

論文審査の結果の要旨

氏名 今井博貴

本論文は H5N1 インフルエンザウイルスの高病原性発揮の分子メカニズムについて解析したものである。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、複数の異なる人から分離された H5N1 インフルエンザウイルスの病原性を比較した。その結果、H5N1 インフルエンザウイルスは、株によってフェレットに対する病原性が異なることを示した。

用いた H5N1 ウイルス株のうち、高い致死率を示すウイルス株 A/Vietnam/UT3062/04(UT3062 株)と、低い致死率を示すウイルス株 A/Vietnam/UT3028/04(UT3028 株)に着目し、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の解明を試みた。2 株を選択する際、ゲノム配列を調べて、既知の病原性を決定するアミノ酸に違いがないことを確かめたことで、新規病原性決定因子の存在を確実にしている。

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て、強毒の UT3062 株と弱毒の UT3028 株の遺伝子分節を組み換えた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の同定を試みた。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強毒の 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、いずれかが弱毒の 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。両株の HA と NS 遺伝子分節の配列を調べた結果、HA タンパク質のアミノ酸 1 箇所、NS1 及び NS2 タンパク質のアミノ酸 4 箇所に違いを見出した。これらの H5N1 インフルエンザウイルスの病原性を決定するアミノ酸はいずれも新規のものであり、ウイルス学における重要な知見である。

また、フェレットの各臓器におけるウイルス増殖の違いを調べるとともに、肺のマクロ及び組織病理解析を行った。その結果、強毒の UT3062 株は弱毒の UT3028 株に比べて長期間に渡り持続的にかつ全身の臓器で増殖することを示した。また HA と NS 遺伝子分節のみが強毒の UT3062 株由来で残りの遺伝子分節が弱毒の UT3028 株由来のリアソータントウイルスも、UT3062 株同様に持続的に全身の臓器で増殖した。これにより HA と NS 遺伝子分節が、フェレットにおける持続的な全身感染に関与していることを示した。また病理解析の結果、UT3062 株と UT3028 株間で 3 つの大きな違いを明らかにした。まず接種後 1 日目の生体反応の違いとして、強毒の 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、弱毒の UT3028 株を接種したフェレットでは、肺胞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強毒の UT3062 株はウイルス増殖が観察されたが弱毒の UT3028 株は観察されなかった。最後に、強毒の 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、弱毒の 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 遺伝子分節のみが強毒の UT3062 株由来で残りの遺伝子分節が弱毒の UT3028 株由来のリアソータントウイルスについても、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。これらの成果は、ウイルス学・免疫学の両学問領域において重要な知見である。

更に、両株間で違いのあった HA タンパク質の 134 番目のアミノ酸の役割を解明するため、レセプター結合能の解析を行っている。HA タンパク質の立体構造を基に、134 番目のアミノ酸がレセプター結合部位の近傍に位置していることから、論文提出者はこの機能に着目している。また既存のアッセイ系では差が見られなかったため、従来は別の目的で用いられていたアッセイ系であるウイルス溶出アッセイを転用して HA のレセプター結合能の違いを調べている。その結果、HA の 134 番目のアミノ酸がレセプター結合能に関与することを明らかにした。

最後に、NS1 の 200 番目・205 番目アミノ酸の役割を調べるため、NS1 の主要な機能として知られるインターフェロン拮抗作用に着目して解析を行っている。インターフェロンに対して感受性の高い水泡性口内炎ウイルス(VSV)を用いることで、両株のインターフェロン拮抗作用における微小な差の検出を試みた。その結果、強毒の UT3062 株の NS1 が弱毒の UT3028 株の NS1 よりも強いインターフェロン拮抗作用を持つことを示した。また NS1 の 200 番目と 205 番目の両方のアミノ酸がこのインターフェロン拮抗作用に重要であることも示した。

フェレットは優れたモデル動物であるが、遺伝子情報・抗体・細胞など解析に必要な情報・材料が十分に入手できない現状がある。この点を、アッセイ系の工夫によってうまく克服して解析を進めたことは評価に値する。

本論分において、論文提出者は 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。

本研究から得られた知見は、ウイルス学・免疫学などの諸分野においてインパクトを持つと同時に、治療薬・ワクチン開発などにおいても役立つことが期待される。これらの研究成果は、PLoS Pathogens に掲載された。

なお、本論文は新矢恭子、高野量、木曾真紀、村本裕紀子、坂部沙織、村上晋、伊藤睦美、山田晋弥、Mai thi Quynh Le、Chairul A. Nidom、坂井(田川)優子、高橋慧、大森康之、野田岳志、下島昌幸、角川学士、五藤秀男、岩附(堀本)研子、堀本泰介、河岡義裕との共同研究であるが、論文提出者が主体となって計画および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。