

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 THE MECHANISM BY WHICH PANDEMIC INFLUENZA A VIRUSES EMERGE  
~The importance of receptor specificity~

新型インフルエンザウイルス出現のメカニズム  
~レセプター特異性の変化の重要性~

指導教員 河岡義裕 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入 (進) 学年

医学博士課程

病因・病理学 専攻

氏名 山田 晋弥

インフルエンザウイルスはその内部蛋白質の抗原性から A, B, および C 型に分類される。この中で、A 型インフルエンザウイルスは、ヒト以外の様々な動物からも分離され、粒子表面の 2 つの糖蛋白質であるヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性の違いにより、HA は H1~H16、NA は N1~N9 の亜型に分類されている。HA は、宿主細胞にあるレセプター (シアル酸を末端にもつ糖タンパクや糖脂質) と結合することで、感染の開始に関与する。NA は、子孫ウイルスが細胞から放出される際に、細胞表面にあるシアル酸を除去することで、効率のよい粒子放出に関与する。

野生のカモなどの水禽にはすべての亜型のインフルエンザウイルスが存在するため、水禽が、インフルエンザウイルスの自然宿主と考えられている。水禽で無症状のまま保持されているウイルスが糞とともに排出され、時折、家禽や哺乳動物などに伝播することがあるが、多くの場合は大きな流行には至らない。新しい宿主で効率よく伝播するためには、新し

い宿主に適応したレセプター特異性を獲得する必要がある。例えば、ヒトのインフルエンザウイルスは、ガラクトースに $\alpha 2, 6$ 結合したシアル酸 (SA $\alpha 2, 6$ Gal) を主に認識するのに対し、トリのウイルスは、 $\alpha 2, 3$ 結合したシアル酸 (SA $\alpha 2, 3$ Gal) を主に認識する。その違いが、宿主域を大きく左右する。実際に、カモのウイルスはヒトで効率よく増殖できず、ヒトのインフルエンザウイルスもカモで効率よく増殖することができない。したがって、鳥由来のウイルスがヒトで効率よく伝播するためには、まず、ヒト型レセプターを認識する変異を獲得することが重要であると考えられる。もし新型ウイルスが出現し大流行すると、多大な被害をだす可能性がある。毎年流行している H1N1 と H3N2 ウイルスも、出現当初、人類はこれらウイルスに対し免疫学的にナイーブであったため、パンデミック（世界的大流行）を引き起こし、多大な犠牲がでた。それぞれ、1918年のスペイン風邪 (H1N1 ウイルス) と 1968年の香港風邪 (H3N2 ウイルス) として出現し、スペイン風邪では、世界中で約 2000~4000万人もの命が奪われた。

鳥のインフルエンザウイルスが、ヒト型レセプターを認識できるようになるメカニズムとしては、両ウイルスのレセプターを有するブタが中間宿主として働き、ブタで増殖を繰り返すうちに、ヒト型のレセプター特異性を獲得するという仮説が提唱されてきた。しかし、近年、ウズラなどの家禽から分離された鳥インフルエンザウイルスの中にはヒト型のレセプター特異性を持つウイルスが存在することが報告された。これにより、家禽においても鳥ウイルスがヒト型レセプターを認識するように変化することが示唆され、パンデミックウイルスの創生にはブタのみならずウズラなどの家禽も関与する可能性が示された。

一方、近年、ヒトに感染した H5N1 インフルエンザウイルスは、主にトリ型のレセプター特異性を保持しており、 $\alpha 2, 3$ 結合したシアル酸を介して感染が成立した可能性が示唆されてきた。我々の研究により、ヒトの肺胞などにも鳥型レセプターが存在し、鳥由来の H5N1 ウイルスが、ヒトの肺胞などから感染しうることが判明した。幸い、ヒトで効率よく伝播する H5N1 ウイルスは、未だ出現していないが、年々、ヒトへの感染例は増加しており、ヒトで効率よく伝播する新型ウイルスの出現する可能性が高まっている。

以上の観点から、1) インフルエンザウイルスが水禽からヒトへと宿主域を変化させる際に家禽が中間宿主となりうるか否かを解明すること、及び、2) どのようなメカニズムでレセプター特異性を鳥型からヒト型にシフトさせるかを解明することは、今後、パンデミックウイルス出現の事前策を講じる上で重要であると考えられる。私は、上記1) 2) に関する知見を得ることを目的とし、ウズラが中間宿主として働きうるか否かを解析し (chapter I)、また、どのような変異が生じた場合に、H5N1 インフルエンザウイルスがヒト型レセプターを認識するようになるのかを解析した (chapter II)。

## Chapter I; Adaptation of duck influenza A virus in quail

(カモ由来 A 型インフルエンザウイルスのウズラにおける適応)

