

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870872

研究課題名(和文) Determination of the role of Fcγ receptor in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection

研究課題名(英文) Determination of the role of Fcγ receptor in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection

研究代表者

モイ メンリン (MOI, Meng Ling)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：40597499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Fcγ受容体(Fc_γR)のデングウイルス感染症における役割解明を目的とした。我々は、Fc_γR発現細胞(Fc_γ1, IIA, IIB, III)を樹立し、プラークアッセイ及びreal-time PCRを用いてデングウイルスの感染価を測定した。次に、monoclonal antibody及びデング熱患者血清を用いて、デングウイルスの感染増強活性(ADE)を測定した。ADE現象は、Fc_γRIIA及びIIBにおいて認められた。さらに、このFc_γR発現細胞を基盤とした新規ADEアッセイは、デングウイルス感染症の診断、及び、病態解析に有用であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research we aim to determine the role of Fcγ receptor in infection-enhancement (ADE) of dengue virus (DENV). Here, we have constructed the plasmids of Fcγ receptors (I, IIA, IIB, III), and expressed the plasmids into DENV-permissive cells to establish cell lines that stably express each of the receptors. Using these cell lines, DENV infectivity was examined using conventional plaque assay and real-time PCR assay. We then determined the ADE activity to DENV using monoclonal antibodies and patient serum samples using the Fcγ BHK cell lines. Using these monoclonal antibodies, we determined DENV infectivity in cell lines. The ADE could be detected in cell lines that express the Fcγ IIA and IIB receptor. Overall, we have established Fcγ receptor expressing cell lines that are useful in DENV diagnosis and pathogenesis studies.

研究分野：ウイルス学

キーワード：デング熱 抗体依存感染増強 Fc gamma receptor

1. 研究開始当初の背景

デング熱・デング出血熱は、近年世界の熱帯・亜熱帯地域に拡大しており、公衆衛生上で大きな問題となっている。年間、約400万人の患者が発生していると推定される。デング熱に対する特異的な治療法とワクチンが実用化されておらず、世界的においても重要な課題である。

デングウイルスは4つの血清型が存在する。感染されたウイルス血清型に対する防御免疫は終生持続する。その一方、初感染時に誘導された非中和交差抗体は、FcγR受容体(FcγR)を介し異なる血清型ウイルスの感染を増強させる活性を有する。この抗体依存性感染増強(ADE)現象は、致死性の高いデング出血熱の発症機序の一要因と考えられている。デングウイルスの体内におけるFcγRを有する細胞は、重症デング熱の病態形成に関与すると考えられている。新たな治療法開発やワクチン開発の基盤を確立するために、FcγR及び抗体複合体のデングウイルス感染症における役割について解明する必要がある。

2. 研究の目的

FcγR発現細胞(FcγR I, IIA, IIB, III)を樹立し、ブランクアッセイ及びreal-time PCRを用いてデングウイルスの感染価を測定を行う。また、monoclonal antibody及びデング熱患者血清を用いて、デングウイルスの感染増強活性(ADE)により、感染増強パターンを明らかにする。さらに、このFcγR発現細胞を基盤とした新規ADEアッセイを構築し、デングウイルス感染症の診断及び病態解析に有用であるかを検討する。本研究では、FcγRのデングウイルス感染症における役割解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) FcγR(FcγR I, IIA, IIB, III)のプラスミッドを構築し、大腸菌を用いてプラスミッドを

増幅し、DNAの精製、遺伝子の配列の同定を行った。これをLipofectamineなどにて、BHK及びVERO細胞内にプラスミッドを導入した。導入2日後にタンパク発現をFlow cytometerにて発現率を測定した。さらに、抗生物質を用いてFcγR発現細胞を選択した。

(2) FcγR発現細胞におけるデングウイルスの増殖率の解析を経時的に行った。デングウイルス(MOI=0.1, 0.01)の感染後、day1-3にて細胞上清を回収し、ウイルスRNA抽出を行った。ウイルスRNAは、real-time PCRにて力価を測定した。同時に、ブランクアッセイを用いて、ウイルスの感染価を測定した。

