

## 2010年度(第42回)内藤記念科学振興財団贈呈式の中止と科学振興賞の授与

3月11日の東日本大震災に伴う諸般の事情により、3月17日(木)に開催が予定されていましたが、2010年度(第42回)内藤記念科学振興財団贈呈式及び記念祝賀パーティは中止といたしました。

なお、2010年度(第42回)内藤記念科学振興賞受賞者である東京大学医科学研究所ウイルス感染分野教授河岡義裕先生への授与式は3月17日(木)河岡先生の教授室にて行われ、内藤晴夫理事長より、贈呈書、正賞の金メダルなどが授与されました。



## \* 第42回内藤記念科学振興賞受賞研究 \*

### テーマ インフルエンザ制圧に関する研究

Studies on the control of influenza

研究者 東京大学医科学研究所 感染免疫部門 ウイルス感染分野 教授 かわ おか よし ひろ  
獣医学博士 河 岡 義 裕

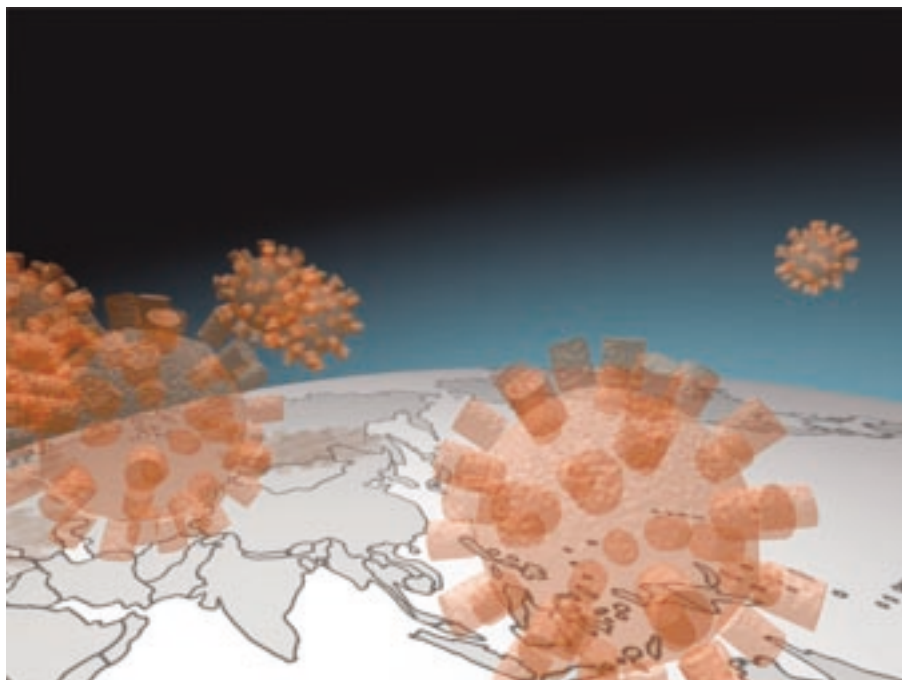
Kawaoka Yoshihiro. DVM, Ph.D., Professor  
Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology,  
Institute of Medical Science, University of Tokyo

推薦者 日本ウイルス学会 理事長 やなぎ ゆう すけ  
柳 雄 介

#### 研究業績概要

インフルエンザウイルスは、毎年、冬に流行し乳幼児や高齢者において死亡の原因となるとともに、数十年に一度新たなウイルスが出現し世界的な大流行（パンデミック）を起こす。実際、2009年春に、ブタ由来インフルエンザウイルスが出現し、21世紀最初のパンデミッ

クを引き起こした。2009年に出現したブタ由来インフルエンザウイルスは、季節性インフルエンザウイルスよりも病原性が強く、季節性インフルエンザでは認められないウイルス性肺炎が数多くの入院患者に認められた。幸い、このウイルスの病原性は、スペイン風邪よりも、はるかに低かったが、1997年に現れたH5N1高病



