

論文の内容の要旨

論文題目 **Development of technologies for the control of influenza**

インフルエンザ制圧に向けた技術開発

指導教官 河岡 義裕 教授

2004年4月 入学

医学博士課程 病因・病理学専攻

小澤 真

冬季を中心に世界中で小流行を繰り返す A 型インフルエンザウイルスは、時に、多数の犠牲者を伴う世界的大流行(パンデミック)を引き起こす。A 型インフルエンザウイルスの自然宿主は野生の水禽類で、前世紀に3度発生したパンデミックスペイン風邪(1918年)、アジア風邪(1957年)、香港風邪(1968年)の原因ウイルスが、いずれも鳥のインフルエンザウイルスに起源を持つ HA 遺伝子を有していたことから、新たなパンデミックウイルスも鳥のウイルスに由来する可能性が高い。特に近年、H5N1、H9N2、あるいは H7N7 といった、人類が十分な基礎免疫を有していないと考えられる亜型の鳥インフルエンザウイルスに関して、死亡例を伴うヒトへの直接的な感染例が相次いで報告されていることから、新たなパンデミックの発生が危惧されている。

本研究では、インフルエンザパンデミックの発生に備え、新規抗ウイルス薬のターゲット同定のため、組み換えウイルスを作出し、ウイルス蛋白質の性状解析を行った。さらに、効率的なワクチン製造のため、既存のウイルス合成技術を改良した。

第 1 章 A 型インフルエンザウイルス増殖における NP 核移行シグナルの重要性

現在認可されているインフルエンザ治療薬は、その作用機序により、M2 蛋白質の機能抑制剤とノイラミニダーゼ活性阻害薬の 2 種類に大別される。しかし、現在アジアを中心に猛威を振るっている H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの中には、すでにこれらの抗ウイルス薬に対する耐性を示すウイルスが現れており、作用機序の異なる新たな抗ウイルス薬の開発が求められている。vRNA の転写・複製過程は、ウイルス増殖に不可欠であると共に、インフルエンザウイルス特有のプロセスであることから、新規抗インフルエンザ薬の理想的な標的候補と考えられる。

A 型インフルエンザウイルスの vRNP 形成を介した vRNA 転写・複製は、感染細胞の核内で行われる。vRNP の最も主要な構成蛋白質である NP は、核移行シグナル (NLS) として働く 2 つのアミノ酸配列を有するが、各 NLS のウイルス増殖に与える影響は不明であった。本研究では、これら 2 つの NLS の、ウイルス複製過程における重要性を明らかにすることを目的として、各 NLS あるいは両 NLS の核内移行に重要と考えられるアミノ酸残基に変異を導入し、NP の性状解析を行った。

変異導入による NP の細胞内局在の変化から、2 つの NLS のうち、一方 (NLS1) は NP の核内移行に、他方 (NLS2) は核小体移行に重要であることがわかった。また、NLS1 の変異が、vRNA 転写や感染性ウイルス様粒子の形成に与える影響は限られたものであったのに対し、NLS2 の変異は vRNA 転写を著しく抑制した。

さらに、各 NLS の変異がウイルス増殖に与える影響を調べるため、NP RNA 分節のパッケージングシグナル (RNA 分節がウイルス粒子内に効率よく取り込まれるために必要な塩基配列) の同定を試み、NP RNA 分節両末端の非翻訳領域とそれに隣接する翻訳領域、特に 3'側の翻訳領域 60 塩基と 5'側の翻訳領域 120 塩基が、NP RNA 分節の粒子内取り込みに重要な役割を果たしていることを明らかにした。そしてこの結果をもとに、3'側パッケージングシグナルと蛋白質翻訳領域を分離した、組換

え NP RNA 分節を有するウイルスを作出した。この組換えウイルスは、野生型ウイルスと同程度の増殖性を示したが、NLS1 に変異を導入した場合には増殖性が著しく低下した。また、NLS2 に変異を導入した組み換えウイルスは、作出できなかった。これらの結果から、効率の良いウイルス増殖には、NP の有する 2 つの NLS が協調して働く必要があり、特に核小体移行を司る NLS2 は、ウイルス増殖に不可欠であることがわかった。

