。これらの結果は、このハムスターモデルは GP に作用する中和抗体や低分子化合物などの *in vivo* スクリーニングに有用であることを示している。

第二章では、LUJV に対する細胞感受性を規定する宿主因子に関する研究を行った。まず、LUJV の GP を纏ったシュードタイプウイルス (VSV Δ G-LUJV/GP) に対する細胞株の感受性を比較したところ、ヒト由来の細胞株は高感受性であったのに対し、マウス由来細胞株とハムスター由来細胞株は低感受性であることが分かった。LUJV の膜融合受容体として知られている CD63 に着目し、VSV Δ G-LUJV/GP に殆ど感受性を示さなかったハムスター由来細胞株 (BHK) に、ヒト、マウスおよびハムスターの CD63 を発現させたところ、ヒト CD63 を発現させた細胞のみ VSV Δ G-LUJV/GP に対する感受性が有意に上昇した。この結果は CD63 がヒトとげっ歯類細胞株間における LUJV に対する感受性の違いを決定している因子であることを示している。次に、ヒトおよびマウス間のキメラ CD63 を BHK 細胞に発現させ、VSV Δ G-LUJV/GP の感染性を解析することによって、LUJV 感染に重要である CD63 上の領域を探索した。その結果、ヒト CD63 の Large extracellular loop 領域が LUJV 感染に重要であることが分かった。さらに、この領域内の 141 番目から 150 番目のアミノ酸、特に 143 番目のフェニルアラニンが LUJV 感染に重要であることが示唆された。また、この 143 番目のアミノ酸は LUJV の GP による膜融合に重要であることが確認された。CD63 の 143 番目のフェニルアラニンはマウスやラットを含む一部のげっ歯類を除いた哺乳類で広く保存されていたことから、LUJV は広い宿主域をもつ可能性が示唆された。

ウイルスの表面糖蛋白質の多くは細胞侵入過程を担い、組織特異性や宿主域に関与する重要な因子である。第一章の研究で確立したフィロウイルス感染代替動物モデルは GP による組織特異性が反映されたものであり、GP に依存した病態の解析や GP を標的とした抗ウイルス薬の評価に広く利用されることが期待される。第二章の研究では、LUJV GP と CD63 の相互作用が LUJV に対する細胞の感受性を決定する因子として重要であることを示した。感染性ウイルスを用いた詳細な解析が今後期待されるが、本研究で得られた知見は抗 LUJV 薬の開発や本ウイルスの宿主域の推定・特定のための重要な情報を提供した。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者齋藤健氏の学位論文は、北海道大学大学院国際感染症学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。