(3) 個々のFcγR発現細胞におけるウイルスの増殖をモノクローナル抗体及び患者血清にてADEパターンを検討した。

(4) モノクローナル抗体及びモデル動物・患者血清を用いて、ADE活性及び抗体複合体の測定を行った。

4. 研究成果

(1) FcγR発現細胞の樹立: VERO細胞においては、タンパク発現が認められなかったため、BHK細胞にて実験を行った。BHK細胞においては、高タンパク発現率(~80%)が認められたため、以降の実験はBHK細胞を用いて行った。

(2) 感染実験: FcγRを発現しているBHK細胞(FcγR I, IIA, IIB)において、デングウイルスの増殖が認められた。

(3) 感染増強活性のある検体を用いて、ある濃度においてはFcγR IIAでは感染増強が認められたが、非発現細胞では中和活性が認められた。一方、FcγR IIB発現細胞においてもADE現象が認められたが、これは単独発現による現象であるかを解析する必要がある。

(4) モデル動物及び患者血清における抗体複合体の解析

上記のアッセイにおいて認められた現

象が、モデル動物及び患者においても同様に認められる現象であるかを解析した。

サルの Dengue 熱モデルでは、モノクローナル抗体の投与により、体内に形成された抗体複合体が FcγR 発現細胞にて検出することができた (Moi et al., *Am J Trop Med Hyg.*, 2015)。同様に、患者 (日本脳炎ワクチン被接種者) 検体においても感染増強活性が認められた (Saito et al., *BMC Infect Dis*, 2016)。以上の結果により、ADE 現象は *in vivo* においても生じることが明らかとなった。さらに、本研究では FcγR 発現細胞を用いた新規 ADE アッセイは、Dengue ウイルス感染症の診断や病態解析に有用であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

Kyaw AK, Ngwe Tun MM, Moi ML, Nabeshima T, Soe KT, Thwe SM, Myint AA, Maung KTT, Aung W, Hayasaka D, Buerano CC, Thant KZ, Morita K. Clinical, virological and epidemiological characterization of dengue outbreak in Myanmar, 2015. *Epidemiol Infect*, 査読有, 2017, in press
DOI: 10.1017/S0950268817000735

Moi ML, Kobayashi D, Isawa H, Sasaki T, Saijo M, Kurane I, Sawabe K, Takasaki T. Dengue Virus Isolation in Mosquito *Aedes albopictus* Captured During an Outbreak in Tokyo, 2014, by a Method Relying on Antibody-Dependent Enhancement Mechanism Using FcγR-Expressing BHK Cells. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 査読有, 2016;16(12):810-812.
DOI: 10.1089/vbz.2016.1982

Ngwe Tun MM, Muthugala RV, Thuy NT, Ly PH, Thu LT, Dinh DT, Hoang NV, Mai LT, Moi ML, Buerano CC, Morita K, Hasebe F. Dengue-associated acute encephalitis syndrome cases in Son La Province, Vietnam in 2014. *Jpn J*

Infect Dis, 査読有, 2016, 印刷中.

DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.246

Saito Y, Moi ML, Takeshita N, Lim CK, Shiba H, Hosono K, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Japanese encephalitis vaccine-facilitated dengue virus infection-enhancement antibody in adults. *BMC Infect Dis*, 査読有, 2016;16(1):578.
DOI: 10.1186/s12879-016-1873-8

Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Human antibody response to dengue virus: implications for dengue vaccine design. *Trop Med Health*, 査読有, 2016;44:1.
DOI: 10.1186/s41182-016-0004-y

Moi ML, Honma Y, Mori S, Kuze T, Kanekawa M, Isoda T, Moriwaki N, Hosogai T, Kotaki A, Kurane I, Saijo M, Miyake S, Takasaki T. Virological confirmation of concurrent dengue virus serotypes 1 and 4 by virus isolation using Fc-gamma receptor-expressing BHK cells. *Int J Infect Dis*, 査読有, 2015;33:177-8.
DOI: 10.1016/j.ijid.2015.02.004

