

研 究

MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞より分離した
インフルエンザウイルス高感受性細胞の
トランスクリプトーム解析

峯岸大輔^{1, 2)}, 田村 亨¹⁾, 堤 玲子¹⁾, 佐藤成大¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 微生物学講座: 感染症学・免疫学分野

²⁾ 東北化学薬品株式会社, 生命システム情報研究所

(Received on October 11, 2011 & Accepted on November 17, 2011)

要旨

インフルエンザワクチンの製造には, 発育鶏卵が用いられて来たが, 供給の迅速性や安定性に問題が有り, 代替法として培養細胞による製造が試みられている. 我々は, インフルエンザウイルスの培養に用いられる MDCK (Madin-Darby canine kidney) から, より高いウイルス感受性を示す TR7 を分離した. DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により, MDCK と TR7 の発現プロファイルを比較した結果,

両細胞の相違は 49 パスウェイに及び, TR7 が非接着性を獲得した事を裏付ける遺伝子に加え, 免疫系に関わる遺伝子の発現量に大きな差異が認められた. 更に, ウイルス感受性に影響を及ぼす宿主因子として, ウイルスの脱殻に必要な蛋白質分解酵素 *PLAU* 遺伝子の発現が高く, 抗ウイルス活性を持つ *MX1* 遺伝子の発現が著しく低い事が判明し, 転写レベルでの発現変動がウイルス増殖性に影響を与えている事が示唆された.

Key words : influenza virus, canine kidney cells, host-parasite interaction, microarray

I. 緒 言

インフルエンザは一般的に self-limited の疾患であり, 死亡率は 0.1% 以下である¹⁾. しかし, 妊婦, 乳幼児, 高齢者及び基礎疾患を有するハイリスク群では死亡率が高く²⁾, 予防ワクチン優先接種の対象となっている³⁾.

インフルエンザワクチン接種による一定の予防効果は広く認められているが⁴⁾, 高齢者では, ワクチン接種が入院患者数及び死亡率の低減に有効であるとの報告がなされている⁵⁾. 我が国では, 2001 年の予防接種法改正により, 65 歳以上の高齢者において, インフルエンザワクチンは定期接種に指定されている. また, 1 歳以上 6 歳未満の幼児についても, 発熱を指標とした有効率は 20-30% であるが, ワクチン接種の意義が認められている⁶⁾.

このような背景から, 毎年の流行に備え, 行政的に予防ワクチンを十分量確保する事が必要とされて来た. しかし, 2009 年から 2010 年のインフルエンザ A (H1N1) のパンデミックに際しては, 国内のワクチン供給体制は混乱し, 約 9,900 万回分のワクチンを緊急輸入するに至った^{3, 7, 8)}.

その理由の一端は, 発育鶏卵 (有精卵) を用いたワクチン製造システムにある. 2009 年に A (H1N1) <単価ワクチン>として国内で生産された約 5,400 万回分のインフルエンザワクチンは, 発育鶏卵法により製造されている³⁾. しかし, この伝統的な製造法には数千万個程度の有精卵が必要であり, また, 製品化までに 3 カ月以上の期間がかかることから, 迅速性や安定供給に問題がある事が指摘されていた. 事実, 2010 年のインフルエ

ンザ A (H1N1) パンデミックでは, 時宜を得たワクチン供給が出来ず, 海外ワクチンを緊急輸入する事態に至った³⁾.

鶏卵によるワクチン製造の問題点を克服するために, 培養細胞を用いたワクチン産生に関する研究が行われてきたが^{9, 10)}, 最近, Vero (Verda Reno) 及び MDCK (Madin-Darby canine kidney) を用いたインフルエンザワクチンが, それぞれ Baxter 社³⁾ 及び Novartis 社¹¹⁾ から供給され始めた.

我々は, 独自の方法により, インフルエンザウイルスに高い感受性を示す細胞 (TR7 と呼ぶ) を MDCK から得て¹²⁾, 効率的なワクチン産生システムの基盤技術を研究してきた. 本研究では, この TR7 が持つインフルエンザウイルスの高増殖性を決定する宿主因子を明らかにする事を目的として, MDCK と TR7 の遺伝子発現を比較検討した.