本研究は、vRNA 転写における NP の核小体移行の重要性を初めて明らかにしたものであり、この過程が、新規抗ウイルス薬開発のためのターゲットとなりうることを示唆している。また、同定した NP RNA 分節のパッケージングシグナルは、これまで報告されてきた他の RNA 分節の結果と良く似ており、A 型インフルエンザウイルスの分節化 RNA ゲノムがウイルス粒子内に取り込まれる機構を明らかにする上で、重要な知見と考えられる。

第 2 章 アデノウイルスベクターを用いた A 型インフルエンザウイルスの

リバーシジェネティクス法

H5N1 ウイルスのような高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するワクチン開発においては、ワクチン増幅過程で用いる鶏胚に対する高い病原性や、ワクチン生産業者の危険性が障害となり、既存のウイルス株をワクチンシードウイルスとして用いることができない。クローン化 cDNA をコードしたプラスミドを細胞へ導入し、A 型インフルエンザウイルスを人工合成する技術(リバーシジェネティクス法)は、任意の遺伝子改変により抗原性を変化させずに弱毒化させた H5N1 亜型ウイルスの作出が可能なることから、パンデミックワクチン開発に応用されている。しかし、WHO がリバーシジェネティクス法によるワクチンシードウイルスの作製に推奨している Vero 細胞は、プラスミド導入効率が低いため、時としてワクチン候補株の作製が困難な場合がある。本

研究では、Vero 細胞において A 型インフルエンザウイルスを効率よく作製する系の確立を目的として、Vero 細胞への遺伝子導入効率が高く、遺伝子治療などを含めた幅広い臨床応用実績を誇る非増殖型アデノウイルスベクター(AdV)を用いた、新たなリバーシジェネティクス法の確立を試みた。

従来のリバーシジェネティクス法において、プラスミドからの A 型インフルエンザウイルス RNA(vRNA)発現に利用していた RNA ポリメラーゼ I (Pol I) のプロモーターおよびターミネーター配列を、翻訳領域を GFP 遺伝子に置換したレポーターvRNA の cDNA と共に AdV の遺伝子に挿入し、Vero 細胞へ感染させたところ、vRNA 転写・複製の基本単位である RNA-核蛋白質複合体(vRNP)の形成に必要な 4 種類の蛋白質(PB2、PB1、PA、NP)の存在下でのみ、GFP 発現が見られた。特に、上述の 4 種類の蛋白質も AdV で供給した場合、ほぼ全ての細胞で GFP が発現したことから、AdV 感染 Vero 細胞内の効率的な vRNA 転写・複製が示された。この結果を受けて、A 型インフルエンザウイルスの分節化した 8 種類の RNA 遺伝子を発現する AdV を各々作製し、4 種類の蛋白質発現 AdV と共に Vero 細胞へ感染させたところ、培養上清中に約 10^4 pfu/ml の A 型インフルエンザウイルスが産生された。さらに、Pol I 転写ユニットを RNA ポリメラーゼ II プロモーター制御下にコードさせることで、vRNA と mRNA の両方を発現する AdV の作製に成功した。全 8 分節に対応した vRNA-mRNA 共発現 AdV を各々作製して Vero 細胞へ感染させたところ、培養上清中には約 10^5 pfu/ml の A 型インフルエンザウイルスが産生された。並行して行った 12 種類のプラスミド導入による従来法、ならびに最近報告された、転写ユニットを連結した 3 種類のプラスミド導入する方法で産生されたウイルスカバレッジが、それぞれ約 10^4 pfu/ml であったことから、今回確立した vRNA-mRNA 共発現 AdV によるリバーシジェネティクス法は、Vero 細胞において従来法より 1 万倍以上効率よくウイルスを作製することができ、ワクチンシードウイルスの作製に有用であることが示された。