

論文内容の要旨

論文題目 The molecular basis for the high virulence of H5N1 influenza viruses
(H5N1 インフルエンザウイルス高病原性発揮の分子基盤)

■井博貴

■:ひとやねにテ(今の異体字)

[背景]

A 型インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科に属し、8 本に分節化したマイナス鎖の一本鎖 RNA をゲノムとして持つ。ウイルス粒子表面上の 2 つのタンパク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って複数の亜型に分類され、HA と NA の組み合わせにより H1N1 から H16N9 までの亜型名が付けられている。高病原性 H5N1 インフルエンザウイルスは、1997 年香港で 18 名に感染し、うち 6 名が死亡するアウトブレイクを引き起こした。その後流行は終息したかには見えなかったが、2003 年にベトナムで再び流行し始め、その後、アジア、中東、アフリカで人への感染が確認されている。2003 年～2010 年までの 8 年間に合計 500 名以上の感染例が報告されている。死亡者も 300 名を超え、その致死率は約 60% である。現在までのところ H5N1 インフルエンザウイルスの人への感染は限られており、人から人へ感染する能力は獲得していないと考えられる。一方 2009 年 4 月メキシコ及びアメリカで確認された新型インフルエンザウイルスは 2010 年にかけて世界的大流行を引き起こした。この新型インフルエンザウイルスは H1N1 亜型で、高病原性 H5N1 インフルエンザウイルスに比べると病原性が低いが、人への感染力は極めて強い。高病原性 H5N1 インフルエンザウイルスがこの様な強い感染力を得て新たな世界的大流行を引き起こした場合、社会に及ぼす影響は甚大である。

先行研究により、病原性に関与するインフルエンザウイルスタンパク質のアミノ酸残基が同定されている。例えば A 型インフルエンザウイルスの HA タンパク質はタンパク質分解酵素によって 2 つに開裂することで細胞とウイルス粒子の膜融合に関わるが、高病原性の H5N1 亜型はこの開裂部位に塩基性アミノ酸残基を連続して持つため、全身の細胞に普遍的に存在するタンパク質分解酵素によって開裂し全身で増殖が可能と考えられている。このようなインフルエンザウイルスの病原性を決定するアミノ酸残基の違いは複数報告されており、それぞれのアミノ酸残基に対して解析が進められている。しかし既知の病原性を決定するアミノ酸残基が全て同一であるにも関わらず、病原性の異なるウイルス株が存在しており、未知の病原性決定アミノ酸残基の存在が示唆される。

[目的]

H5N1 インフルエンザウイルスの新規病原性決定アミノ酸残基を同定し、その病原性発揮の分子メカニズムを解明する。

[着眼点]

インフルエンザウイルス感染のモデル動物であるフェレットを用いて、13株の H5N1 インフルエンザウイルスを感染させたところ、67%の致死率を示すウイルス株 A/Vietnam/UT3062/04(UT3062 株)と、0%の致死率を示すウイルス株 A/Vietnam/UT3028/04(UT3028 株)を見出した。この病原性の大きく異なる 2 株に注目し、両者の違いを調べることで H5N1 インフルエンザウイルスの病原性メカニズムを明らかにできると考えた。ゲノム配列解析の結果、UT3062 株と UT3028 株のタンパク質のアミノ酸残基は 0.4%(18ヶ所)異なっていた。しかし先行研究によって H5N1 インフルエンザウイルスの病原性に関わるアミノ酸残基として知られていた HA タンパク質の開列部位や PB2 タンパク質の 627 番目及び 701 番目アミノ酸残基は両者のウイルス間で同一であったため、病原性を決定する新規のアミノ酸残基の存在が予測された。

[方法]

ウイルスゲノムとウイルスタンパク質をコードしたプラスミドを細胞にトランスフェクションするリバーシジェネティクス法を用いると、遺伝子を組み換えたリアソータントウイルスを作製することが可能である。この方法を用いて UT3062 株と UT3028 株のリアソータントウイルスを作製し、フェレットに感染させて、UT3062 株の病原性を決定するアミノ酸残基を同定した。続いて、①フェレットの各臓器におけるウイルス増殖及び病理学的解析、②細胞とウイルスの結合力の解析、③感染細胞におけるインターフェロン応答の解析、を行った。このうち②と③の実験は、本研究で見出した病原性決定因子である HA タンパク質と NS1 タンパク質の既知機能に基づいている。

