

研究課題：猫コロナウイルスの抗体介在性感染増強作用に関する研究

北里大学獣医学部 宝達 勉

[研究目的]

コロナウイルスは人をはじめ様々な動物に感染し、しばしば生命にかかわる重度の呼吸器系、消化器系および神経系の疾患を引き起こす。2003年に突発した重症急性呼吸器症候群(SARS)もこのコロナウイルス感染に起因する。動物コロナウイルスのうち猫コロナウイルスは、致死性の猫伝染性腹膜炎(FIP)の原因ウイルス(FIPウイルス)であり、液性抗体の存在が感染を早める特徴を持っている。FIPV感染における抗体介在性感染増強(ADE)作用は、ウイルス抗体複合体が抗体のFc部分に対するFcレセプターを介して細胞に侵入することによって起こる。このADE作用により、本疾病のワクチン開発はより困難なものとなっている。また、FIP発症猫ではアポトーシスによるTリンパ球の減少が著しい。本研究では、このADEの発現機序を解明すると共にFIP発病機構との関連性を調べた。

[研究方法および結果]

FIPV感染におけるADE発現機構とFIP発症へのADEの関与を調べるために以下の実験を実施した。

1) ADE誘導時のマクロファージにおけるウイルス侵入機構の解明。

エンベロープを持つウイルスの細胞への侵入経路には直接細胞膜から侵入する経路とエンドソームを経由する方法が知られている。抗体と結合したFIPVが、どの経路を経由して侵入するのかをリゾソーム指向性試薬のウイルス感染への影響を指標にして調べた。

その結果、通常のウイルスレセプターを介した感染、すなわち猫株化細胞に endosomal pathway で重要なエンドソームの pH 低下を阻害する酸性化阻害薬を処理し、FIPV を感染させたところ、酸性化阻害薬濃度依存的にウイルス産生量が減少した。また、猫マクロファージにおける ADE 発現時の Fc receptor を介した感染でも同様の結果が得られた(図1)。即ち、FIPV 抗体の存在の有無にかかわらず、FIPV の細胞内侵入経路は endosomal pathway であることが明らかとなった。

2) ADE 発現におけるウイルスレセプターの関与について。

FIPV は、アミノペプチダーゼN (APN) をウイルスレセプターとして利用している。ADE 発現時におけるウイルスレセプターの関与を調べるために、APN に対する抗体を使用し、その抗体の存在が ADE 発現にどのように影響するかを調べた。

その結果、ウイルスレセプターに対する抗体を反応後に FIPV を接種した場合、その感染は完全に抑制された。しかし、ウイルスレセプターに対する抗体を反応後、ADE 活性を持つ FIPV 抗体を反応させた FIPV を接種した場合には明らかにその感染は増強された(図2)。さらに、Fcレセプター陽性でウイルスレセプター陰性の U937 細胞でも ADE 活性が誘導された。即ち、ADE 発現にウイルスレセプターは必要ないことが明らかとなった。

3) 血清型の違いと ADE 発現の関係。

FIPV には 2 種類の血清型(I 型、II 型)が存在するが、FIPV の血清型の違いが ADE 発現にどのように影響するかについて、詳細は不明であった。そこで、SPF 猫に I 型 FIPV または II 型 FIPV に対する抗体を受身免疫した後、I 型 FIPV を接種して ADE 発現の有無を調べた。その結果、I 型 FIPV に対する抗体を受身免疫した猫で ADE の発現が認められた(図3, 4, 5, 6)。即ち、FIPV では同じ血清型の再感染によって ADE が発現することが明らかとなった。

4) ADE 発現と FIP 重症化の関係。

ADE 発現によるマクロファージからの TNF- α 産生と Tリンパ球に対するアポトーシス誘導に対する影響を調べた。ADE 発現によってウイルス産生量だけでなく TNF- α 産生量も増加し、リンパ球、特に CD8 陽性 T 細胞に対して強くアポトーシスを誘導することを明らかにした(図7)。さらに、FIP 発症猫のマクロファージでは、TNF- α と共にウイルスレセプターである APN の発現量が増加していることを明らかにした。このマクロファージでの TNF- α と APN の発現増加は、ウイルスの増殖が必要であり、その発現は ADE の誘導によって高められた。FIPV 感染マクロファージの培養上清中には耐熱性の APN 誘導因子が存在し、それには TNF- α の関与が強く疑われた。そこで、マクロファージに組換え猫 TNF- α を処理し、APN 発現への影響を調べた。その結果、これらのマクロファージでは、APN の発現量が増加するとともに FIPV 感染性の増加が認められた。以上より、ADE 発現はウイルス産生量の増加だけではなく、TNF- α 産生の増加を介して APN 発現を促進し、ウイルス感受性を増強していることが明らかとなった(図7)。