II. 研究材料及び方法

1. 細胞培養

MDCK は American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) より購入した. MDCK, TR7 とともに, 1:4 の split ratio で T25 flask (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて継代培養した. 培養液には, Eagle's MEM (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd, Taito, Tokyo, Japan) + 10% ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum) を用い, 5% CO₂, 37°C の条件下で培養した.

2. Total RNA 抽出

Confluent になった MDCK 及び TR7 からの Total RNA 抽出は, NucleoSpin® RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) を用いて, 製造元のマニュアルに従って行った. Total RNA の品質確認は, NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) による吸光度の測定と, 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies Inc.,

Santa Clara, CA, USA) によるキャピラリー電気泳動で行った.

3. 遺伝子発現解析

MDCK 及び TR7 の各種 mRNA の存在量を比較するために Canine オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent Technologies Inc.) 法による遺伝子発現解析を各細胞について, 2 回繰り返し実施した. 使用したマイクロアレイに搭載されたプローブ数は全部で 42,034 個であり, この手法により両細胞の遺伝子発現プロファイルを比較解析した. Total RNA の逆転写反応による cDNA (complementary DNA) の合成及び in vitro 転写反応による標的 cRNA (complementary RNA) の合成は, Low RNA Fluorescent Linear Amplification Kit PLUS (Agilent Technologies Inc.) を用いて, 製造元のマニュアルに従って行った. また cRNA の精製は, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて, 製造元のマニュアルに従って行った. マイクロアレイスライドへの標的 cRNA のハイブリダイゼーション及び洗浄は, Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies Inc.) 及び Gene Expression Wash Pack (Agilent Technologies Inc.) を用いて, 製造元のマニュアルに従って行った. マイクロアレイスライドへのハイブリダイゼーションは DNA Microarray Hybridization Oven (Agilent Technologies Inc.) を使用し, 画像の取り込みは DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies Inc.) を使用した. 蛍光シグナルのスキャン画像の解析には, Feature Extraction ソフトウェア Ver.9.5.3.1 (Agilent Technologies Inc.) を用いた.

4. 遺伝子発現データ解析

データの解析には, 遺伝子発現データ解析ソフトウェアの GeneSpring GX Ver.7.3 (Agilent Technologies Inc.) を用いた. 蛍光シグナル強度を数値化したデータの正規化及

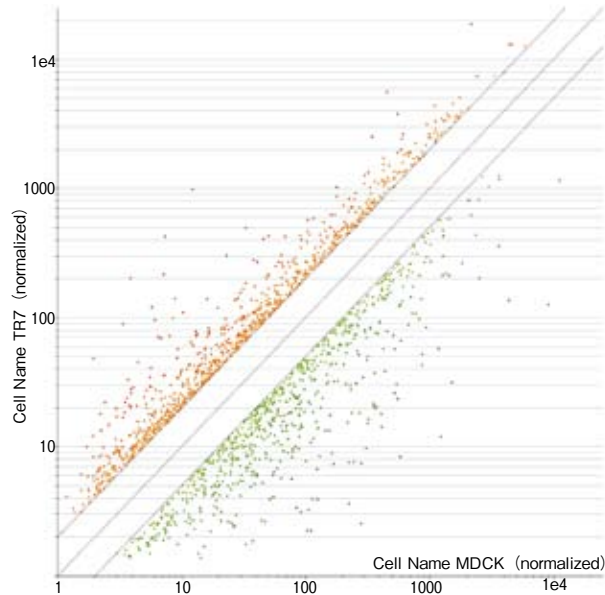


図 1. MDCK 及び TR7 の遺伝子発現強度の比較
MDCK に対して TR7 で 2 倍以上発現量が異なる遺伝子について増加したものを赤点、減少したものを緑点で示した。

びデータの品質確認を行った後、2 倍以上発現量が異なる遺伝子を選別した。

5. 遺伝子情報を用いた統計学的解析

マイクロアレイに搭載されたイヌ遺伝子の情報は、National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, USA) の Entrez Gene データベース (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/gene/DATA/>) より得た。また、イヌ遺伝子の分子間ネットワーク情報は、Kyoto University Bioinformatics Center (Uji, Kyoto, Japan) の KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) PATHWAY データベース¹³⁾ (<ftp://ftp.genome.jp/pub/kegg/pathway/organisms/cfa/>) より得た。