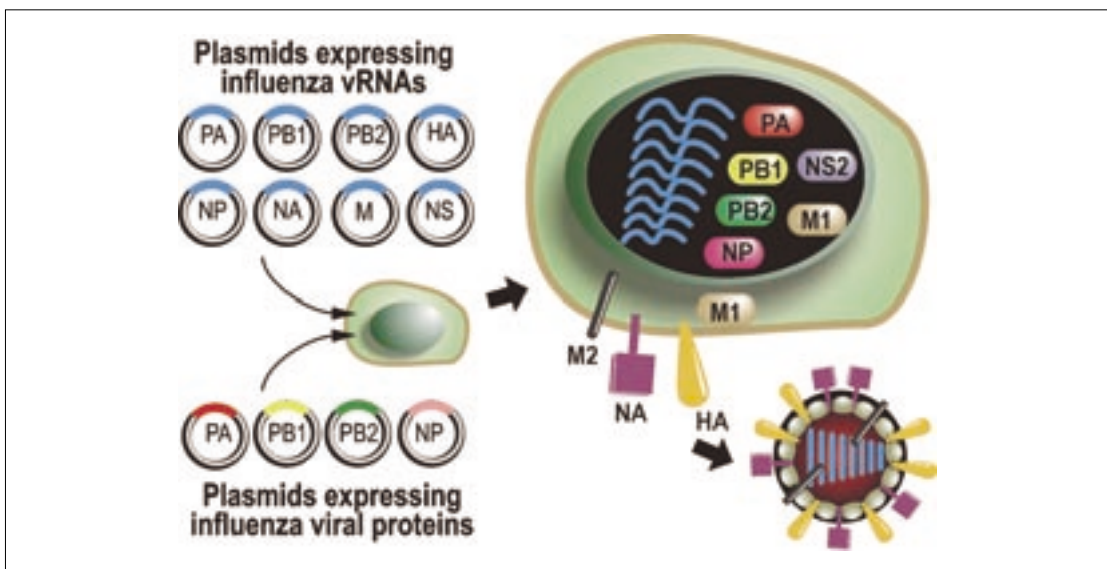
原性鳥インフルエンザウイルスは、未だにアジアのみならずヨーロッパやアフリカの各地に流行を広げている。H5N1ウイルスは、確認されただけで500人以上の人に感染し、致死率は60%にも及ぶ。今のところH5N1ウイルスは人では効率よく伝播しないので、パンデミックには至っていない。しかし、一度そのような能力を獲得すると、世界で4千万人以上の人が死亡したスペイン風邪規模のパンデミックを引き起こすのは必至で、多数の人の死亡ならびに社会機能の麻痺により、国家はパニックに陥ると予測される。

私達は、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開発し、本法を駆使することにより、季節性ならびにパンデミックインフルエンザを制圧するために、本ウイルスを様々な角度から研究している。以下に、これまでの主な研究業績を、Ⅰ．リバーシジェネティクスの開発、Ⅱ．病原性、Ⅲ．宿主特異性、Ⅳ．増殖機構、Ⅴ．ワクチンおよび抗インフルエンザ薬の5つの項目に分けて紹介する。

## Ⅰ．リバーシ・ジェネティクス (ウイルスの人工合成法)の開発

ポリオウイルスのように、ウイルスRNAがそのままmRNAとして働くウイルスでは、ウイルスRNAを細胞に導入すると感染性のあるウイルスができてくる。ところが、インフルエンザウイルスのRNAは、mRNAに相補であるため、そのまま細胞に導入しても何も起こらない。しかも、インフルエンザウイルスのゲノムは8つの分節に分かれている。インフルエンザウイルスのRNAはウイルス核蛋白質 (NP) と3つのサブユニット (PA, PB1, PB2) からなるRNAポリメラーゼと結合して、リボヌクレオ蛋白質複合体 (RNP) を形成する。RNPは、ウイルスRNAからウイルス蛋白質を発現するためのmRNAの転写やウイルスRNA複製の最小単位で、リバーシジェネティクスを成功させるにはこの8種類のRNPを細胞内に形成させる必要があった。

私達はウイルスRNAを効率良く作るために細胞のRNAポリメラーゼⅠ (PolⅠ) を利用した。PolⅠは細胞の核に存在しリボゾームRNAを合成する酵素で、インフルエンザウイルス遺伝子の両端にこの酵素の認識するプロモーターとターミネーターを配置するとウイルスRNAが



