

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成13年度採択研究代表者

河岡 義裕

(東京大学医科学研究所 教授)

「インフルエンザウイルスの感染過程の解明とその応用」

1. 研究実施の概要

インフルエンザウイルスを構成する個々の蛋白質の性状ならびに機能については、かなり詳細な知識が集積している。このような基礎研究の進展にもかかわらず、それが必ずしもウイルス病原性の根本的な理解や効果的な予防・治療方法につながっていない。その理由は、インフルエンザウイルスの増殖過程の理解が不十分なためである。そこで、ウイルス増殖に関わるウイルス側と宿主細胞側の遺伝子産物間のインターラクシオン、そしてウイルス粒子形成過程の解明を目指した。これまでに、ウイルス増殖に重要な宿主細胞遺伝子に変異を導入した細胞を分離するとともに、インフルエンザウイルス粒子形成の根幹となるゲノム・パッケージングのメカニズムの解明に向けて、各遺伝子分節のパッケージング・シグナルを同定した。また、得られたパッケージング・シグナルの知見に基づき、インフルエンザウイルスを基にしたワクチンベクターの開発を行った。今後は、ウイルス側と宿主細胞側の遺伝子産物間のインターラクシオンを念頭に、ウイルス粒子形成機構の詳細を明らかにするとともに、ウイルスの病原性に関する研究も、アジアで流行中のH5N1鳥インフルエンザウイルスならびにその他のウイルスについても展開する予定である。

2. 研究実施内容

インフルエンザウイルスを構成する個々の蛋白質の性状ならびに機能については、かなり詳細な知識が集積している。このような基礎研究の進展にもかかわらず、それが必ずしもウイルス病原性の根本的な理解や効果的な予防・治療方法につながっていない。その理由は、インフルエンザウイルスの増殖過程の理解が不十分なためである。そこで、ウイルス増殖に関わるウイルス側と宿主細胞側の遺伝子産物間のインターラクシオン、そしてウイルス粒子形成過程の解明を目指した。これまでに、ウイルス増殖に重要な宿主細胞遺伝子に変異を導入した細胞を分離するとともに、インフルエンザウイルス粒子形成の根幹となるゲノム・パッケージングのメカニズムの解明に向けて、各遺伝子分節のパッケージング・シグナルを同定した。また、得られたパッケージング・シグナルの知見に基づき、インフルエンザウイルスを基にしたワクチンベクターの開発を行った。今後は、ウイルス側と宿主細胞側の遺伝子産物間のインターラクシオンを念頭に、ウイルス粒子形成機構の

詳細を明らかにするとともに、ウイルスの病原性に関する研究も、アジアで流行中のH5N1鳥インフルエンザウイルスならびにその他のウイルスについても展開する予定である。

インフルエンザウイルス・ゲノムのパッケージング・シグナルの知見に基づくインフルエンザワクチンならびにワクチンベクターの開発

1. 次世代インフルエンザ弱毒生ワクチンの開発

現在広く用いられる不活化インフルエンザワクチンは、呼吸気道に効果的な粘膜免疫を誘導できない。そのため、体内でウイルスの広がりを抑えることにより症状の軽減には効果を発揮するが、感染そのものの予防効果には限界がある。より効果の高いワクチンを目指し、鼻腔噴霧型の弱毒生ワクチンが米国で実用化された。このワクチンはA型2種類とB型1種類のウイルスを混合したワクチンである。したがって、ウイルス間の干渉作用（特にB型ウイルスのA型ウイルスによる増殖抑制）によるワクチン効果の減少が指摘されている。そこで、問題点を克服するために、B型ウイルスの表面糖蛋白質をもつA型キメラウイルスを作製し、そのワクチンとしての可能性を検討した(図1)。まず、A型ウイルスとB型ウイルスのHA分節間でキメラ遺伝子（HA分節両末端の非翻訳領域と、N末側シグナルペプチドおよびC末側膜貫通/細胞質内ドメインをコードする遺伝子領域がA型ウイルス由来で、抗原部位を含むectodomainがB型ウイルス由来）を構築した。一方、NA分節は、両末端の非翻訳領域と翻訳領域のパッケージングシグナルを含む領域の間に、全長のB型NA遺伝子を挿入したキメラ分節を構築した。これらのHA、NAキメラ分節をもつA型ウイルスをリバースジェネティクスにより作製したところ、マウスにおいてB型ウイルス特異的な中和抗体を誘導することができた。このようなキメラウイルスは、A型ワクチンウイルスと干渉しないB型ワクチンウイルスとして応用できる。