[考察]

本研究で FIPV の ADE 発現に関する新たなメカニズム、即ち、1) ADE 発現においてウイルスレセプターは必要ないこと、2) FIPV 抗体の存在の有無に関わらず、FIPV はエンドゾームを介して細胞内に侵入すること、3) 同一血清型の再感染によって ADE が発現することの 3 点を明らかにした。さらに、FIPV に感染したマクロファージから FIP の病態悪化に関わる TNF- α が産生され、このアポトーシス誘導因子の産生は ADE 発現によって増強されることを示した。以上の発見は FIP の病態解明および FIP ワクチンの開発に役立つものとして高く評価される。また、TNF- α がマクロファージ表面のウイルスレセプターの発現を促し、ウイルス感染が増強されるという結果は、FIP 研究における新たな概念の提起であり、学術的に大きな価値があるものと思われる。本研究は、ADE 発現に伴う FIP 病態悪化の新たなメカニズムを解明した貴重な研究であり、今後の FIP 研究の発展を大きく高めるものと期待される。また、人の医学分野においても、デング出血熱やエボラ出血熱のように ADE を伴う致死性のウイルス感染症が存在する。従って、本研究の成果がこれらの感染症を理解するのに適した動物モデルとして応用されることが期待される。

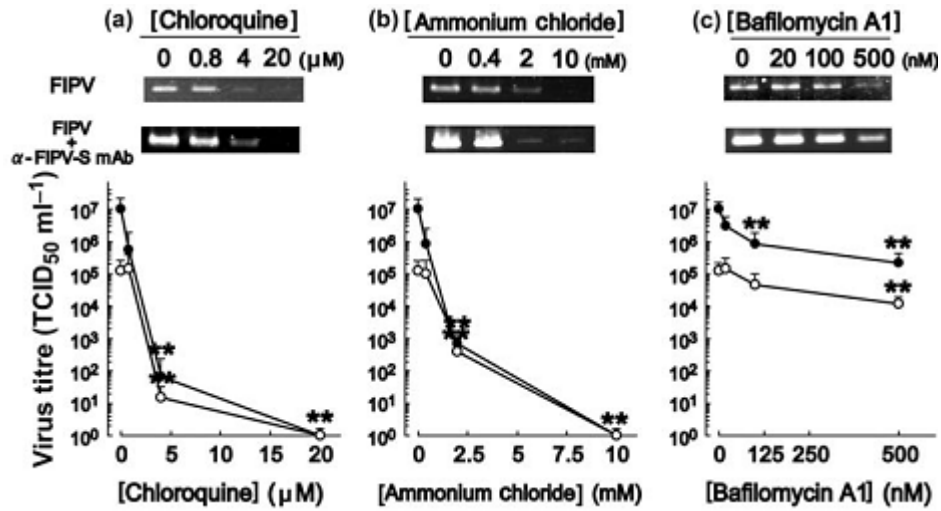


図1 肺胞マクロファージにおけるFIPV感染のADE発現に対するlysosomotropic agentsの影響。

ADE発現に伴うFIPVの肺胞マクロファージへの侵入がエンドサイトーシスによるものか否かを調べた。肺胞マクロファージにlysosomotropic agentsを加えて37°Cで1h培養した。その後、lysosomotropic agentsを加えた培養液で希釈したFIPVとα-FIPV-S MAbの反応液(●)あるいはFIPVのみ(○)を肺胞マクロファージに接種し、37°Cで1h反応した。3日後に細胞内FIPVマイナス鎖RNAまたはマクロファージ培養上清中のウイルス力価を測定した。n = 4。*: p < 0.01 v.s. lysosomotropic agentsを加えていない場合。

