

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： インフルエンザウイルス感染過程の解明とその応用

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者

河岡 義裕（東京大学医科学研究所 教授）

主たる共同研究者

ハインツ・フェルトマン（カナダ科学研究所、高病原性病原体研究部 部長）

3. 研究内容及び成果：

インフルエンザウイルスを構成する個々の蛋白質については、それらの合成、細胞内輸送、そして構造や機能について、かなり詳細な知識が集積している。これら着実な基礎研究の進展にもかかわらず、未だ効果的な予防・治療方法が確立されていない。そこで、本研究では、ウイルスと宿主との相互作用について分子レベルで理解を深めることを目的とした。

I. インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構の解明

ウイルスは、細胞に侵入後、細胞内で多数のウイルスゲノムとウイルス蛋白質を合成した後に、それらのパーツがアセンブリーされて、自身のコピーウイルスが製造される。しかし、子孫ウイルスが作られるためには、宿主細胞内の数多くの核酸プールの中からウイルスゲノムだけを選択的に釣り上げてくるメカニズムが必要である。インフルエンザウイルスのゲノムのパッケージングメカニズムについてはほとんどわかっておらず、ウイルス学の古典的命題であった。

そこで、私たちが開発したインフルエンザウイルスの人工合成法(リバーシ・ジェネティクス)を用いて、分節が6本、あるいは7本しかないウイルスを作出し、それらの粒子形成効率を野生型ウイルス(8分節)と比較した。その結果、効率良くウイルス粒子を形成するためには8種類全てのRNA分節が必要であることがわかった。この結果は、8種類のRNA分節が選択的に取り込まれるメカニズムが存在することを示唆している。次に、ウイルスRNA分節の粒子への取り込みに必要な部分、すなわちパッケージング・シグナルについて調べた。いずれの分節も、翻訳領域の両末端とそれに隣接する分節特異的非翻訳領域にパッケージング・シグナルが存在することが明らかとなった。すなわち、各RNA分節には、それぞれ異なるパッケージング・シグナルが存在することがわかった。さらに、インフルエンザウイルスのRNAがどのようにウイルス粒子に取り込まれているかについて解析したところ、ウイルス粒子内に太さ約15nmの棒状構造物が含まれていた。この棒状構造物は出芽中のウイルス粒子の先端でエンベロープと結合し、ウイルスの出芽方向と平行に存在していた。ひとつのウイルス粒子内に存在する棒状構造物の最大数は8つで、ウイルス粒子の多くは、中心に1つ、その周囲に7つという特徴的な配置をとった8つの構造物を含んでいた。ウイルス粒子内の8本の棒状構造物の長さは同一ではなかった。以上の成績から、インフルエンザウイルスの8種類の異なるRNA分節は一つのセットとしてウイルス粒子に取り込まれ、8種類のRNA分節の集合には各分節の両末端に存在する分節固有の構造が重要であることが明らかになった。

II. インフルエンザウイルス・ゲノムのパッケージング・シグナルの知見に基づく新規ワクチンの開発

i) 次世代インフルエンザ弱毒生ワクチンの開発 現在広く用いられている不活化インフルエンザワクチンは、呼吸器に効果的な粘膜免疫を誘導できない。そのため、症状の軽減には効果を発揮するが、感染そのものの予

防効果には限界がある。米国で実用化された弱毒生ワクチンはA型2種類とB型1種類のウイルスを混合したワクチンである。したがって、ウイルス間の干渉作用(A型ウイルスによるB型ウイルスの増殖抑制)によるワクチン効果の減少が指摘されている。この問題点を克服するために、B型ウイルスの表面糖蛋白質(HAとNA)をもつA型キメラウイルスを作製し、そのワクチンとしての可能性を検討した。このA/Bキメラウイルスは、マウスにおいてB型ウイルスの致死的な攻撃を回避する感染防御免疫を付与することができた。このようなキメラウイルスは、A型ワクチンウイルスと干渉しないB型ワクチンウイルスとして応用できる。

