

「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の感染過程を細胞および個体レベルで明らかにし、得られた結果をウイルス感染症克服に応用するために、インフルエンザウイルスの人工合成法を駆使して、感染細胞におけるウイルス増殖機構の解明を行った。これまでに、インフルエンザウイルスの 8 本のゲノム RNA 分節は、ひとつのセットとしてウイルス粒子に取り込まれることを明らかにした。また、現在アジア、ヨーロッパ、アフリカで流行中の H5N1 ウイルスの唯一の特効薬であるオセルタミビルに対し耐性のウイルスが出現したことを見出した。幸い、本耐性ウイルスは、別のノイラミニダーゼ阻害剤であるザナミビルに対しては、感受性であることがわかった。また、H5N1 ウイルスが何故、人には感染するが、人から人へ効率よく伝播しないのか、その理由を明らかにするために、人の呼吸器におけるインフルエンザウイルスのレセプターの分布を調べた。その結果、下部気道には鳥ウイルスのレセプターも存在するが、上部気道には人ウイルスのレセプターしか存在しないことがわかった。この成績は、H5N1 ウイルスが人から人へ効率よく伝播するためには、人のレセプターを認識できるように変化しなければならないことを示している。さらに、エボラウイルスの強い病原性の分子基盤を解明するために、本来致死的な感染を引き起こさないマウスに致死的な感染を起こすように順化させた変異ウイルスの性状を解析した。その結果、本ウイルスの強い病原性の発揮には、ウイルス蛋白質による自然免疫応答の抑制が重要であることが示唆された。

2. 研究実施内容

I. オセルタミビル治療患者における本剤耐性 H5N1 インフルエンザウイルスの出現

ノイラミニダーゼ(NA)阻害薬は、インフルエンザウイルスの NA を特異的に阻害する、極めて有効なインフルエンザ治療薬である。近年のわが国におけるインフルエンザの治療には、この NA 阻害薬の一種、オセルタミビル (タミフル®) が広く使用され、また、アジアを中心に問題が深刻化している H5N1 インフルエンザの治療にも本剤が使用されている。また、新型インフルエンザ対策として、世界各地でオセルタミビルの備蓄が進められている。

従来 A 型インフルエンザの治療には、NA 阻害薬と作用機序の異なるアマンタジン（シメトレル®）が使用されてきた。しかし、アマンタジンは耐性ウイルスが出現しやすく、現在問題となっている H5N1 ウイルスの中には既にアマンタジン耐性を獲得しているウイルスも存在するため、H5N1 患者の治療には NA 阻害剤が使用されている。

そこで、ベトナムの H5N1 感染患者から分離されたウイルスについて、オセルタミビルによる NA の酵素活性阻害試験を実施したところ、オセルタミビル治療を受けた患者から分離された A/Hanoi/30408/2005 株において本剤に対する感受性の低下が見られた。

このウイルスの NA 遺伝子を解析したところ、オセルタミビル耐性を付与することがわかっている H274Y 変異を持つウイルスが混在していることが疑われた。そこで、プラーククローニングにより 10 クローンを単離し、酵素活性阻害試験および NA の遺伝子解析を実施した結果、6 クローンは H274Y の変異を有しオセルタミビルに高い耐性を、3 クローンは N294S 変異を有し感受性株よりやや高い耐性を示していた。そこでオセルタミビル感受性クローンと H274Y 耐性クローンについてフェレットを用いて感染実験を行った結果、耐性ウイルスは感受性ウイルスよりフェレットにおける増殖能が劣っていた。また、フェレット体内でのオセルタミビル耐性ウイルスの増殖をオセルタミビルは全く抑制できなかったが、同じ NA 阻害剤であるザナミビルは感受性ウイルス同様耐性ウイルスの増殖を抑制した。

このことから、今後新型ウイルス出現等の際には耐性ウイルス出現を常に考慮して薬剤を使用する必要があることが明らかとなった。

II. 人呼吸器における鳥インフルエンザウイルスレセプターの分布

1997 年以来、100 名を超える人が H5N1 インフルエンザウイルスに感染し死亡しているが、人から人への伝播は稀である。そもそも、なぜ、鳥の H5N1 ウイルスは、鳥型のウイルスレセプターを欠くと言われている人に、感染し重篤な症状を引き起こしうるのか？また、何故 H5N1 ウイルスは人から人へ効率よく伝播しないのか？私達は、これらの疑問を明らかにするために、シアリルオリゴ糖

（インフルエンザウイルスのレセプター）の人の呼吸器における分布を調べた。その結果、呼吸器下部の呼吸細気管支および肺胞には、鳥由来のウイルスが認識する SA α 2, 3Gal が多く存在しているが、上部呼吸器の上皮細胞では、人ウイルスのレセプターである SA α 2, 6Gal がほとんどで鳥ウイルスのレセプターはほとんど存在していないこと明らかにした。これらの結果は、H5N1 ウイルスは感染した個体の下部呼吸器では