両細胞で発現量の異なる遺伝子(変動遺伝子)の特徴付けを行うため、上記 KEGG パスウェイ情報を用いて、フィッシャーの正確確率検定(直接確率検定)を行い、変動遺伝子中に、有意に高い頻度で出現するパスウェイ

の抽出を行った。

なお、遺伝子名の記述については NCBI Entrez Gene データベースに登録された遺伝子シンボルの表記に従った。

III. 結 果

1. 発現変動の見られた遺伝子

MDCK と TR7 の発現プロファイルを比較した結果、MDCK に対して TR7 で 2 倍以上発現量が異なる遺伝子は、1,711 遺伝子であった。その中で、発現量が増加した遺伝子は 976 個、発現量が減少した遺伝子は 735 個であった(図 1)。搭載プローブ総数 42,034 のうち有効データ数は 15,203 であったので、両細胞間で 2 倍以上発現量が異なる遺伝子は全体の 4%、解析対象遺伝子の 11.3%であった。

2. 変動遺伝子の特徴抽出

フィッシャーの正確確率検定により、発現変動遺伝子の特徴抽出を行った。その結果、

表 1. TR7 細胞において発現変動遺伝子の出現頻度が高いパスウェイ

KEGG マップ名	総遺伝子数	変動遺伝子数	p 値 (正確確率検定)
Intestinal immune network for IgA production ³⁾	71	12	3.79E-04
Asthma ³⁾	38	8	8.09E-04
p53 signaling pathway ¹⁾	77	12	8.10E-04
Bladder cancer ¹⁾	52	9	1.70E-03
Proximal tubule bicarbonate reclamation	26	6	2.23E-03
Allograft rejection ³⁾	54	9	2.23E-03
Tryptophan metabolism	56	9	2.89E-03
Antigen processing and presentation ³⁾	91	12	3.52E-03
Autoimmune thyroid disease ³⁾	58	9	3.70E-03
Focal adhesion ²⁾	275	26	3.77E-03
Viral myocarditis	94	12	4.60E-03
Graft-versus-host disease ³⁾	50	8	5.03E-03
TGF-beta signaling pathway ¹⁾	109	13	5.83E-03
Cytokine-cytokine receptor interaction ³⁾	188	19	6.26E-03
Porphyrin and chlorophyll metabolism	36	6	1.20E-02
Collecting duct acid secretion	38	6	1.55E-02
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	50	7	1.74E-02
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	41	6	2.20E-02
Type I diabetes mellitus	65	8	2.34E-02
Glycolysis / Gluconeogenesis	91	10	2.49E-02
ECM-receptor interaction ^{1) 2)}	119	12	2.73E-02
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	8	2.76E-02
ErbB signaling pathway ¹⁾	108	11	3.17E-02
Sphingolipid metabolism	45	6	3.33E-02
Cell adhesion molecules (CAMs) ²⁾	165	15	3.37E-02
Cysteine and methionine metabolism	48	6	4.39E-02
Limonene and pinene degradation	15	3	4.43E-02
Leishmania infection ³⁾	87	9	4.53E-02

フィッシャーの正確確率検定の結果を, p 値の低い順に示した. マップ名に付けた数字は, 1) 細胞増殖性, 2) 細胞接着性, 3) 外界刺激および免疫系に関連するパスウェイを示す.

全遺伝子に含まれる遺伝子の割合に対して, 発現変動遺伝子 (1,711 個) に含まれる遺伝子の割合が有意 ($p < 0.05$) に高い 28 のパスウェイ (表 1) が得られた. 同様に, 発現増加遺伝子 (976 個) について特徴抽出を行った結果, 15 のパスウェイ (表 2) に有意差が認められ, また, 発現減少遺伝子 (735 個) について特徴抽出を行った結果, 29 のパスウェイ

(表 3) に有意差が認められた.