ii) インフルエンザウイルスを基にした多価ワクチンの開発 一度に複数の感染症に対する免疫を付加させる混合ならびに多価ワクチンの需要は高い。現在、利用されている混合・多価ワクチンならびに同時投与が可能なワクチンはいくつかあるが、MMR(三種混合ワクチン;はしか、風疹、おたふく風邪)を除いては不活化ワクチンの組み合わせが主である。多くのウイルス感染症において、自然感染に倣って投与される生ワクチンが不活化ワクチンよりも効果的であるが、弱毒生ワクチンでは、ウイルス同士の干渉作用によって免疫が誘導されないことがあるため、一ヶ月以上の間隔をおいて単品投与することが基本である。そこで、呼吸器疾患を引き起こすパラインフルエンザウイルスの感染防御抗原を発現する組み換えインフルエンザウイルスを作製することによりウイルス性呼吸器疾患に対する多価ワクチンの開発を試みた。インフルエンザウイルスのNA遺伝子の翻訳領域をパラインフルエンザウイルスの感染防御抗原であるHN蛋白質遺伝子に置き換えた組み換えウイルスを作製した。作製した組み換えウイルスは、発育鶏卵においてよく増殖した。また、発育鶏卵で10代継代を重ねても増殖効率に変化は見られず、HAとHNの両抗原の発現も安定していた。しかも、マウスでは組み換えウイルスの基にしたインフルエンザウイルスが致死的なものに対して、組み換えウイルスは弱毒化していた。さらに、組み換えウイルスを経鼻接種したマウスを、致死量のインフルエンザあるいはパラインフルエンザウイルスで攻撃したところ、いずれのウイルスに対しても100%生残した。以上の成績は、インフルエンザウイルスがワクチンベクターとして優れた特性を有していることを示している。

III. スペイン風邪ウイルスの病原性発現機構

何故、1918年に世界的な大流行を起こしたスペイン風邪は、通常の流行とは異なり多くの犠牲者を出したのか、その実態は謎であった。そこで、スペイン風邪ウイルスをリバーズ・ジェネティクスで人工合成し、サルにおける感染実験を行った。対照として用いた通常のヒト由来インフルエンザウイルスに感染したサルでは、ほとんど症状は認められず、軽度の炎症しか認められなかった。一方、スペイン風邪ウイルスに感染したサルは、感染6日および8日目において臨床症状の悪化から安楽死を余儀なくされた。ウイルスは、一部のサルの脾臓と心臓から分離されたが、主な増殖部位は呼吸器であった。組織病理学的には、通常のヒト由来ウイルス感染サルでは感染6日目には、ウイルス抗原の消失と治癒傾向が見られたが、スペイン風邪ウイルス感染サルでは殆どの肺葉への病巣拡大とウイルス抗原発現が顕著であった(接種後8日目)。これまでにサルに致死的な感染を起こすインフルエンザウイルスは報告がなく、スペイン風邪ウイルスは明らかにその病原性が通常のウイルスとは異なることが明らかになった。尚、スペイン風邪ウイルスの遺伝子を持ったインフルエンザウイルスを使った研究は、日本には稼働中のP4施設がないため、カナダ科学研究所のグループとの共同実験として行った。

IV. H5N1インフルエンザウイルスのレセプター特異性

すべてのインフルエンザウイルスはシアル酸を末端に持つ糖鎖をレセプターとするが、鳥ウイルスはシアル酸がガラクトースに α 2-3結合(SA α 2,3Gal)したものを、ヒトウイルスはSA α 2,6Galを特異的に認識する。一方、ヒトの気管上皮細胞表面にはSA α 2,6Galが多く存在する。一方、私たちは、鳥ウイルスが増殖するカモの腸管上皮細胞の表面にはSA α 2,3Galが豊富に存在することを明らかにした。このレセプター特異性の違いとレセプター分

子の有無が鳥ウイルスが容易にヒトに感染しない理由と考えられてきた。ところが、1997年以来、高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染し、100名を超える死亡者を出している。私たちは、この矛盾を明らかにするために、ヒト呼吸器におけるインフルエンザウイルスのレセプター分布をシアリルオリゴ糖に特異的なレクチンを用いて解析した。その結果、ヒトの呼吸器の深部にはヒトウイルスのレセプターのみならず鳥ウイルスのレセプターが存在することがわかった。一方、上部気道の細胞では、ヒトウイルスのレセプターのみ発現していた。また、ヒト呼吸器におけるインフルエンザウイルスレセプターの分布は、H5N1ウイルスに感染した患者におけるウイルス増殖とよく一致し、H5N1ウイルス感染症の病態、すなわち重度の下部呼吸器疾患をよく説明している。ヒト呼吸器におけるヒト型と鳥型レセプターの分布の相違は、鳥ウイルスがヒトからヒトへ伝播しにくい原因の一つであると考えられる。すなわち、H5N1ウイルスがヒトからヒトへ効率よく伝播するためには、ウイルスのHAがヒトの上部気道に多く存在するヒト型レセプターを認識できるように変異する必要がある。

次にH5N1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ために必要なアミノ酸変異の同定を試みた。調べた鳥由来H5N1ウイルスはすべてSA α 2,3Galのみを認識したが、一部のヒト由来H5N1ウイルスはSA α 2,3GalのみならずSA α 2,6Galも認識した。そこで、SA α 2,3Galしか認識しないH5N1ウイルスのレセプター認識分子であるHA蛋白質に変異を導入し、SA α 2,6Gal認識に関与するアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、HA分子の2つのアミノ酸がH5N1ウイルスのヒト型レセプター認識に関与していることがわかった。得られた情報は、分離ウイルスのヒトでの増殖効率の予測のための分子マーカーとなる。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