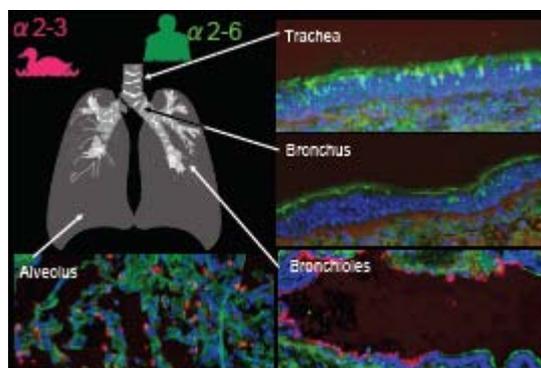


図 1. シアル酸特異的レクチンを用いた人呼吸器組織の染色。呼吸細気管支-肺胞には鳥型シアル酸(赤)が多く観察される。

強い障害をおこすが、人から人へは効率よく伝播しないという事実をよく説明している。さらに、この結果は、H5N1 ウイルスが効率よく人から人へ伝播するためには、人型のレセプターを認識できるように変化しなければならないことを示している。

III. A 型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構

インフルエンザウイルスは 8 本に分かれた RNA をゲノムとして持つ。ところが、このような分節化ゲノムをウイルス粒子に取り込む仕組み、すなわちゲノムパッケージング機構は、これまで明らかにされていなかった。我々は、プラスミド DNA からウイルスを人工合成するリバーシジェネティクス法を用いて、8 本すべての RNA 分節上に分節固有のパッケージング配列が存在することを明らかにした。この結果は、パッケージングの際に 8 種類の RNA 分節が個別に認識されウイルス粒子内に取り込まれることを示しているが、何本の RNA 分節がどのように個々のウイルス粒子内に取り込まれるのかは依然として謎だった。そこで我々は、感染細胞表面で RNP (ゲノム RNA とウイルス蛋白質の複合体) を取り込みつつある出芽ウイルス粒子の内部構造を電子顕微鏡を用いて解析し、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構の解明を試みた。

初めに、様々な出芽段階のウイルス粒子を縦に切り、その縦断面を観察した。出芽の段階に関わらず、細胞表面から出芽するウイルス粒子内には数本の RNP が出芽粒子の遠位端に結合し、出芽方向と平行に取り込まれている様子が観察された。次に出芽粒子を輪切りにし、その横断面を観察すると、個々のウイルス粒子には 8 本の RNP が規則的な配置 (1 本を中心に残りの 7 本が取り囲む構造) で取り込まれていることが明らかになった。また、出芽ウイルス粒子の連続切片を作製し、8 本の RNP の長さを比較すると、それぞれ異なる長さであることがわかった。8 本の RNP 分節の長さはそれぞれ異なると考えられていることから、この結果は、ひとつのウイルス粒子が異なる種類の 8 本の RNP を取り込むことを示唆している。続いて、様々な宿主由来のウイルス株の内部構造について調べてみると、ヒト、鳥類、ブタなど様々な宿主由来のウイルス株で 8 本 1 セットのパッケージング機構が保存されていることが明らかになった。さらに、インフルエンザウイルスに典型的な球形ウイルス粒子だけでなく、フィラメント状ウイルス粒子も、規則的に並ぶ 8 本の RNP を 1 セットだけウイルス粒子に取り込むことがわかった。

以上の成績から、A 型インフルエンザウイルスは、宿主動物の種類や粒子形態に関わらず、規則的に並ぶ異なる種類の 8 本の RNP を選択的に取り込むことがわかった。このようなメカニズムが、分節化ゲノムを効率よく子孫ウイルスに伝え、感染を拡大させるために一役買っていると考えられる。

IV. エボラウイルスのマウスモデルにおける病原性因子の同定

エボラ出血熱は、エボラウイルスによって惹き起こされるヒトおよび霊長類の重篤なウイルス性疾患であり、その致死率は極めて高く 90% に達することもある。しかし、本ウイ

ルスに対する有効な予防・治療法は実用化されておらず、エボラ出血熱の制圧には、本ウイルスの増殖および病原性発現機構の解明が急務である。動物モデルを用いてエボラ出血熱の発症機序が解析されているが、その病原性発現の分子基盤は明らかになっていない。エボラウイルスは、通常、マウスに対し、無症候の感染しか起こさないが、この野生株をマウスで継代することによってマウスに致死的な全身感染を惹き起こす強毒型のマウス馴化株（MA 株）が作成されている。その遺伝子を親株と比較したところ、MA 株には、ヌcleoキャプシドを形成する核蛋白質 NP と VP35、機能不明の VP24 にそれぞれ 1 ヶ所、RNA ポリメラーゼ L に 2 ヶ所、スパイク糖蛋白質 GP に 3 ヶ所のアミノ酸置換を伴う変異および非翻訳領域に 2 ヶ所の変異が認められ、わずか 10 ヶ所の遺伝子変異によってウイルスの病原性が変化したことが明らかになった。そこで、エボラウイルス病原性発現機序の一端を分子レベルで明らかにするために、リバーシジェネティクスを用いて変異ウイルスを作成し、その病原性をマウスで比較した。その結果、NP と VP24 のアミノ酸変異がマウスに致死的な感染を惹起するのに必須であることが明らかになった。また、MA 強毒型のアミノ酸変異を NP と VP24 に有するウイルスは、マウスにおいて高い増殖能を示した。この結果から NP と VP24 の 2 種類のウイルス蛋白質が感染個体内での増殖と病原性発現に何らかの役割を果たしていることが示唆された。さらに、これらの 2 種類のウイルス蛋白質の病原性獲得における役割の一端を明らかにするために、強毒 MA 型の NP と VP24 を有する変異ウイルスと親株のマウス由来細胞でのインターフェロン（IFN α/β ）存在下における増殖能を比較した。その結果、親株は IFN α/β の抗ウイルス活性によりウイルスの増殖が抑制されたが、NP と VP24 に強毒 MA のアミノ酸を持つウイルスは、IFN α/β による抗ウイルス活性に抵抗性を示し、高い増殖能を示した。これらの結果から、エボラウイルスの NP と機能未同定の膜タンパク質 VP24 が病原性発現に重要な役割を果たしていることがわかった。さらに、IFN α/β による自然免疫応答はウイルス感染に対する初期生体防御を担っていることから、これらのウイルス蛋白質が宿主の自然免疫応答を回避する機能を有しており、病原性発現に重要な役割を担っていることが示唆された。