TR7 は MDCK をプロテアーゼ存在下で培養して得られたアノキス抵抗性細胞である. この事から表 1 中に列記したもので細胞増殖性に関連するパスウェイである p53 signaling pathway, Bladder cancer, TGF-beta signaling pathway, ECM-receptor interaction, ErbB signaling pathway や, 細

表 2. TR7 細胞で発現量が増加した遺伝子の出現頻度が高いパスウェイ

KEGG マップ名	総遺伝子数	変動遺伝子数	p 値 (正確確率検定)
p53 signaling pathway ¹⁾	77	9	3.98E-04
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	7	3.38E-03
Porphyrin and chlorophyll metabolism	36	5	3.79E-03
Bladder cancer ¹⁾	52	6	4.00E-03
Cysteine and methionine metabolism	48	5	1.30E-02
Metabolic pathways	1402	54	1.69E-02
Glycine, serine and threonine metabolism	53	5	1.93E-02
Cytokine-cytokine receptor interaction ³⁾	188	11	2.27E-02
O-Glycan biosynthesis	38	4	2.47E-02
Pantothenate and CoA biosynthesis	24	3	3.24E-02
SNARE interactions in vesicular transport	44	4	3.97E-02
ErbB signaling pathway ¹⁾	108	7	3.98E-02
TGF-beta signaling pathway ¹⁾	109	7	4.15E-02
Sphingolipid metabolism	45	4	4.27E-02
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	3	4.82E-02

フィッシャーの正確確率検定の結果を、p 値の低い順に示した。マップ名に付けた数字は、1) 細胞増殖性、2) 細胞接着性、3) 外界刺激および免疫系に関連するパスウェイを示す。

胞骨格及び細胞接着性に関係するパスウェイである Focal adhesion, Cell adhesion molecules (CAMs), Vascular smooth muscle contraction, Axon guidance, Regulation of actin cytoskeleton, Gap junction において統計学的に有意水準を超えた発現の違いが認められた。

また、外界刺激、自然免疫系に関連するパスウェイ: Intestinal immune network for IgA production, Asthma, Allograft rejection, Antigen processing and presentation, Autoimmune thyroid disease, Graft-versus-host disease, Cytokine-cytokine receptor interaction, Leishmania infection, Toll-like receptor signaling pathway の発現量に大きな相違が見られた。

更に、インフルエンザウイルスの感染と増殖に関わる遺伝子及び細胞の寿命に関わると考えられるアポトーシス関連遺伝子を検索し

た結果、注目される 16 個の遺伝子に発現変動が認められた(表 4)。

まず、インフルエンザウイルス感染時に関与すると考えられているプロテアーゼ関連遺伝子群として *PLAU*, *PLAUR* の発現増加が認められるとともに、その抑制因子である *SERPINE1* の発現減少が認められた。

また、インフルエンザウイルスの増殖に関わる遺伝子に属するものとして *MX1*, *IVNS1ABP* の発現比の違いが存在した。特に、インフルエンザウイルスに抵抗性を示す蛋白質をコードする *MX1* については、16.4 倍の発現減少が認められた。

更に、感染細胞の寿命に関連する遺伝子群(アポトーシス関連遺伝子 6 個)として *IRAK3*, *PRKAR2B* の発現増加、及び、*CYCS*, *BID*, *BIRC3*, *LOC479458* の発現減少が認められた。

表 3. TR7 細胞で発現量が減少した遺伝子の出現頻度が高いパスウェイ

KEGG マップ名	総遺伝子数	変動遺伝子数	p 値 (正確確率検定)
Antigen processing and presentation ³⁾	91	12	1.36E-06
Asthma ³⁾	38	8	2.32E-06
Allograft rejection ³⁾	54	9	4.18E-06
Autoimmune thyroid disease ³⁾	58	9	7.72E-06
Graft-versus-host disease ³⁾	50	8	1.99E-05
Type I diabetes mellitus	65	8	1.39E-04
Cell adhesion molecules (CAMs) ²⁾	165	13	1.41E-04
Tryptophan metabolism	56	7	3.32E-04
Viral myocarditis	94	9	3.71E-04
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	41	6	3.75E-04
ECM-receptor interaction ^{1) 2)}	119	10	5.07E-04
Focal adhesion ²⁾	275	15	2.21E-03
Fatty acid metabolism	64	6	3.99E-03
Limonene and pinene degradation	15	3	4.90E-03
Systemic lupus erythematosus	140	9	6.04E-03
Glutathione metabolism	56	5	1.04E-02
Toll-like receptor signaling pathway ³⁾	108	7	1.43E-02
Arginine and proline metabolism	92	6	2.21E-02
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	1	1	2.38E-02
Nitrogen metabolism	27	3	2.56E-02
Butanoate metabolism	48	4	2.68E-02
Vascular smooth muscle contraction ²⁾	152	8	2.84E-02
Valine, leucine and isoleucine degradation	73	5	2.96E-02
Lysine degradation	73	5	2.96E-02
Nicotinate and nicotinamide metabolism	31	3	3.67E-02
Axon guidance ²⁾	164	8	4.17E-02
TGF-beta signaling pathway ¹⁾	109	6	4.53E-02
Regulation of actin cytoskeleton ²⁾	261	11	4.67E-02
Gap junction ²⁾	111	6	4.88E-02