インフルエンザウイルスのゲノム・パッケージング機構の解明、パッケージングシグナルの知見に基づく新規ワクチンの開発、スペイン風邪ウイルスの病原性発現機構、H5N1インフルエンザウイルスのレセプター特異性などの重要課題に対し、世界をリードする貴重な研究成果を挙げた。

これらの研究成果は、論文発表(海外87件、国内20件)、口頭発表(ポスター発表を含む)(海外67件、国内105件)として発表されている。Nature 6件を初め、Proc Natl Acad Sci USA2件、J. Virol26件など、国際的に評価の高い学会誌や国際会議に多くの優れた研究成果を発表し、国際的な評価も高い。

下記はその中でも特筆すべきものである。

- 1) インフルエンザウイルスのゲノム・パッケージングのメカニズムを明らかにした。この成果は、本ウイルス増殖過程における重要なステップの解明につながるとともに、新規インフルエンザワクチンやワクチンベクターの開発につながる成果である。
- 2) 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの伝播のメカニズムならびに抗ウイルス薬耐性株の出現機構を明らかにした。本研究期間中に、H5N1鳥インフルエンザウイルスがアジア各地に蔓延し、さらにヨーロッパ・アフリカにも伝播し、現在も本ウイルスに感染し死亡したという症例の報告が相次いでいる。このような状況の中、新型ウイルス出現時の対策を考える上で重要な知見を提示した。
- 3) H5N1鳥インフルエンザウイルスが人から人へ伝播する能力を獲得しパンデミックを起こすようなウイルスに変化した場合を想定し、過去の高病原性インフルエンザウイルスの病原性を解明する必要性が生じた。そこで、スペイン風邪ウイルスの再合成ならびにサルでの感染実験をカナダ科学研究所のP4施設で行った。得られた成績は、スペイン風邪ウイルスのみならずH5N1ウイルスなど高病原性インフルエンザ感染症に共通のメカニズムの解明につながる重要な知見を提示した。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

突出した研究成果を得たもので、基礎的にも医学応用的にも大きく貢献するものと高く評価される。新興再

興感染症、特に新たなインフルエンザの流行が危惧されている今、河岡らの国際的な視野にたった研究は、ウイルス学のみならず、インフルエンザウイルス伝圧において大きな貢献をするものである。カナダやベトナム、タイとの共同研究も効果的であった。

インフルエンザウイルスのゲノム・パッケージ機構の解明は、新規インフルエンザワクチンならびにワクチンベクターの開発につながる。現在、実験動物レベルで効果の高いインフルエンザワクチンの作製にも成功している。本研究の技術的インパクトは高く、今後大いに発展し、科学技術へ大いに貢献するものと思われる。

また、H5N1ウイルスの解析結果は、パンデミック対策を行う上で重要な情報である。さらに、スペイン風邪ウイルスを再合成し、その解析から、高病原性インフルエンザウイルス共通の病原性発揮のメカニズム解明の一端を明らかにした。この成果は、H5N1ウイルス感染者の治療方法の確立に向けて重要で、その社会的貢献は大きい。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本研究期間中に、H5N1鳥インフルエンザウイルスがその勢力を拡大し、アジアのみならずヨーロッパやアフリカにも流行が広がり、パンデミックの可能性が危惧されるようになった。このような状況をふまえ、新規ワクチンの開発、鳥インフルエンザウイルスがパンデミックを起こすように変化するメカニズムの解明に関する研究、そして薬剤耐性ウイルスの研究も行い、パンデミックの抑制に寄与すること、あるいはパンデミックが起こった際に有用な情報を提供することができた。

H5N1鳥インフルエンザウイルスのアジアでの現状把握のため、ベトナムならびにインドネシアの研究者と共同研究することが重要となり、研究室員の海外派遣、そして海外研究者の招聘を通じ、積極的に海外研究者との共同研究を展開した。従来の研究費では対応することのできないこのような緊急の案件に関し、戦略的創造研究推進事業ならではの柔軟な対応により、迅速に共同研究を進めることができたことは特筆すべき点であると思われる。

また、高病原性ウイルスを扱うP4施設が日本では稼働していないため、カナダのP4施設での研究を余儀なくされたが、これに関しても本事業ならではの柔軟な対応により研究を効率よく円滑にすすめることができた。

本研究成果を踏まえて、高田礼人博士が北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター教授に就任した。

本研究期間中に、研究代表者の河岡義裕教授がロベルト・コッホ賞(2006年11月)を受賞した。