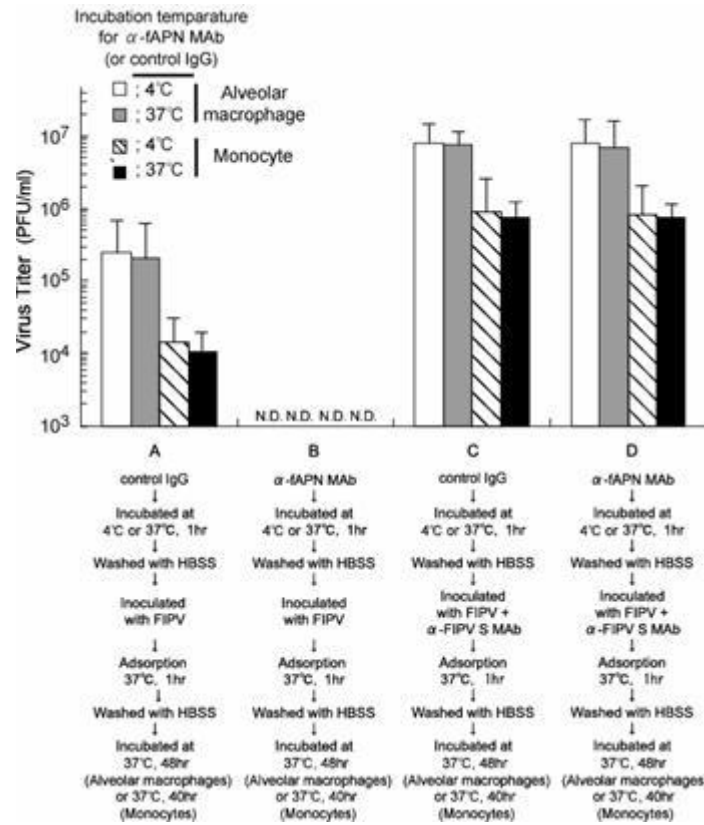


図2 猫肺胞マクロファージおよび単球での ADE 発現におけるウイルスレセプター (fAPN) の関与。

抗 fAPN 抗体である MAb R-G-4 の存在が肺胞マクロファージおよび単球における FIPV の ADE 発現を抑制するか否かについて調べた。n=3。ND; Not Detected。

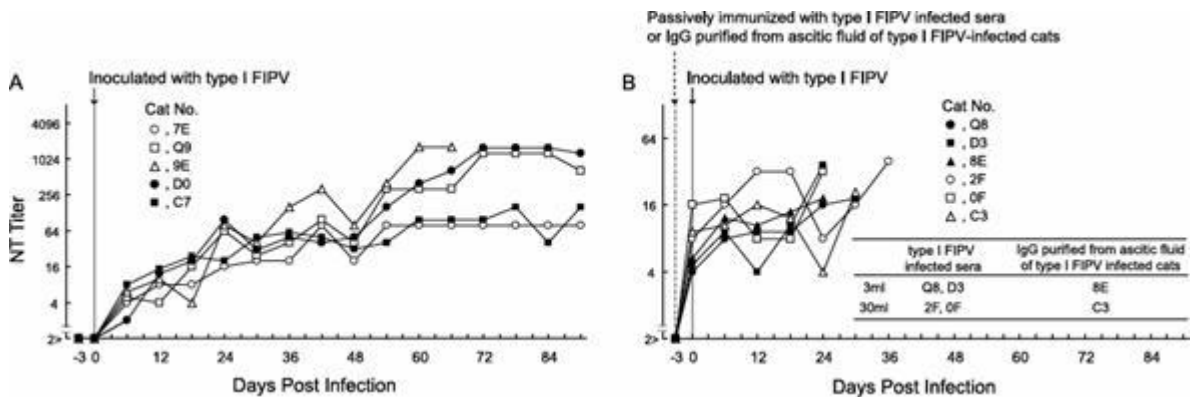


図3 I 型 FIPV 感染猫血清もしくは精製腹水 IgG を受身免疫した猫の I 型 FIPV 感染後における

I 型 FIPV に対する中和抗体価の推移。

(A) 受身免疫をせずに I 型 FIPV を接種した猫 (n=5) の中和抗体価の推移。

(B) I 型 FIPV 感染猫血清もしくは FIP 発症猫由来の腹水から精製した Ig (精製腹水 Ig) (いずれも抗体価 1:320) を受身免疫をした後に I 型 FIPV を接種した猫 (n=6) の中和抗体価の推移。