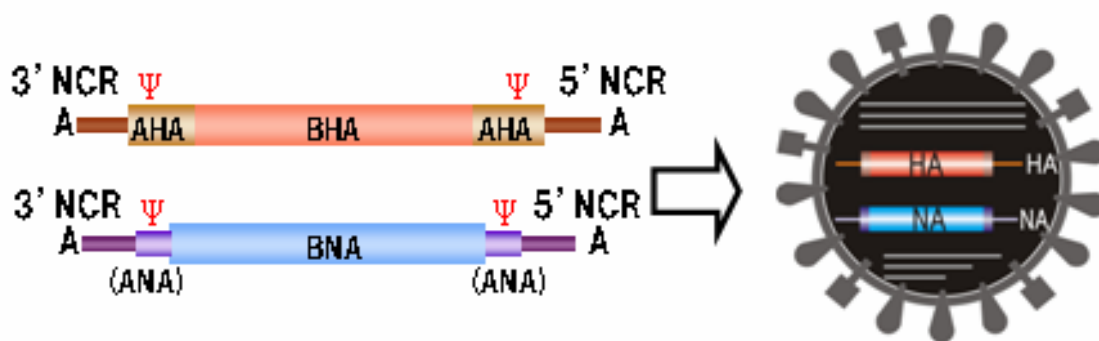


図1. HAとNAはB型ウイルス由来で、残りの遺伝子がA型ウイルス由来であるキメラウイルスの作製

2. 多価ワクチンベクターの開発

インフルエンザウイルスは粘膜面に強い免疫を誘導するため、粘膜を侵入門戸とする病原体に対するワクチンベクターをして有望である。そこで、外来遺伝子を安定に発現するウイルスベクターの構築をめざしてHA/NAタンデムシステムを開発した（図2）。このシステムでは、HAとNA両方の蛋白質を同時に発現する改変HA分節を用いる。この改変HA分節はパッケージングシグナルを含んでおり粒子中に取り込まれる。一方、NA分節にはそのコード領域のかわりにパッケージングシグナルを付加した外来性遺伝子（GFP遺伝子）を挿入した。これらの改変分節をもつウイルスは、継代してもGFPを安定して発現した。このシステムを用いることで多価ワクチンの構築が可能である。例えば、他の呼吸器病原体（SARSなど）の感染防御抗原遺伝子を生ワクチンウイルスに挿入すれば、呼吸器疾患に対する多価ワクチンの構築ができる。また、複数のインフルエンザHA蛋白質（例えばH1とB）を同時にもつウイルスの構築も可能である。この場合、混合により生じるウイルス間の干渉もなく、体内でのHA抗原量に優れる多価インフルエンザワクチンとして応用できる。

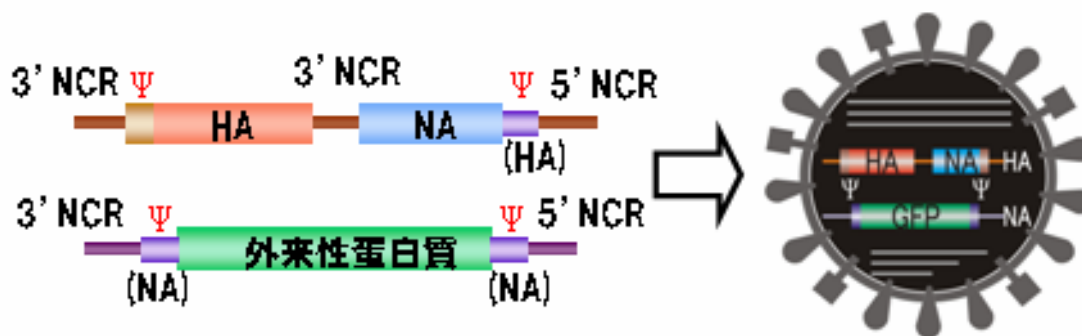


図2. HAとNA遺伝子をタンデムに持ちNA遺伝子には外来性蛋白質の遺伝子を持つキメラウイルスの作製

3. 研究実施体制

ウイルス解析・開発グループ

① 研究分担グループ長

河岡義裕（東京大学 医科学研究所、教授）

② 研究項目：

1. インフルエンザウイルスの増殖に重要な宿主細胞遺伝子の同定と役割解明
2. インフルエンザウイルス粒子形成に重要なウイルス構成物質間および宿主遺伝子産物とのインターアクションの解明