核の中で合成される。RNPを細胞内で作るためには、ポリメラーゼ（PA、PB1とPB2）とNPが必要なので、この蛋白質を発現するプラスミドも同時に細胞に導入した。すなわち、PoIIによって作られたウイルスRNAは、プラスミドから供給されたウイルスのポリメラーゼとNPと結合し、実際の感染の場合と同様に核内でRNPを形成する。その結果、すべてのウイルスRNAの蛋白質が細胞内で合成され、 $10^7 \sim 10^8$  個/mlもの感染性ウイルスが細胞外に放出される（図）。本法を用いることにより、プラスミドを細胞に導入するだけで、通常のウイルス感染に匹敵するほど効率よくインフルエンザウイルスが産生されるようになった。

Neumann et al., PNAS, 1999

Neumann et al., PNAS, 2005

## II. 病原性

### 1. 高病原性鳥H5N1インフルエンザウイルスの哺乳類における病原性発現

1997年に香港で、高病原性鳥H5N1インフルエンザウイルスが流行し、18人が感染し6人が亡くなった。この流行により、高病原性鳥H5N1ウイルスが直接ヒトに感染することが示され、鳥が新たなパンデミックを引き起こす直接的な源となりうることが示唆された。さらに2003年12月以降、高病原性鳥H5N1ウイルスはアジア各国およびヨーロッパやアフリカでも流行し、多くの家禽が死亡あるいは殺処分されている。また、ヒトへの感染も報告されており、これまでに500人以上の感染が確認されており、その60%近くが死亡している。しかしながら、この高病原性鳥H5N1インフルエンザウイルスがなぜこのような強い病原性を示すのか、そのメカニズムはいまだ解明されていない。そこで、哺乳動物における高病原性鳥H5N1インフルエンザウイルスの病原性発現に焦点を当てて、その強い病原性の発現および制御に関わるウイルス遺伝子および蛋白質の同定とその機能の解明を試みた。



1997年にヒトから分離されたすべての香港H5N1ウイルスは、ニワトリに対して強毒で、36時間以内にニワトリを殺した。ところが、マウスでは、強い病原性を示すウイルスと、そうではないウイルスに分かれた。マウスに対して強い病原性を示すH5N1ウイルスA/Hong Kong/483/97 (HK483) は、たった1個のウイルスで全身感染を引き起こしマウスを殺した。そのウイルスは、全身の臓器で増殖した。一方、マウスに対して強い病原性を示さなかったウイルスA/Hong Kong/486/97 (HK486) は、1,000個ものウイルスを感染させてもマウスを殺さなかった。また、このウイルスはマウスの呼吸器からしか分離されなかった。そこで、リパースジェネティクス法を用いて、これらのマウスに対して強い病原性を示すHK483ウイルスと病原性を示さないHK486ウイルスを作出した。それぞれのウイルスのPB2蛋白質の627番目のアミノ酸をLysあるいはGluに変えると、HK483ウイルスはマウスに対して弱毒になり、ウイルスは呼吸器からしか分離されなかった。一方、HK486ウイルスは強毒になり、ウイルスは脳を含む全身の臓器から分離された（図）。このことから、PB2蛋白質の627番目のアミノ酸がLysであることが、高病原性鳥H5N1インフルエンザウイルスがマウスにおいて効率よく増殖するために重要であることが明らかとなった。

また、PB2蛋白質の627番目のアミノ酸がLysであるウイルスは、そのアミノ酸がGluであるウイルスよりも、哺乳動物の細胞では、

33℃において効率よく増殖した。これらのウイルスのPB2蛋白質の627番目のアミノ酸をそれぞれ、GluあるいはLysに変えると、逆の成績が得られた。このことは、PB2蛋白質の627番目のアミノ酸は、哺乳類で効率よく増殖するために重要な働きを担うだけでなく、ウイルスが低温で増殖するためにも重要であることが示唆された。人の上部気道は～33℃の低温であることを考慮すると鳥型のGluからヒト型のLysにPB2蛋白質の627番目のアミノ酸が変化することは、鳥のウイルスがヒトの上部気道で効率よく増殖するのに必要な変異であることがわかった。ヒトの上部気道で増殖することにより、ウイルスは咳やくしゃみによりヒトからヒトへ効率よく伝播される。すなわち、PB2蛋白質の627番目のアミノ酸のGluからLysの変異は、鳥インフルエンザウイルスがヒト→ヒト感染を起こすのに必要なアミノ変異であるといえる。

Hatta et al., Science, 2001.