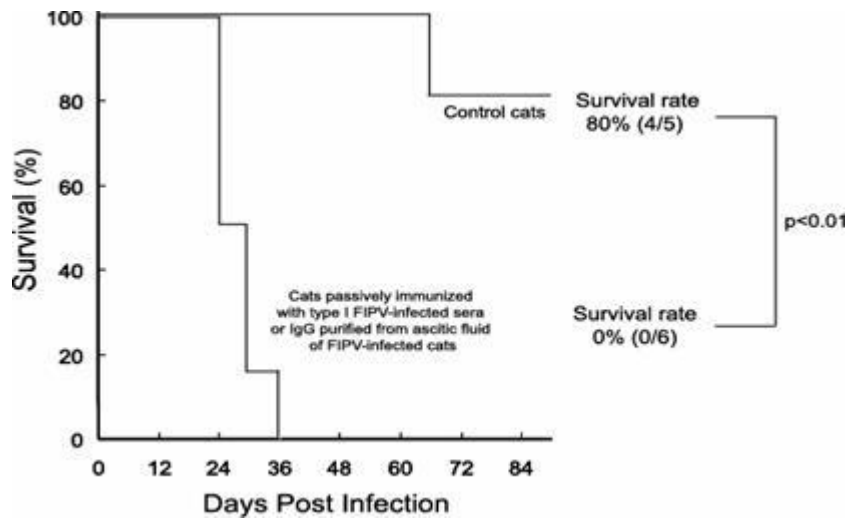


図4 I 型 FIPV 感染猫血清もしくは精製腹水 IgG を受身免疫し、I 型 FIPV を接種した場合の生存率。

I 型抗血清受身免疫群では対照群と比較して生存率が有意に低く、I 型 FIPV KU-2 株感染後の生存期間も短かった。

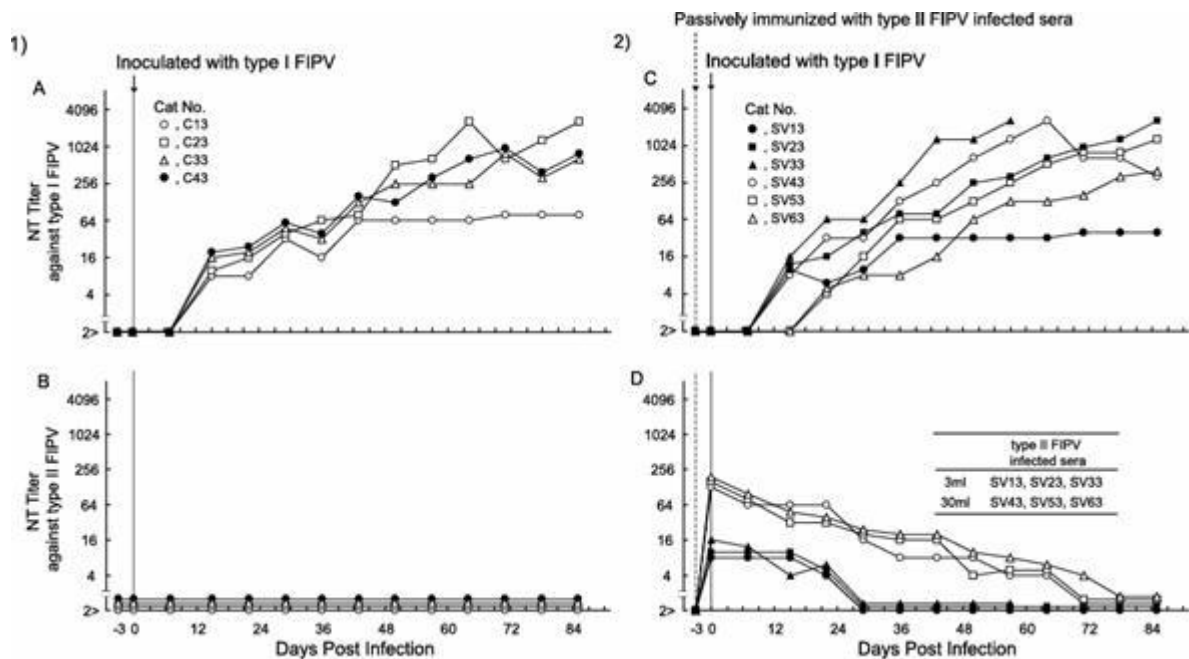


図5 II 型 FIPV 感染猫血清を受身免疫した猫の I 型 FIPV 感染後における I 型 FIPV

および II 型 FIPV に対する中和抗体価の推移。

1) 受身免疫をせずに I 型 FIPV を接種した猫 (n=4) の I 型 FIPV (A) または II 型 FIPV (B) に対する中和抗体価の推移。

2) II 型 FIPV 感染猫血清 (中和抗体価 1:6400) を受身免疫した後に I 型 FIPV を接種した猫 (n=6) の I 型 FIPV (C) または II 型 FIPV (D) に対する中和抗体価の推移。