フィッシャーの正確確率検定の結果を、p 値の低い順に示した。マップ名に付けた数字は、1) 細胞増殖性、2) 細胞接着性、3) 外界刺激および免疫系に関連するパスウェイを示す。

IV. 考 察

TR7 は MDCK 由来の細胞であるが、インフルエンザウイルスの増殖に関しては MDCK よりも優れている (特許出願【整理番号】 AB10009)。今回、この2つの細胞について、基本的性質の差異を遺伝子発現量の側面から比較した。遺伝子発現量の比較には定

量的 PCR 法や DNA マイクロアレイ法などが用いられるが、本研究では、後者の DNA マイクロアレイ法を用いた発現解析を行った。定量的 PCR 法は標的遺伝子を絞って発現量を比較する一方、DNA マイクロアレイ法は 40,000 種類以上の配列の異なるオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる事によ

表4. TR7 細胞で発現が変動した遺伝子 (抜粋)

遺伝子シンボル	遺伝子名	発現比 (Log ₂ ratio)
<i>MX1</i>	myxovirus (influenza virus) resistance 1 ⁴⁾	- 4.04
<i>ATP6V1B1</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1	1.46
<i>WFDC2</i>	WAP four-disulfide core domain 2	- 3.27
<i>SPPI</i>	secreted phosphoprotein 1 ⁴⁾	- 6.17
<i>IVNSIABP</i>	influenza virus NS1A binding protein ⁴⁾	- 0.94
<i>PLAU</i>	plasminogen activator, urokinase ⁴⁾	3.71
<i>PLAUR</i>	plasminogen activator, urokinase receptor ⁴⁾	3.17
<i>SERPINE1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 ⁴⁾	- 2.17
<i>IKBKE</i>	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	1.67
<i>IL8</i>	interleukin 8	4.41
<i>IRAK3</i>	interleukin-1 receptor-associated kinase 3 ^{1) 3)}	- 1.65
<i>PRKAR2B</i>	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta ¹⁾	- 1.05
<i>CYCS</i>	cytochrome c, somatic ¹⁾	1.05
<i>BID</i>	BH3 interacting domain death agonist ¹⁾	1.05
<i>BIRC3</i>	baculoviral IAP repeat-containing 3 ¹⁾	2.14
<i>LOC479458</i>	caspase 12 ¹⁾	3.35

発現比を対数 (Log₂) で示した (負は発現の減少を, 正は発現の増加を示す). 遺伝子名に付けた数字は, 1) 細胞増殖性, 2) 外界刺激応答および免疫系, 3) 外界刺激および免疫系, 4) インフルエンザウイルス増殖性に関連することを示す.

り, 一度に全ゲノムの発現量を網羅的に比較出来る利点がある. DNA マイクロアレイ法の結果, 両細胞で mRNA の転写量が異なる発現変動遺伝子に対して, 統計学的手法を用いた解析を行う事により, 両細胞の違いが明らかとなった.

ウイルス高増殖性 TR7 においては, ウイルスの増殖に有利となる蛋白質分解酵素に関与する遺伝子 *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE1* や, 抗オルソミクソウイルス蛋白質をコードする遺伝子 *MX1* の発現量に変化が認められ, インフルエンザウイルスの増殖を促進する可能性がある TR7 の遺伝子群が明らかになった.

インフルエンザウイルスは, 宿主細胞へ侵入する過程で, 宿主の蛋白質分解酵素を利用

する. すなわち, 宿主細胞質内へのウイルスゲノムの放出 (脱殻) には, ウイルスの膜蛋白質である Hemagglutinin (HA) 分子の部分開裂が必須であり, 宿主細胞が産生する蛋白質分解酵素が関与していると考えられている¹⁴⁾. ウイルス高増殖性細胞の TR7 では, ウイルスの脱殻に有利となるセリン型蛋白質分解酵素活性化因子である *PLAU* の発現増加及び *PLAU* 活性の阻害因子である *SERPINE1* の発現減少が認められた. 一般的に, 培養細胞でインフルエンザウイルスを増殖させる場合, 蛋白質分解酵素であるトリプシンの添加を必要とするが, TR7 においてはトリプシンを必要としない事がある¹²⁾. この事は, 細胞自身が産生する酵素の活性が, ウイルス高増殖性 TR7 で非常に高いと

