

学 位 論 文 要 旨

氏名 Mohammad Enamul Hoque Kayesh

題 目 : Development of *Tupaia belangeri* as an animal model for viral infections
(ツパイウイルス感染動物モデルの開発)

Summary

Suitable small animal model is an important tool for host-virus interactions and viral pathogenesis study. In this study I aimed to develop and expand the utility of tupaia (*Tupaia belangeri*) as an animal model for viral infections including dengue virus (DENV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), and avian influenza virus. Dengue is an emerging disease of great public health significance worldwide. The lack of a suitable infection model has hampered DENV pathogenesis study. Here, I checked the susceptibility of tupaia fibroblast cells to DENV infection and characterised the innate immune response upon infections. I found that tupaia cells support replication of DENV serotypes 1-4 and showed a linear increase in viral load 24-96h post-infection in both cells and culture supernatants. DENV-2 showed the highest viral growth among all serotypes. To characterize the innate immune response I established an innate immune response measurement system by assessing the mRNA expression of Toll-like receptor (TLR) 1-9 and four cytokines in DENV-infected tupaia cells. All serotypes induced the upregulation of TLR8 mRNA expression in infected tupaia cells. Silencing of TLR8 led to an increase in viral replication, indicating the existence of antiviral response through TLR8 on DENV infection. This study demonstrates for the first time the susceptibility of tupaia cells to DENV infections and the role of TLR8 in the anti-viral response of tupaia cells to DENV. These findings demonstrate the potential utility of tupaia as a model for DENV research in the future.

To expand the use of tupaia in HBV and HCV infection, I infected tupaia with different subtypes of HBV and HCV. To date, chimpanzee has been used as the natural infection model for HBV and HCV. However, this model is very costly and difficult to use because of ethical and animal welfare issues. Developing suitable small animal models for HBV and HCV have been a long-standing challenge. Here, I have conducted the study to establish the tupaia as a new animal model for HBV and HCV infection and characterized the immune response upon viral infections in each case.

In case of HBV infection, first, I compared the propagation of HBV genotypes A2 and C *in vivo* in tupaia hepatocytes. At 8–10 days post infection (dpi), the level of HBV-A2 propagation in the tupaia liver was found to be higher than that of HBV-C. Moreover, I found that HBV-A2 established chronic infection

in some tupaia. I then aimed to characterize the intrahepatic innate immune response in tupaia model. At first, I infected six tupaia with HBV-A2 (strains JP1 and JP4). At 28 dpi, intrahepatic HBV-DNA and serum hepatitis B surface antigens (HBsAg) were detected in all tupaia. The levels of interferon (IFN)- β were found to be significantly suppressed in the three tupaia infected with HBV A2_JP4, while no significant change was observed in the three infected with HBV A2_JP1. Next, I infected nine tupaia with HBV-A2 (JP1, JP2, and JP4), and characterized 31 weeks post-infection (wpi). Serum HBsAg levels were detected at 31 wpi and IFN- β was found to be significantly suppressed in all tupaia. TLR3 was not induced, except in tupaia #93 and #96. Suppression of TLR9 was observed in all tupaia, except tupaia #93. Therefore, the tupaia infection model of HBV clearly indicated the suppression of IFN- β at 31 wpi, which might have contributed to the establishment of chronic HBV infection.

HCV is a leading cause of chronic liver disease, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. To address the molecular basis of HCV pathogenesis using tupaia, I characterized host responses upon HCV infection. Adult tupaia were infected with four different HCV genotypes including 1a, 1b, 2a, or 4a. Viral RNA, alanine aminotransferase, anti-HCV core and anti-nonstructural protein NS3 antibody titres, reactive oxygen species (ROS), and anti-3 β -hydroxysterol- Δ 24reductase (DHCR24) antibody levels were measured at 2-week intervals from 0 to 41 wpi. All HCV genotypes established infections and showed intermittent HCV propagation. Moreover, all tupaia produced anti-core and anti-NS3 antibodies. ROS levels in sera and livers were significantly increased, resulting in induction of DHCR24 antibody production. Similarly, lymphocytic infiltration, disturbance of hepatic cords, and initiation of fibrosis were observed in livers from HCV-infected tupaia. Intrahepatic levels of Toll-like receptors 3, 7, and 8 were significantly increased in all HCV-infected tupaia. However, interferon- β was only significantly upregulated in HCV1a- and HCV2a-infected tupaia. Therefore, the findings of this study showed that humoral and innate immune responses to HCV infection, ROS induction, and subsequent increases in DHCR24 auto-antibody production occurred in tupaia model, providing novel insights into understanding HCV pathogenesis.

In addition, I also contributed towards developing tupaia model for pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza viruses (manuscript under revision in 'Virology'). Considering all the findings of the study, utilization of tupaia infection model in this study was an effective approach towards development of tupaia as an animal model for viral infections.