Hatta et al., PLoS Pathogens, 2007

## 2. スペイン風邪ウイルス高病原性発揮の分子機構

スペイン風邪は、1918年から翌年にかけて世界的に流行したH1N1亜型のA型インフルエンザウイルス感染症である。20世紀に人類が経験した新型インフルエンザウイルスの世界的な流行は、スペイン風邪・アジア風邪・香港風邪の3回にわたるが、スペイン風邪では、全世界で4000万人以上の死者が出たといわれている。ところが、当時、インフルエンザウイルスを分離する技術は確立しておらず、流行当時のウイルスは現存しない。そのため、スペイン風邪ウイルスの病原性については不明なままであった。しかし、1999年に私達のグループがインフルエンザウイルスのリバースジェネティクス法を開発したことにより、スペイン風邪罹患者死亡患者の肺組織内から解読されたウイルスの遺伝子情報を基に、流行当時のウイルスの特性を有したウイルスを再現し、病原性解析を行うことが可能となった。

季節性インフルエンザウイルス(A/Kawasaki/173/2001、A/Memphis/8/88)またはマウスに適応したヒト由来インフルエンザウイルス(A/WSN/33)を基に、そのHAをスペイン風邪ウイルス由来(A/South Carolina/1/18)のものに置換えた組換えウイルスを作製した。スペイン風邪ウイルスのHAを有する組換えウイルスを、50%マウス致死量の10倍量(10MLD50)経鼻的に接種されたマウスは、およそ4-8日の経過で死に至った。マウスは呼吸器症状とともに、チアノーゼを呈し死に至った。感染個体内で惹起される免疫応答に注目し、感染マウスにおけるサイトカインならびにケモカインを測定した。スペイン風邪ウイルスのHAを有するウイルスを接種したマウスでは、接種後一日目において、単球遊走因子(MCP-1)、マクロファージ炎症性蛋白(MIP-1b、MIP-2、MIP-3a)、インターロイキン(IL-1b、IL-6、IL-12(p40)、IL-18)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が過剰産生されておりマクロファージの活性化が示唆された。これらの結果より、スペイン風邪ウイルスのHAが、本ウイルスの病原性発現に強く関与している可能性が考えられた。

スペイン風邪ウイルスの遺伝子を合成し、リバースジェネティクス法により1918年のウイルスを再構築した。ついで、マカカ属のサルを用いて、スペイン風邪ウイルスの病原性を解析した。スペイン風邪ウイルスを接種されたサルは、接種後24時間以内に、元気消失、食欲減退、および呼吸器症状を示した。接種後6日目には1頭のサルが安楽死を余儀なくされる状態に陥り、接種後8日目には、残りの全てのサル(3頭)が、呼吸数の増加、血中酸素濃度の低下などの顕著な呼吸器症状を示し、安楽死を行わざるを得なくなった。一方、比較対照として、季節性インフルエンザウイルスを接種されたサルでは、非常に軽度な臨床症状が観察されたのみであった。

スペイン風邪ウイルスを接種されたサル

では、接種後3、6、及び8日目の全てにおいて、上部気道・下部気道の両方から高濃度のウイルスが分離された。一方、季節性インフルエンザウイルスを接種されたサルでは、接種後3および6日目に低い濃度のウイルスが、接種後8日目では扁桃腺からしかウイルスが分離されなかった。