3. 半生インフルエンザワクチンとそのワクチンベクターへの応用
4. 強毒インフルエンザウイルスの病原性
5. エボラウイルスの病原性

① 研究分担グループ長

Heinz Feldmann (カナダ科学研究所)

② 研究項目 :

強毒インフルエンザウイルスおよびエボラウイルスの増殖過程の解析

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Shiraishi K, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Goto H, Sugaya N, Kawaoka Y. High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. **J Inf Dis** 188:57-61, 2003.
- Hatta M, Kawaoka Y. The NB protein of influenza B virus is not necessary for virus replication in vitro. **J Virol** 77:6050-6054, 2003.
- Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Goto H, Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses with chimeric (type A/B) hemagglutinins. **J Virol** 77:8031-8038, 2003.
- Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H. Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. **Vaccine** 21:3212-3218, 2003.
- Watanabe T, Watanabe A, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. **J Virol** 77:10575-10583, 2003.
- Yasuda J, Nakao M, Kawaoka Y, Shida H. Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. **J Virol** 77:9987-9992, 2003.
- Kondo T, McGregor M, Chu O, Chen D, Horimoto T, Kawaoka Y. Protective effect of epidermal powder immunization in a mouse model of equine herpesvirus-1 infection. **Virology** 318:414-419, 2004.
- Watanabe S, Watanabe T, Noda T, Takada A, Feldmann H, Jasenosky LD, Kawaoka Y. Production of novel Ebola virus-like particles from cDNAs: An alternative to Ebola virus generation by reverse genetics. **J Virol** 78:999-1005, 2004.
- Maeda Y, Goto H, Horimoto T, Takada A, Kawaoka Y. Biological Significance

of the U Residue at the-3 position of the mRNA sequence of Influenza A Viral Segments PB1 and NA. **Virus Res** 100:153-157, 2004.

- Takada A, Fujioka A, Tsuji M, Morikawa A, Higashi N, Ebihara H, Kobasa D, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y. A Human Macrophage C-Type Lectin Specific for Galactose and N-Acetylgalactosamine Promotes Filovirus Entry. **J Virol** 78:2943-2947, 2004.
- Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. A protective immune response in mice to viral components other than hemagglutinin in a live influenza A virus vaccine model. **Vaccine** 22(17-18):2244-2247, 2004.
- Horimoto T, Fukuda N, Iwatsuki-Horimoto K, Guan Y, Lim W5, Peiris M, Sugii S, Odagiri T, Tashiro M, Kawaoka Y. Antigenic Differences between H5N1 Human Influenza Viruses Isolated in 1997 and 2003. **J Vet Sci** 66(3):303-305, 2004.
- Iwatsuki-Horimoto K, Kanazawa R, Sugii S, Kawaoka Y, Horimoto T. The index influenza A virus subtype H5N1 isolated from a human in 1997 differs in its receptor binding properties from a virulent avian influenza virus. **J Gen Virol** 85:1001-1005, 2004.
- Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. **Virology** 320:258-266, 2004.
- Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. **J Virol** 78:3083-3088, 2004.
- Hatta M, Goto H, Kawaoka Y. Influenza B Virus Requires BM2 Protein for Replication. **J Virol** 78:5576-5583, 2004.
- Garulli B, Kawaoka Y, Castrucci MR. Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus. **J Virol** 78:1020-1025, 2004.
- Barman S, Adhikary L, Chakrabarti AK, Bernas C, Kawaoka Y, Nayak DP. Role of Transdomain and Cytoplasmic Tail Amino Acid Sequences of influenza A virus Neuraminidase association and virus budding. **J. Virol** 78:5258-5269, 2004.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）