尚、エボラウイルスそのものを使った研究は、日本には稼働中の P4 施設がないため、カナダ科学研究所のグループとの共同実験として行った。

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とのインターアクションの解明
2. 強毒インフルエンザウイルスの病原性
3. エボラウイルスの増殖過程と病原性の解明

カナダ科学研究所グループ

①研究分担グループ長：Heinz Feldmann（カナダ科学研究所、部長）

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（原著論文）発表

- Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. The importance of both the coding and segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. **J Virol** 79:3766-3774, 2005.
- Maeda Y, Hatta M, Takada A, Watanabe T, Goto H, Neumann G, Kawaoka Y. Live bivalent vaccine for parainfluenza and influenza virus infections. **J Virol** 79:6674-6679, 2005.
- Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, Yamamoto Y, Hitomi T, Kira T, Nakai T, Kiso M, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S. Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan. **Virology** 332:167-176, 2005
- Shinya K, Suto A, Kawakami M, Sakamoto H, Umemura T, Kawaoka Y, Kasai N, Ito T. Neurovirulence of H7N7 influenza A virus: brain stem encephalitis accompanied with aspiration pneumonia in mice. **Arch Virol** 150:1653-1660, 2005.
- Noda T, Aoyama K, Sagara H, Kida H, Kawaoka Y. Nucleocapsid-like structures of Ebola virus reconstructed using electron tomography. **J Vet Med Sci** 67:325-328, 2005.
- Shinya K, Hatta M, Yamada S, Takada A, Watanabe S, Halfmann P, Horimoto T, Neumann G, Lim W, Guan Y, Peiris M, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003. **J Virol** 79:9926-9932, 2005.
- Hatakeyama S, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, Goto H, Kawakami C, Mitamura K, Sugaya N, Suzuki Y, Kawaoka Y. Enhanced expression of an α 2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves the isolation of human influenza viruses and the evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. **J Clin Micro** 43:4139-4146, 2005.
- Neumann G, Ebihara H, Takada A, Noda T, Kobasa D, Jasenosky LD, Watanabe S, Kim JH, Feldmann H, Kawaoka Y. The Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. **J Virol** 79:10300-10307, 2005.
- Mase M, Eto M, Tanimura N, Imai K, Tsukamoto K, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S. Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China. **Virology** 339:101-109, 2005.
- Suzuki T, Takahashi T, Guo C-T, K.I.-P. J Hidari, Miyamoto D, Goto H, Kawaoka Y, Suzuki

- Y. Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. **J Virol** 79: 11705-11715, 2005.
- Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. **Proc Natl Acad Sci** 102:16825-16829, 2005.
 - Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KHL, Pham ND, Nguyen HH, Yamada S, Muramoto Y, Horimoto T, Takada A, Goto H, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. Emergence of an oseltamivir-resistant H5N1 influenza A virus. **Nature** 437:1108, 2005.
 - Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Tagawa-Sakai Y, Yamada S, Ito H, Ito T, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kawaoka Y. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. **Vaccine** 24:3669-3676, 2006.
 - Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H. Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. **Microbiol Immunol** 50:73-81, 2006.
 - Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Yokosawa H, Yasuda J. Cellular factors required for Lassa virus budding. **J Virol** (in press).
 - Watanabe S, Noda T, Kawaoka Y. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. **J Virol** (in press).
 - Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y. Hierarchy among vRNA segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. **J Virol** 80:2318-25, 2006.
 - Iwatsuki-Horimoto K, Takada A, Kawaoka Y, Alizon M. Detection of cell-cell fusion mediated by the Ebola virus glycoproteins.
 - Running title: Ebola virus GP-mediated fusion. **J Virol** 80:2815-22, 2006.
 - Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y.
 - The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. **J Virol** (in press).
 - Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida A, Cheng RH, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. **Nature** 439:490-492, 2006.
 - Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Influenza virus receptors in the human airway. **Nature** 440:435-436, 2006.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)