

[ 別紙 1 ]

論文の内容の要旨

論文題目 デングウイルス 1 型における 3' 末端非コード領域の生物学的、  
遺伝学的解析

指導教員 小池 和彦 教授

東京大学大学院医学系研究科  
平成 14 年 4 月入学  
医学博士課程  
内科学専攻

氏名 貫井 陽子

デングウイルス (DENV) 感染症は蚊によって媒介される急性熱性疾患である。年間約 5 千万人から 1 億人が DENV に感染し、50 万人が重症な病型であるデング出血熱を呈し、約 2.4 万人の死亡が報告されている。特に東南アジア、西太平洋、南アメリカなどで毎年大規模な流行が認められるが、それらの地域への旅行者の感染も多く、全世界的な感染症である。本邦でも 1942 年にアウトブレイクの報告があり、現在では輸入感染症例として年間約 50 名の患者が報告されている。このように重要な感染症ではあるが、現時点で有効な治療法、ワクチンは未だ開発されておらず、基礎研究の面から鑑みても検討すべき事項は多い。

DENV はフラビウイルス科に属する一本鎖の RNA ウイルスであり約 11 kb のゲノムを有する。ゲノム RNA は 5' 末端に type 1 cap を有するが、3' 末端はポリアデニル化されていない。ゲノム RNA は open reading frame (ORF) の 5' 末端と 3'

末端に非コード領域 (NCR) を有する。5'NCR は DENV では約 100 塩基、3'NCR では 400-500 塩基長であり、フラビウイルス内で最も短い 3'NCR を有する。3'NCR は塩基の保存性の高さから① ORF 直下の可変領域、② 3'末端近くの cyclization sequence (CS) や stem-loop(SL) 構造を含む保存性の高い領域、③ ①、②の中間に位置し、いくつかのヘアピン構造を含む中等度の保存性を示す領域の 3 領域に分類される。これらのうち②、③の領域に関する検討は数多くなされており、CSやSLはDENVの複製や二次構造の維持に必須であるとの報告が認められる。一方①の可変領域に関しては、元来塩基の保存性も低く付加的な役割しか持たないのではないかとの推測もなされていたが、詳細な検討は行われていない。

本論文では、我々が 2004 年度にミクロネシアヤップ島への日本人旅行者における集団感染事例より分離した 3'NCR 内に塩基欠失を有する新たな DENV-1 型につき遺伝子解析を行った。また 3'NCR 内のこの塩基欠失の意義について感染性クローンを用いて生物学的解析を行い、さらに 3'NCR 可変領域全体の意義を検討するためレプリコンシステムを構築し RNA 翻訳段階への関与を様々な宿主(哺乳類、蚊)由来細胞を用いて評価した。RNA 合成段階についても検討した。

2004 年 5 月から 12 月の間にミクロネシアヤップ島で DENV-1 型のアウトブレイクが WHO チームによって確認され、658 名の Dengue 熱患者が報告された。2004 年 8 月に同島へ旅行した日本人旅行者 7 名が帰国後血清学診断にて DENV 感染と診断された。患者血清より分離した 4 つのウイルス株の全塩基配列を決定したところ、3'NCR 内の終止コドン直下に 29 塩基欠失を有する新たな DENV-1 型であることが判明した。これらの塩基欠失は細胞培養を経ずに血清から直接増幅したウイルスにおいても認められたことより培養細胞内で人為的に挿入されたものではないと考えられた。またこの塩基欠失は 4 つすべての分離株で認められ、今回のヤップ島での DENV-1 型アウトブレイクの責任ウイルスとしての関与

が示唆された。これらの欠失は既報のものには認められず、国立感染症研究所所有の 24 の DENV-1 分離株解析の結果、2003 年度アフリカセイシェル共和国への旅行者より分離された株にのみ同様の部位に 17 塩基欠失が確認された。3'NCR の塩基配列の多様性はフラビウイルスでは 1997 年以降黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルスなどでの報告が認められる。これらは地理的分布やウイルス進化、ヒトへの病原性への関与の可能性がある。本研究においてアフリカ、ミクロネシアより別々に分離されたウイルス株においてほぼ同一の場所に共通の塩基欠失が認められたということは自然界においてこのようなウイルスが増殖維持されうることを示唆している。

また、本研究では新たに感染性完全長クローンを構築し、上記の自然分離株と同様の部位に同程度の短い塩基欠失 (19 塩基) を有する変異体を作成し生物学的意義を検討した。野生型 (塩基欠失を伴わない) 及び変異型での増殖特性、プラーク形態の比較ではアフリカミドリザル腎細胞由来の Vero 細胞、ヒト肝癌由来の Huh-7 細胞、蚊由来の C6/36 細胞において差異は認められなかった。これらの結果はダニ媒介性脳炎ウイルスでの増殖特性やマウスへの病原性の比較の報告と矛盾しない。一方 DENV-4 型において 3'NCR 内に塩基欠失 (61-262 塩基) を有する変異体は培養細胞上での蛋白複製効率が劣り、アカゲザルの感染実験ではウイルス血症のレベルや期間が減少するとの報告もある。また、同様の部位に 30 塩基欠失を挿入した変異体はデングワクチン候補の一つとも考えられており、この領域の生物学的意義は一定の見解が得られていない。本研究で検討した 3'NCR 可変領域内の 19 塩基という短い欠失は、本来の生態環境ではない培養細胞でのウイルス複製に重要な役割を果たしていない可能性もある。しかし、ベクターやヒトなどの生体内の環境での関与は有りうると考えられた。

上記の結果をふまえ、次に自然分離株より得られた可変領域内の短い塩基欠

失の解析から派生し、3'NCR 可変領域全体の生物学的役割を解明することを目的に新たな変異体を作成した。増殖特性や抗原分泌量の解析では哺乳動物細胞では可変領域内に終止コドンより 45, 81, 109, 45-81 番目の塩基欠失を伴う変異体及び 45-81 塩基置換を伴う変異体で、感染後早期に増殖や抗原分泌量が低下することが確認された。プラークサイズも同変異体で縮小化を認めた。しかし蚊由来の細胞内では変異体における野生型との差異は認められなかった。次に翻訳段階における影響を検討したところ、可変領域内 45 塩基欠失を伴う変異体でのみ活性の低下が確認されたが、他の変異体では野生型との差異は認めなかった。また哺乳動物細胞内での RNA 合成は 45, 45-81 塩基欠失を伴う変異体及び 45-81 塩基置換を伴う変異体で著明に低下しており、特にマイナス鎖合成で顕著であった。

これらの事象をあわせて考えると、3'NCR の可変領域は終止コドン直下の 45 塩基（特に m10 欠失部位以外の 26 塩基）は塩基の存在自体がウイルスの翻訳、RNA 合成、複製に関与し、また 45-81 塩基に関しては塩基配列が RNA 合成、複製にとって重要である可能性が推察された。また可変領域は RNA 合成、複製過程において宿主細胞の種類により異なるメカニズムで調節に関与する可能性が示唆された。

今後は他のフラビウイルスにおいても自然界に同様の欠失を有する変異体が存在していることを考慮し、臨床分離株を含めた包括的な解析及び病原性への関与なども検討する必要がある。また哺乳動物、節足動物内でのウイルス翻訳、複製の過程を詳細に検討することにより治療薬、ワクチンなどへの応用にも新たな道が開かれるのではないかと期待される。