カモ由来ウイルスをウズラで継代し、分離ウイルスの HA のレセプター特異性、NA のシアリダーゼ活性の解析および HA、NA のアミノ酸変異に関する解析を行った。更に、ヒト呼吸器組織片への感染実験を行い、親株と継代ウイルスの感染性の変化を解析した。カモインフルエンザウイルスをウズラで継代し、鼻、気管、肺、直腸より分離した各ウイルスの増殖性を調べたところ、当初はあまり増殖しなかったが、継代を繰り返すうちによく増殖するようになった。特に気管にて高い増殖性を示すようになったが、これは自然界でウズラのインフルエンザウイルスがウズラでよく増殖する部位と一致しており、ウイルスがウズラに適応したものと考えられる。アミノ酸配列を比較したところ、HA では主にレセプター結合部位や宿主細胞との膜融合に関する部位にアミノ酸置換が起きていた。その中で、HA のレセプター結合親和性に影響すると思われる 144 番目と 188 番目のアミノ酸が、カモには見られないが、ヒトの分離株では多数見られるアミノ酸に早い段階で置換されていた。行った実験系においては、10 回及び 19 回継代ウイルスの HA のレセプター特異性の顕著な変化は見出せなかったが、リバースジェネティクス(プラスミドから人工的にウイルスを作製する方法)により作製した 19 回継代ウイルスの HA と NA を有するウイルスは、親株の HA と NA を有するウイルスに比べ、鶏初代培養細胞および MDCK (イヌ腎臓由来) 細胞における増殖性が上がっていることがわかり、ウズラは野生のカモから鶏や哺乳動物への感染の中で中間宿主となりうる可能性が示唆された。更に、ヒト呼吸器組織片に親株、および 19 回継代ウイルスを感染させたところ、親株は SA $\alpha$ 2,3Gal の多く存在する肺胞のみで増殖したが、19 回継代ウイルスは、より上部にあり、主に SA $\alpha$ 2,6Gal のみ存在するヒト気管支においても感染、増殖することがわかった。レセプター結合実験では検出できなかったものの SA $\alpha$ 2,6Gal を認識する変化がおきていたものと推測された。また、NA では stalk 部位の 2 箇所にて段階的な欠損が起きており、赤血球を用いた結合および遊離実験により NA の機能が減少していることがわかった。我々は、過去に HA のレセプター結合親和性の変化に対して、NA の stalk の長さが変わることによって NA の機能が調節され、HA と NA のバランスを保つことがウイルスの効率的な増殖に重要であることを報告しているが、本研究における NA の欠損も、HA のレセプター結合親和性の変化に対応し、生じたものと推測された。また、この欠損は野生のカモの分離株では見られないが、家禽に適応した株やヒト由来ウイルスで多く確認される変異であり、今回初めて、カモのウイルスが家禽に適応する過程で NA の stalk 部分に欠損が生じることを実証することができた。これらの変異はカモのウイルスが宿主域の壁を越えるために獲得したものと考えられ、HA と NA の相互作用が、ウイルスの宿主域に関与する宿主細胞への吸着や宿主細胞からの子孫ウイルスの放出などに影響を与えている可能性が示唆された。

以上より、ウズラは野生のカモと家禽やヒトの間に存在する宿主域の壁を越えるための中間宿主となりうる可能性が強く示唆された。

## Chapter II; Hemagglutinin mutations responsible for binding to human-type receptors in H5N1 influenza A viruses

(H5N1 インフルエンザウイルスのヘマグルチニンがヒト型レセプターを認識するのに必要なアミノ酸変異)

我々は、どのような変異を獲得したときに H5N1 鳥インフルエンザウイルスが、ヒト型レセプターを認識するようになるのか、その分子メカニズムの解明を目的とし、2004 年から 2005 年にかけてタイやベトナムでヒトから分離された H5N1 インフルエンザウイルス、および、インフルエンザのゲノムに関するデータベースに登録された塩基配列を基にプラスミドを作製し、リバーシジェネティクス法により作製したウイルス、合計 21 株のヒト由来 H5N1 インフルエンザウイルスのレセプター特異性の解析を行った。

同時に解析した鳥分離ウイルス 5 株は、鳥型のレセプターのみを認識したのに対し、ヒト由来ウイルスは、数株が鳥型のレセプターのみならずヒト型のレセプターも認識した。中でも、3 株が顕著な SA $\alpha$ 2, 6Gal への親和性を示し、2 株については、Q192R、G139R、N182K が、大きく関与していることがわかった。残りの 1 株については、N193K が若干の結合を示したが、単独で顕著にヒト型レセプターの認識に関与する変異はなく、複数の変異の集積により SA $\alpha$ 2, 6Gal と結合できるようになっていることがわかった。

現在、H5N1 インフルエンザウイルスは、系統学的に 3 つの分岐群 (clade) に分類されている。解析を行った上述のウイルスは、clade1 に属しており、2005 年～2006 年にかけて中国や、インドネシアで流行した株や、中東やアフリカ、欧州にまで拡散した株は clade2 に属する。そこで、上述の変異 (Q192R, N182K, G139R, N193K) が、clade2 に属する株でも同様に SA $\alpha$ 2, 6Gal の認識に重要であるか否か解析を行ったところ、Q192R、N193K の変異は、SA $\alpha$ 2, 6Gal 結合を増加させたが、N182K、G139R は、SA $\alpha$ 2, 6Gal 結合の増加には影響を与えなかった。しかしながら、N182K の変異は両 clade のウイルス共に、SA $\alpha$ 2, 3Gal への親和性を低下させた。なお、N182K または Q192R を有する株は、それぞれ、2006 年にアゼルバイジャンおよびイラクにて分離されている。

更に、レセプター結合における上記変異の関与について共同研究者とともに *in silico* 構造解析を行った結果、N182K, Q192R に関しては、水素結合によりヒト型レセプターとの親和性を高めている可能性が示唆された。

以上より、182 番目や 192 番目のアミノ酸変異が、レセプター認識のヒト型へのシフトに大きく関与しうることが示された。この知見は、パンデミックウイルス出現に対する事前策を講じるうえで、分離株のリスク評価を行うための分子マーカーとなると考えられ、今後、新型ウイルスの出現を監視する上で、重要といえる。