まず臓器におけるウイルス増殖を解析するため UT3062 株と UT3028 株、並びにそのリアソータントウイルスをそれぞれフェレットに接種し、接種後 1、3、5、7 日目に安楽死させ、各臓器におけるウイルス感染価を測定した。また採取した肺のマクロ及び組織病理解析を新矢恭子先生(神戸大学)との共同研究により行った。次に、細胞とウイルスの結合力を調べるため、インフルエンザウイルスのレセプターを持つニワトリ赤血球を用いたウイルス溶出アッセイを行った。赤血球とウイルス(64HA 価)を 4°C で 1 時間静置して、赤血球凝集を起こさせた後、37°C における、ウイルスの赤血球からの溶出を経時的に測定した。最後に、インターフェロン応答を解析するために、ミンク肺上皮細胞(Mv1Lu 細胞)にウイルスを接種して 12、18、24 時間後に上清を回収した。この上清中にはインターフェロンと H5N1 インフルエンザウイルスが含まれると考えられるので、紫外線と中和抗体を用いて H5N1 インフルエンザウイルス

を不活化した。このウイルス不活化上清を新しい Mv1Lu 細胞に処理して 22 時間培養した。その細胞を用いて水泡性口内炎ウイルス(VSV)の感染効率を、プラークアッセイにより測定した。VSV の感染価はインターフェロン産生量に相関し、H5N1 ウイルスの NS1 のインターフェロン拮抗作用が強いと VSV の感染価は高くなると考えられる。

【結果と考察】

作製したリアソータントウイルスのうち、HA と NS と呼ばれる遺伝子分節が両方とも UT3062 株由来であるとフェレットに対して強い病原性を示し、いずれかが UT3028 株由来であるとフェレットに対して弱い病原性を示した(図 1)。次にフェレットの各臓器でのウイルス増殖の違いを調べたところ、UT3028 株は接種後 1～3 日目において主に呼吸器で増殖するのに対し、UT3062 株は接種後 7 日まで持続的に全身の臓器で増殖した。また HA と NS のみが UT3062 株由来で残りの遺伝子分節が UT3028 株由来のリアソータントウイルスも、UT3062 株同様に全身の臓器で持続的に増殖した。このことから、HA と NS 遺伝子が、フェレットにおける持続的な全身感染を決定していることが分かった。

また病理解析の結果、UT3062 株と UT3028 株間で 3 つの大きな違いが観察された。まず接種後 1 日目の生体反応の違いとして、UT3062 株を接種したフェレットでは、気管支周囲や気管支上皮細胞間への好酸球浸潤が見られたのに対し、UT3028 株を接種したフェレットでは、肺泡や細気管支内腔への好中球浸潤が顕著であった。次に、接種 1 日目の所属リンパ節でのウイルス増殖をウイルスに対する抗体を用いて解析したところ UT3062 株はウイルス増殖が観察されたが UT3028 株は観察されなかった。最後に、UT3062 株を接種したフェレットでは 3 日目においてもウイルス抗原が検出され続け、個体によっては 5 及び 7 日目にもウイルス分布が拡大していた。またこのような個体ではリンパ球・マクロファージ浸潤の程度が乏しかった。一方、UT3028 株を接種したフェレットでは 1 例を除いて 3 日目以降は肺炎病巣にウイルス抗原が検出されず、炎症反応も好中球からリンパ球・マクロファージの浸潤と再生性変化に置き換わっていく像が観察された。また HA と NS のみが UT3062 株由来で残りの遺伝子分節が UT3028 株由来のリアソータントウイルスについては、3 日目及び 7 日目の病理解析のみ行ったが、UT3062 株と同様のウイルス抗原の広がりや炎症反応が観察された。

Virus	Genotype								Lethality (n)
	PB1	PB2	PA	NP	HA	NA	M	NS	
UT3028	□	□	□	□	□	□	□	□	0% (3)
UT3062	■	■	■	■	■	■	■	■	67% (6)
3062(NP+HA+NA+NS)	□	□	□	■	■	■	□	■	67% (6)
3062(Pol+HA+NA+NS)	■	■	■	□	■	■	□	■	50% (6)
3062(HA+NA+NS)	□	□	□	■	■	■	□	■	33% (6)
3062(NP+HA+NS)	□	□	■	■	□	□	□	■	100% (6)
3062(Pol+NP+NS)	■	■	■	■	□	□	□	■	0% (3)
3062(Pol+NP+HA+NA)	■	■	■	■	■	■	□	□	0% (3)
3062(Pol+NP)	■	■	■	■	□	□	□	□	0% (3)
3062(Pol)	■	■	■	□	□	□	□	□	0% (3)
3062(HA+NA)	□	□	□	□	■	■	□	□	0% (3)
3062(Pol+HA+NA)	■	■	■	□	■	■	□	□	0% (3)
3062(HA)	□	□	□	□	■	■	□	□	0% (6)
3062(NS)	□	□	□	□	□	□	□	■	0% (3)
3062(HA+NS)	□	□	□	□	■	□	□	■	83% (6)