学位論文審査の結果の要旨

| | |
|--|---|
| 氏 名 | Mohammad Enamul Hoque Kayesh |
| 審 査 委 員 | 主 査：鹿児島大学 教授 小原 恭子 |
| | 副 査：山口大学 教授 前田 健 |
| | 副 査：鹿児島大学 教授 中馬 猛久 |
| | 副 査：鹿児島大学 准教授 松鶴 彩 |
| | 副 査：鹿児島大学 准教授 正谷 達磨 |
| 題 目 | Development of <i>Tupaia belangeri</i> as an animal model for viral infections (ツパイウイルス感染動物モデルの開発) |
| 審査結果の要旨： 最適な小動物モデルは宿主とウイルスの相互作用もしくはウイルス病原性を解析する研究において重要なツールである。本研究で申請者は、デング熱ウイルス(DENV), B 型肝炎ウイルス(HBV), C 型肝炎ウイルス(HCV)、鳥インフルエンザウイルスを含むウイルス感染の動物モデルをツパイ(<i>Tupaia belangeri</i>)を用いて開発した。デング熱は、世界中で大きな問題となる急性感染症である。適当な感染モデルを欠くことがデング熱病原性研究の進展を阻んでいる。 まず、ツパイの線維芽細胞の DENV に対する感染感受性と自然免疫の反応を解析した。ツパイ細胞は、DENV1~4 型に感染感受性であり、感染後 24-96 時間で直線的にウイルス量が増加した。この中で DENV-2 は最も高いウイルス増殖能を示した。自然免疫の反応は Toll-like receptor (TLR)1-9 と 4つのサイトカインの mRNA 合成の DENV 感染による変化により解析した。全ての DENV 血清型で TLR8 mRNA の発現誘導が見られた。TLR8 を siRNA でノックダウンすると、ウイルス複製が増加し、TLR8 が抗ウイルス作用を持つ事が明らかとなった。本研究は、ツパイ細胞が DENV に感染感受性を持つ事を初めて明らかにし、TLR8 が抗ウイルス作用を持つ事を示した。これらの結果は、ツパイが DENV 研究において将来的に役立つ事を示している。 次に、ツパイに HBV, HCV を感染させ、解析を行った。これまでに、HBV と HCV の自然感染モデルはチンパンジーのみである。しかしながら、今日では、チンパンジーを用いるのは動物福祉の問題等で困難である。HBV や HCV のモデルを作り上げる事は長い間の挑戦であった。そこで、本研究でツパイを HBV や HCV の新たな感染動物モデルとして樹立し、その免疫反応を解析 | |

した。

HBV の感染では、最初に HBV 遺伝子型 A2 と C についてツパイの感染感受性を検討した。8-10 日後、肝臓における HBV-A2 の増殖は HBV-C よりも高い事が明らかとなった。HBV-A2 感染後 8 日目で、肝細胞索の乱れが観察された。さらに、HBV-A2 はいくつかのツパイで慢性感染を樹立した。次にツパイの肝臓における自然免疫の反応を解析した。最初に、ツパイ 6 匹を HBV-A2(JP1 と JP2 株)で感染した。28 日後、肝臓内 HBV-DNA と血清中の HBs 抗原が全てのツパイで検出された。Interferon (IFN)- β は HBV-A2_JP4 で感染した全てのツパイで産生が抑制されていたが、HBV A2_JP1 で感染した場合は変化がなかった。次に、9 匹のツパイを HBV-A2 (JP1, JP2, JP4 株)で感染し、31 週間後(wpi)に解析を行った。全てのツパイで血清中の HBs 抗原は検出されたが、IFN- β は有意に抑制された。2 匹(#93, 96)を除く他のツパイで TLR3 が誘導されず、1 匹(#93)を除く全てのツパイで TLR9 の抑制が見られた。従って、感染後 31 週で見られる IFN- β の抑制は HBV 慢性感染の成立に貢献したと考えられた。

HCV は慢性肝炎、肝硬変、肝がんを起こす。ツパイを用いて HCV 感染に伴う宿主の反応の解析を通じ、HCV の病原性の分子基盤を解析した。成獣のツパイを HCV の 4 つの遺伝子型の 1a, 1b, 2a, 4a で感染させた。ウイルス RNA, alanine aminotransferase (ALT), 抗 HCV コア抗体と非構造蛋白質 NS3 抗体、活性酸素(ROS)、と 3 β -hydroxysterol- Δ 24reductase (DHCR24)抗体を 2 週間間隔で 41 週間測定した。全ての HCV 遺伝子型は感染を成立させ、間歇的な HCV の増殖を示した。さらに、全てのツパイがコアや NS3 の抗体を産生した。血中や肝臓の ROS 産生は有意に上昇し、DHCR24 抗体産生を誘導した。同時に肝臓にはリンパ球浸潤や肝細胞索の乱れ、肝臓の繊維化が観察された。肝臓内の TLR3, 7, 8 は HCV 感染ツパイの肝臓で有意に上昇した。しかしながら、IFN- β は HCV-1a と 2a が感染したツパイのみで上昇した。従って、本研究の結果、すなわち HCV 感染に対する液性免疫の反応や自然免疫の反応は、ROS を誘導し、その結果 DHCR24 自己抗体の産生をツパイモデルで誘導し、HCV 病原性の理解に新たな知見をもたらした。

これらに加えて、高病原性鳥インフルエンザウイルスの病原性を解析するツパイモデルの研究も行った (論文投稿中)。

以上の様に本論文は、ツパイモデルの利用はウイルス感染の動物モデルを開発するのに効果的なアプローチである事を各種ウイルス感染症に於いて世界に先駆けて示した。よって、本論文は博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいと判断された。