病理解剖時の肉眼所見では、スペイン風邪ウイルスの接種後6および8日目のサルで、60-80%の肺領域への病巣拡大、病巣部での水様または血様液の充満が観察された。季節性ウイルスを接種されたサルに比べて、スペイン風邪ウイルスを接種されたサルでは、多様な肺胞構成細胞がウイルスに感染しており、肺胞腔への細胞の脱落も顕著であった。その後、経過とともに、季節性ウイルスを感染させたサルの肺では、治癒傾向がみられたが、スペイン風邪ウイルスを接種されたサルの肺胞では、肺水腫や血様液の漏出を伴った肺胞障害の進行およびウイルス抗原陽性部位の拡大が見られた(図1)。

更に、スペイン風邪ウイルスに対する宿主の免疫応答を探るため、感染個体の気管支材料を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現を調べ、オントロジー(概念体系)解析をおこなった。季節性ウイルスを接種されたサルの肺では、接種後3日目には免疫関連の遺伝子発現があり、その後、ウイルスの排除とともに細胞の代謝活性の上昇や再生に関わる遺伝子が活性化していた。一方、スペイン風邪ウイルスを接種されたサルでは、免疫関連遺伝子群の持続的な活性化が、経過観察中、継続する傾向が見られた。

免疫反応に関連した遺伝子発現の更なる解析により、スペイン風邪ウイルス接種サルでは、(1)いくつかのサイトカイン遺伝子の発現の遅延がある、(2)季節性ウイルス感染で見られる、I型のインターフェロンとその関連遺伝子(I型インターフェロン刺激遺伝子)の発現上昇が見られない、(3)抗ウイルス活性の発

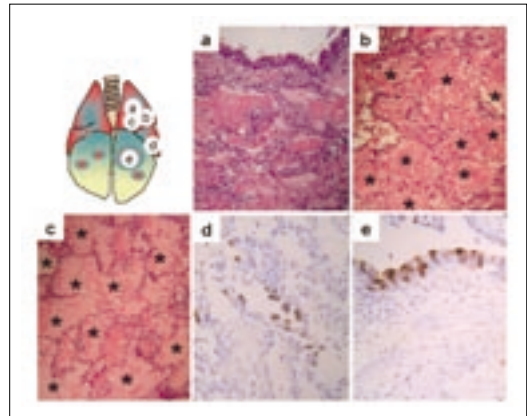


図1. スペイン風邪ウイルスを感染させたサルの肺。接種後8日目には、殆どの部位で硬化病巣が確認され、病巣部には、(a)気管支炎、(b)線維素析出(\*)や炎症細胞浸潤を伴った肺炎、(c)肺胞水腫と血様液の漏出を伴う肺炎(\*)が観察された。ウイルス抗原は、(d)大型の再生肺胞細胞や、(e)細気管支上皮細胞に検出された。

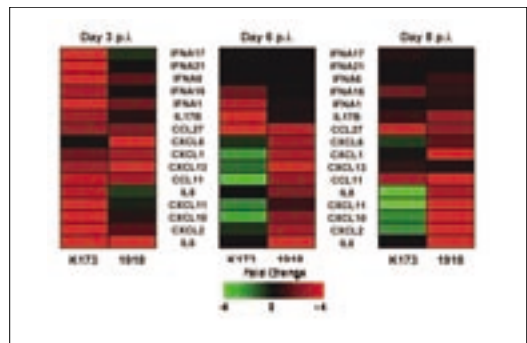


図2. ヒト由来インフルエンザウイルス(K173)または1918年のスペイン風邪ウイルスを感染させたサルの気管支組織のサイトカイン/ケモカイン関連遺伝子のマイクロアレイ解析結果。赤:発現上昇。緑:発現抑制。

揮に関与することが知られているDDX58(syn. RIG-I)やIFIH1(syn. MDA5)の発現が低い、などの特徴が観察された(図2)。これらの所見は、1918年のスペイン風邪ウイルスの感染による予後決定因子のひとつとして、感染時における非定型的な自然免疫反応が関与している可能性を示唆している。

マウスならびに霊長類では、スペイン風邪ウイルスは肺で良く増殖するが、季節性ウイルスは肺では増殖できないことが示唆された。そこで、両者のリアソータントを作出して、調べたところスペイン風邪ウイルスのRNA合成に関与する遺伝子が、本ウイルスの肺での増殖に重要であることが明らかになった。