図 1. HA と NS 遺伝子分節がフェレットにおける病原性に関与している

続いて HA 遺伝子にコードされる HA タンパク質の細胞への結合能と NS 遺伝子にコードされる NS1 タンパク質のインターフェロン拮抗作用に注目して解析を進めた。

まず UT3062 株と UT3028 株の HA タンパク質と細胞の結合力の違いを調べるため、ニワトリ赤血球からのウイルス溶出アッセイを行った。その結果、UT3028 株の HA を持つリアソータントウイルスは 1~4 時間後までにウイルスが溶出したのに対して、UT3062 株の HA を持つリアソータントウイルスは 20 時間後においてもウイルスの溶出は観察されなかった (図 2)。このことは、HA タンパク質の 134 番目のアミノ酸の違いによって、UT3062 株が UT3028 株よりも細胞のレセプターに強く結合していることを示している。この性質が UT3062 株の高病原性に関与していると考えられる。

次に NS1 タンパク質のインターフェロン拮抗作用の違いを調べた。その結果、UT3028 株の感染 24 時間後の細胞上清を処理した細胞では、mock 感染に比べて有意に VSV の増殖を抑えた。一方、UT3062 株のそれは mock 感染と比べて有意な差が見られなかった (図 3)。また NS 遺伝子のみ UT3028 株で、残りの遺伝子を UT3062 株にしたリアソータントウイルスと、その逆の組合せのリアソータントウイルスを用いた実験から、これ

らの VSV 増殖における差はインフルエンザウイルスの NS 遺伝子によって制御されることが示された。このことは、NS1 タンパク質の 200 及び 205 番目アミノ酸の違いによって、UT3062 株が UT3028 株よりも強いインターフェロン拮抗作用を持つことを示唆している。この性質も UT3062 株の高病原性に関与していると考えられる。

本研究により H5N1 インフルエンザウイルス株 A/Vietnam/UT3062/04 の新規病原性決定アミノ酸残基として HA タンパク質の 134 番目アミノ酸残基及び NS1 タンパク質の 200 及び 205 番目アミノ酸残基を見出した。また、HA タンパク質の 134 番目アミノ酸はレセプター結合に関与すること、NS1 タンパク質の 200 及び 205 番目アミノ酸はインターフェロン拮抗作用に関与することを明らかにした。

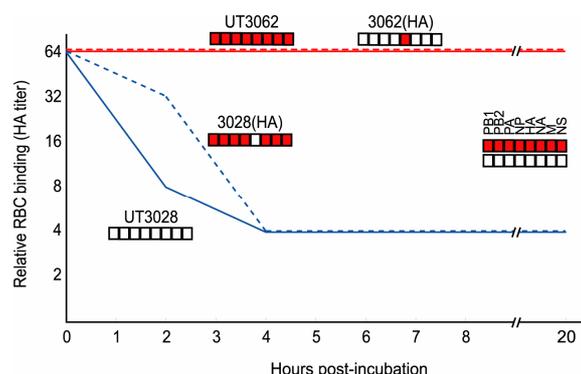


図 2. UT3062 株と UT3028 株は赤血球からのウイルス溶出が異なる

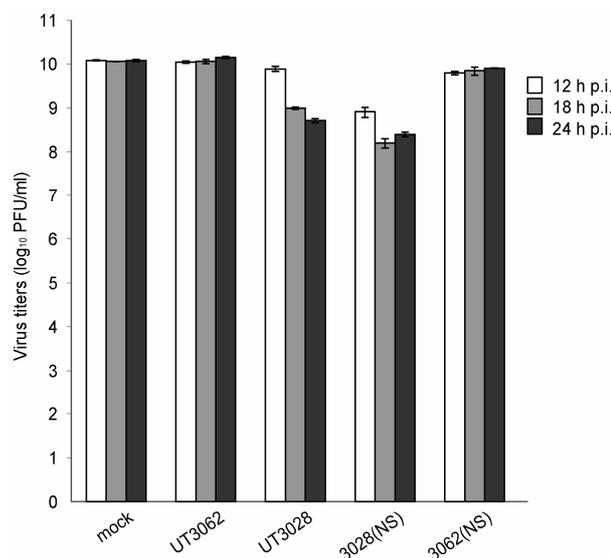


図 3. UT3062 株の NS はインターフェロン拮抗作用を促進する