Moi ML, Ami Y, Shirai K, Lim CK, Suzaki Y, Saito Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Formation of infectious dengue virus-antibody immune complex *in vivo* in marmosets (*Callithrix jacchus*) after passive transfer of anti-dengue virus monoclonal antibodies and infection with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*, 査読有, 2015;92(2):370-6.
DOI: 10.4269/ajtmh.14-0455

[学会発表] (計 8 件)

Moi ML, Sutee Yoksan, Ami Y, Shirai K, Azami NAM, Saito Y, Suzaki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Common marmosets as non-human primate model for dengue vaccine development: demonstration of protective immunity after vaccination. 第 64 日本ウイルス学会学術集会、札幌コンベンションセンター (北海

道・札幌市)2016年10月23日~25日
Azami NAM, Moi ML, Ami Y, Suzaki Y, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Determination of dengue virus (DENV) serotype and genotype specific neutralizing antibodies during secondary virus infection in marmosets. 第64日本ウイルス学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)2016年10月23日~25日
Moi ML, Saito Y, Kotaki A, Tajima S, Saijo M, Kurane T. Dengue viremia and immune response in adults during the early phase of primary infection. 第11回日中ウイルス国際学会、琴弾荘(香川県・観音寺市)2016年7月1日~2日
Moi ML, Takasaki T, Azila NAM, Saijo M, Kurane I. Development of an efficient dengue virus (DENV) isolation assay using an antibody-dependent (ADE) mechanism by FcγR-expressing cells. Asia Dengue Conference. (Kuala Lumpur, Malaysia). 2016年4月23日~24日
Moi ML. Revisit of dengue protective immunity by neutralizing antibodies using FcγR-expressing BHK cells. 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). (Maryland, USA) 2016年1月11日~15日
Moi ML, Shirai K, Ami Y, Lim CK, Suzaki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus induced viremia and hemorrhagic signs in a nonhuman primate model, marmosets (*Callithrix jacchus*), during secondary infection. 第63日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)2015年11月22日~24日
Moi ML, Lim CK, Morita K, Takasaki T, Kurane I. Role of dengue antibodies in disease outcome: neutralizing antibody levels and viremia titers in the presence of

infection-enhancement antibodies. 14回あわじしま感染症・免疫フォーラム、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)2015年9月8日~11日

Moi ML, Rattanamahaphoom J, Lim CK, Sirivichayakul C, Saijo M, Sabchareon A, Takasaki T, Kurane I. Neutralizing antibody titers as a surrogate for protection against dengue: a revisit of neutralizing antibody titers of dengue virus using FcγR-expressing cells. Joint International Tropical Meeting (JITMM) (Bangkok), 2014年12月2日~4日<招待講演>

〔図書〕(計3件)

Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Detection of virus-antibody immune complexes in secondary dengue infection. in “Hemorrhagic Fever Viruses: Methods and Protocols”, Editor, Maria S Salvato, Springer, 2017, 印刷中.

Azami NA, Moi ML, Takasaki T. Neutralization Assay for Chikungunya Virus Infection: Plaque Reduction Neutralization Test. *Methods Mol Biol.* 2016;1426:273-82

Moi ML, Takasaki T. Chikungunya Virus Growth and Fluorescent Labeling: Detection of Chikungunya Virus by Immunofluorescence Assay. *Methods Mol Biol.* 2016;1426:143-52.

〔その他〕
ホームページ等
<https://sites.google.com/site/sherrymoi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

モイ メンリン (MOI, Meng Ling)
長崎大学・熱帯医学研究所・准教授
研究者番号: 40597499

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

倉根 一郎 (KURANE, Ichiro)

高崎 智彦 (TAKASAKI, Tomohiko)

森田 公一 (MORITA, Kouichi)