いう事と矛盾しない。また、肺や気道粘膜上皮で発現するセリン型蛋白質分解酵素抑制因子¹⁵⁾として知られている *WFDC2* の発現量が、TR7 で著しく減少していた事も同様で、TR7 で up-regulate されている蛋白質分解酵素がウイルス産生に好影響を与えていると考えられる。

また、MDCK を含め一般的にインフルエンザウイルス感染により発現量が亢進する抗ウイルス蛋白質をコードする遺伝子 *MX1* の発現量が TR7 において著しく低下していた事は注目に値する。抗オルソミクソウイルス遺伝子として発見された *MX1* は、細胞内でのウイルス産生の抑制に関わっている事が報告されている^{16, 17)}。実験動物であるマウスでは通常 *MX1* が発現しておらず、インフルエンザウイルスに対する感受性が高い。また、この遺伝子を導入する事で、インフルエンザウイルス耐性になる事も証明されている^{18, 19)}。*MX1* は同時にアポトーシス関連遺伝子としても知られており、この遺伝子が活性化されると癌細胞はアポトーシスに向かう²⁰⁾。アポトーシスが抑制されている進行癌患者の細胞では、高率に *MX1* がメチル化され、サイレント状態になっている²¹⁾。これらの事実を踏まえると、TR7 における *MX1* の著しい発現減少は、ウイルスに対する感染防御の機能低下及び細胞の延命を保証し、結果としてウイルスの高増殖性をもたら

していると考えられる事が出来る。

また、今回のパスウェイ解析により、TR7 で発現変動した遺伝子には、統計学的に有意に外界刺激・免疫系シグナル伝達パスウェイに関わる遺伝子が多く含まれる事が初めて明らかとなった。この事実は、異物であるウイルスの侵入時に TR7 では上述の *MX1* のみではなく、複数の遺伝子群による複合的な経路が MDCK とは異なる反応を示す事を示唆している。但し、これらの遺伝子群がウイルス増殖に影響を及ぼすメカニズムについては、今後の検討が必要である。

細胞増殖性に関連して、癌細胞に特徴的なパスウェイの発現が増加している事から、TR7 がトランスフォームしている危惧が持たれた。しかし MDCK と TR7 をヌードマウス皮下に接種して経過観察したところ、MDCK の造腫瘍性が高く、TR7 ではほとんど腫瘍塊を造らなかった(未発表データ)。

本研究では、ウイルス非感染時における発現プロファイルの比較を行い、恒常的な発現量の差による影響を調べた。今後は、ウイルス感染後の遺伝子発現変動を調べ、ウイルス感染誘導性の宿主因子について探索を行う必要がある。更にノックダウン法などの遺伝子操作を用い、これらの遺伝子の役割を明確にしたいと考えている。

文 献

- 1) **Wright PF, Neumann G and Kawaoka Y** : Influenza in Humans - Past pandemics and the H5N1 epidemic. In "Fields Virology", 5th ed. Vol.2, eds by Knipe DM, et al, pp. 1697-1701. Wolters Kluwer Health : Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.
- 2) **進藤奈邦子** : 日本での超過死亡。インフルエンザ **2**, 215-222, 2001.
- 3) 厚生労働省 : 第5回新型インフルエンザ (A/N1N1) 対策総括会議資料 (一般の新型インフルエンザ (A/H1N1) 対策について - 対策の総括
- 4) **Graham BS and Crowe EF Jr** : Currently licensed virus vaccines. In "Fields Virology", 5th ed. Vol.1, eds by Knipe DM, et al, pp. 500-502. Wolters Kluwer Health : Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.
- 5) **Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, et al.** : The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in

のために - , 平成 22 年 5 月 19 日 厚生労働省 新型インフルエンザ対策推進本部, 参考資料 1), 2010.

