



Title	Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus Induces Extracellular Ca <sup>2+</sup> Influx, Leading to Apoptosis in Avian Cells
Author(s)	上田, 真世
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54213">https://hdl.handle.net/11094/54213</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	上 田 真 世
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 23613 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学 位 論 文 名	Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus Induces Extracellular $\text{Ca}^{2+}$ Influx, Leading to Apoptosis in Avian Cells (高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスは鳥細胞においてカルシウムイオンの細胞内流入を促し、アポトーシスを誘導する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 生田 和良 (副査) 教 授 塩田 達雄 教 授 松浦 善治

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 〔 目 的 〕

高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) の強毒性決定因子としてウイルス膜タンパク質であるヘマグルチニン (HA) の易開裂性が知られている。しかし自然宿主とされる水禽類では、感染後無症状で経過するウイルス株と神経症状を呈して致命的となる株が存在することから未知の病原性規定因子の存在が伺える。

一方 HPAIV 感染病態におけるアポトーシスの重要性は未だ不明である。しかし、感染患者・家禽の感染細胞においてアポトーシスが観察されること、また感染患者の主たる病態である急性呼吸促迫症候群は肺上皮の過剰なアポトーシスが病態と関連しているとの報告からアポトーシスの重要性が鑑みられる。以上の点からアポトーシス誘導の分子メカニズムの解明、さらにはアポトーシスと病態との関連性の評価が重要と考えられる。

私たちは鳥細胞において、HPAIV 感染時顕著にアポトーシスが誘導されることに注目し、その分子メカニズムの解明を試みた。

## 〔方法ならびに成績〕

14日齢合鴨発育卵から線維芽細胞を作成し、HPAIV[A/crow/Kyoto/53/04(Cw/Kyoto:H5N1), A/chicken/Egypt/CL6/07(H5N1)]ならびに低病原性鳥インフルエンザウイルス[A/duck/HK/342/78(Dk/HK:H5N2), A/duck/HK/820/80(H5N3), A/wigeon/Osaka/1/01(H7N7), A/turkey/Wisconsin/1/66(H9N2)]の感染実験を行った結果、H5N1-HPAIV感染時、顕著な細胞死ならびにアボトーシス誘導が確認された。そこでCw/Kyoto株と対象としてDk/HK株を選択しさらなる実験を行った。両者共感染細胞におけるウイルス複製量・産生量は同等であったことからHPAIVのアボトーシス誘導はウイルス複製量に依存しないことが示された。そこでアボトーシス誘導に関与しているウイルス因子、宿主因子の探索を行った。

Reverse genetics法によって作成した組換えウイルスの感染実験において、Cw/KyotoのHA遺伝子を含んだウイルスでは顕著な細胞死ならびにアボトーシス誘導が認められたことからHA遺伝子がアボトーシス誘導に重要であることが明らかとなった。加えて、HA遺伝子の開裂部位に弱毒型のアミノ酸変異を挿入した組換えウイルスは野生株と同様の細胞死応答を呈したことより、アボトーシス誘導は開裂部位のアミノ酸配列に依存しないことが示された。

Cw/Kyoto感染細胞において、カスバーゼ活性の上昇が認められたが一方阻害剤を用いたカスバーゼ活性を抑制した細胞においても細胞死が認められた。このことからカスバーゼ依存性・非依存性の両経路共活性化していることが示唆された。アボトーシスシグナル経路の中心器官であるミトコンドリアにおいては、膜内タンパク質の細胞質への漏出及び膜電位の低下が確認され、機能不全が示唆された。ミトコンドリア機能不全の一因とされる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化に注目しCa<sup>2+</sup>指示薬を用いたところ、細胞質・ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>濃度が顕著に上昇していることが示された。細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵器官である小胞体からの流出を示唆する結果は得られなかつたため、細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入に焦点を当てた。Cw/Kyoto感染細胞に細胞外Ca<sup>2+</sup>キレート剤であるEGTAを処理すると、ウイルス複製に影響することなく、細胞質ならびにミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>濃度の低下が観察され、またアボトーシス細胞数の有意な低下が認められた。以上のことより、細胞外Ca<sup>2+</sup>の流入がアボトーシス誘導の一因であることが明らかとなつた。またEGTA処理によるアボトーシス誘導抑制はCw/Kyoto由来のHA遺伝子を持つ組換えウイルスで特異的に確認されたことから、Ca<sup>2+</sup>依存性アボトーシスにHA遺伝子が関与していることが示唆された。

## 〔総括〕

本研究の結果、HPAIVは鳥細胞において細胞外Ca<sup>2+</sup>の細胞内流入を促進させることにより、細胞質及びミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>濃度の上昇、さらにはミトコンドリアの機能不全を引き起こし、その結果カスバーゼ依存性及び非依存性にアボトーシスを誘導することが示された。またこの経路のウイルス側因子としてHA遺伝子が関与していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

高病原性鳥インフルエンザウイルス(HPAIV)感染時、患者や家禽の病変部にアボトーシスが観察されるが、未だHPAIV病態におけるアボトーシスの重要性ならびにアボトーシス誘導メカニズムには不明な点が多い。本研究ではHPAIVが感染した鳥線維芽細胞において顕著なアボトーシスが誘導されることに注目し、その誘導メカニズムを解析した。その成果として、HPAIVは感染細胞においてCa<sup>2+</sup>の細胞内流入を促し、次いで細胞質及びミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>濃度の上昇、ミトコンドリアの機能不全をもたらし、最終的にカスバーゼ依存性・非依存性両経路でアボトーシスを誘導することを明らかにした。また組換えウイルスを用いた実験からHPAIVのヘマグルチニンがこの経路に重要であることも示唆された。HPAIVにおいて新たなアボトーシス誘導機構を明らかにした功績は病態への理解を深める新たな可能性を見出した点において評価するにふさわしく、学位の授与に値すると考えられる。