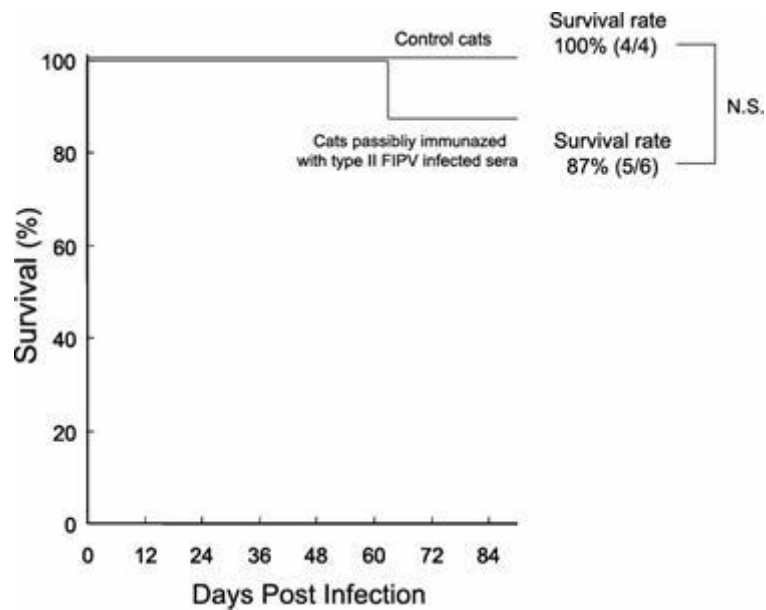


図6 II 型 FIPV 感染猫血清を受身免疫し、I 型 FIPV を接種した場合の生存率。

II 型抗血清受身免疫群と対照群の間では生存率に有意差は認められなかった。

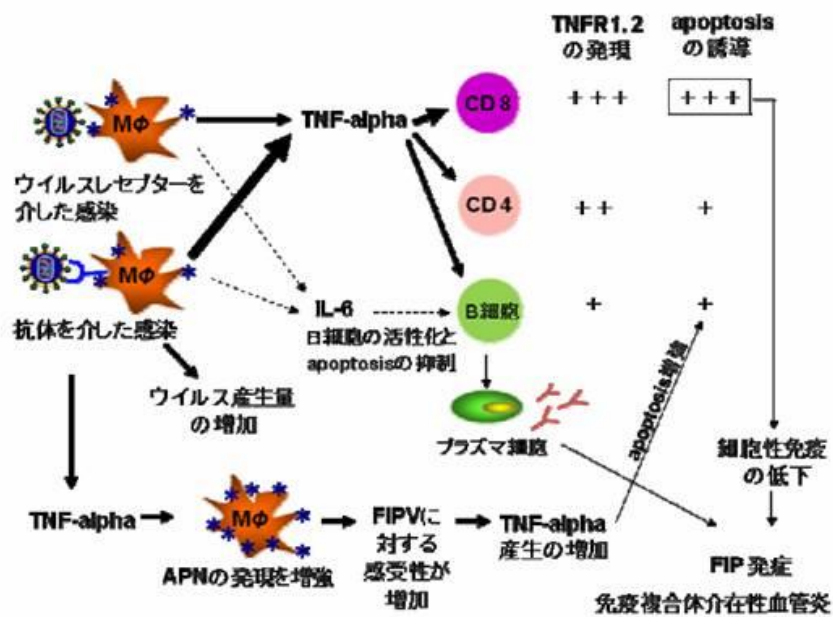


図7 抗体介在性感染増強 (ADE) 作用と FIP 重症化の関係。

FIPV に感染した猫では、液性免疫が誘導されると、ADE 発現によりマクロファージでのウイルス増殖が増加すると共に TNF- α の過剰発現を招き、その結果、1) リンパ球、特に CD8⁺細胞の apoptosis 誘導、2) マクロファージでのウイルスレセプター (APN) の発現増加によるウイルス感受性の増大を招く結果となる。この apoptosis 誘導が、ADE 発現によって増強されることおよび CD8 陽性細胞が apoptosis 誘導を受けやすいという結果は、FIP の病態形成過程における ADE 発現と細胞性免疫低下の関連性を示唆するものである。FIP の病態発生機序は複雑であり未解明な点が多い。今回の研究結果は FIP への発症過程をマクロファージでのウイルス増殖という視点から捉えたものであり、FIP の病態を理解する上で重要な発見と思われる。