- children. *N Engl J Med* **338**, 1405-1412, 1998.
- 6) 加地正郎：乳幼児に対するインフルエンザワクチンの効果に関する研究. 平成14年度厚生科学研究費補助金 先端厚生科学研究分野 新興・再新興感染症研究事業 研究報告書, 2003.
 - 7) 厚生労働省：ノバルティス社製ワクチン「乳濁細胞培養 A 型インフルエンザ HA ワクチン H1N1「ノバルティス」筋注用」の特例承認に関する資料について：医薬品第2部会の審議結果報告書, 2009.
 - 8) 厚生労働省：GSK 社製ワクチン「アレパンリックス (H1N1) 筋注」の特例承認に関する資料について：医薬品第2部会の審議結果報告書, 2009.
 - 9) Barrett PN, Mundt W, Kistner O, et al. : Vero cell platform in vaccine production : moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines* **8**, 607-618, 2009.
 - 10) Doroshenko A and Halperin SA : Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines) . *Expert Rev Vaccines* **8**, 679-688, 2009.
 - 11) European Medicines Agency : Celvapan, pandemic influenza vaccine (H1N1) (whole virion, inactivated, prepared in cell culture) , 2009.
 - 12) Tsutsumi R, Fujisaki S, Shozushima M, et al. : Anoikis-resistant MDCK cells carrying susceptibilities to TNF-alpha and verotoxin that are suitable for influenza virus cultivation. *Cytotechnology* **52**, 71-85, 2006.
 - 13) Kanehisa M and Goto S : KEGG : Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**, 27-30, 2000.
 - 14) 木戸 博, Chen Ye, 山田博司, 他 : インフルエンザウイルスの感染感受性をきめる個体のプロテアーゼ群とインフルエンザ脳症の発症機序. *日薬理誌* **122**, 45-53, 2003.
 - 15) Bingle L, Cross SS, High AS, et al. : WFDC2 (HE4) : a potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung. *Respir Res* **7**, 61, 2006.
 - 16) Krug RM, Shaw M, Broni B, et al. : Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced *Mx* gene product. *J Virol* **56**, 201-216, 1985.
 - 17) Turan K, Mibayashi M, Sugiyama K, et al. : Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res* **32**, 643-652, 2004.
 - 18) Grimm D, Staeheli P, Hufbauer M, et al. : Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional *Mx1* resistance gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 6806-6811, 2007.
 - 19) Tumpey TM, Szretter KJ, Van Hoeven N, et al. : The *Mx1* gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza viruses. *J Virology* **81**, 10810-10821, 2007.
 - 20) Mibayashi M, Nakade K and Nagata K : Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection. *Microbiol Immunol* **46**, 29-36, 2002.
 - 21) Calmon MF, Rodrigues RV, Kaneto CM, et al. : Epigenetic silencing of *CRABP2* and *MXI* in head and neck tumors. *Neoplasia* **11**, 1329-1339, 2009.

Transcriptome analysis of
influenza virus-susceptible MDCK
(Madin-Darby canine kidney) - derived cells

Daisuke MINEGISHI^{1), 2)}, Toru TAMURA¹⁾,
Reiko TSUTSUMI¹⁾ and Shigehiro SATO¹⁾

¹⁾ Department of of Microbiology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

²⁾ Research Institute of Bio-System Informatics,
Tohoku Chemical Co. Ltd., Morioka, Japan

(Received on October 11, 2011 & Accepted on November 17, 2011)

Abstract

Previously, we established the cell line (tentatively called TR7) derived from MDCK cells (American Type Culture Collection: CCL34). TR7 cells were more susceptible to influenza viruses and released more viruses in the culture medium, compared to the parental MDCK. To clarify the differences between TR7 and MDCK, we performed a transcriptome analysis using DNA microarrays. Statistical analysis identified differences in 49 pathways. These included genes encoding the focal adhesion molecules; cell adhesion molecules (CAMs); and molecules involved in extracellular matrix (ECM)-receptor interaction, regulation of actin cytoskeleton, and gap junction pathways.

These differences seemed to reflect the anoikis-resistant phenotype of TR7. Significant differences were observed with regard to many pathways relating the immune system and signaling. These pathways would contribute to the host-parasite interactions. In addition, some important differences in gene expressions were detected: the expression of the protease-related gene *PLAU* was high and that of the antiviral *MXI* gene was extremely low in TR7. These characteristics of the TR7 would positively work towards increasing viral infection and amplification. Thus, TR7 would be attractive for the mass production of influenza viruses and consequently for the development of vaccines.