以上の研究から、1918年当時流行したスペイン風邪ウイルスの病原性の一端が明らかとなった。特に、今回解明された病理発生機序は、現在問題となっている高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）の感染予後因子にも共通する可能性がある。

Kobasa et al., Nature, 2004

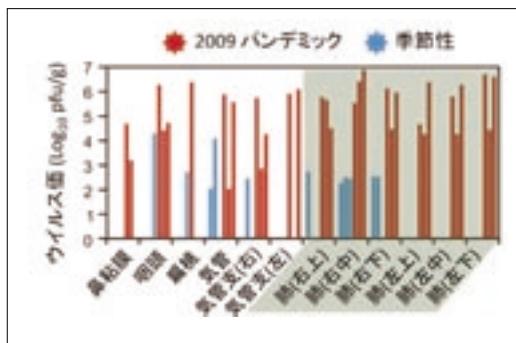
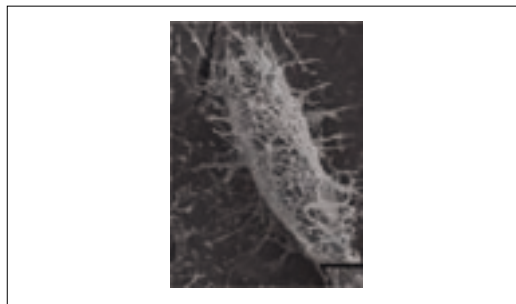
Kobasa et al., Nature, 2007

Watanabe et al., PNAS, 2009

### 3. 2009年パンデミックインフルエンザウイルスの性状

2009年春にブタ由来のインフルエンザウイルスが出現し、瞬く間に世界各地に広がった。H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスによるパンデミックを警戒していた中、毎年流行を繰り返していた季節性のソ連型ウイルスと同じH1N1亜型によるパンデミックは想定外であった。私達は、21世紀初のパンデミックを引き起こしたインフルエンザウイルスの性状を世界に先駆けて明らかにした。

2009年パンデミックウイルスは、実験室で継代されたウイルスとは異なり紐状をしていた（右図）。スペイン風邪ウイルスの子孫である季節性H1N1ウイルスの抗原性は、スペイン風邪ウイルスとはかなり変化している。一方、今回のパンデミックウイルスは、同じH1N1亜型とはいえ、スペイン風邪ウイルスがブタで受け継がれてきたものである。ブタは、出生後180日～190日で食肉として出荷されるため、インフルエンザウイルスに感染し免疫を保持しているブタの割合が低い。そのため、ブタでは抗原変異が



起こりにくく、1918年のウイルスの抗原性が比較的保存されてきた。その結果、季節性H1N1亜型ウイルスと2009年パンデミックウイルスは抗原性がかなり異なり、季節性H1N1亜型ウイルスに対する免疫は2009年パンデミックウイルスには効果がなく、多くの人が感染・発症したのである。実際、2009年のパンデミック発生前に採取したヒトの血清を調べると、本ウイルスに高い抗体価を有していたのは、1918年のパンデミックを経験したヒトがほとんどであった。

本ウイルスの病原性を明らかにするために感染実験を行った。マウスに季節性ウイルスを感染させても、体重は減少しなかったが、2009年パンデミックウイルスを感染させたマウスでは、体重は減少し、100万個感染させた場合には、感染後5日目に全てのマウスが死亡した。また、サルに2009年パンデミックウイルスあるいは季節性ウイルスを感染させて呼吸器におけるウイルス量を調べた。その結果、いずれの部位でも、2009年パンデミックウイルスのほうがよく増殖していた（上図）。実験に用いたサルを病理解剖して調べたところ、季節性ウイ

ルスとは異なり、2009年パンデミックウイルスを感染させたサルでは、激しい肺炎が起きていることがわかった。実際に、致死例では、肺でウイルスが増殖し、ウイルス性肺炎を起こした例が数多く報告されている。

PB2蛋白質は、ウイルスゲノムの転写・複製を司るRNAポリメラーゼの構成要素の一つである。この蛋白質は、インフルエンザウイルスが感染できる宿主動物を規定する上で重要な役割を果たしている。2009年パンデミックウイルスのPB2蛋白質をコードするPB2分節は鳥インフルエンザウイルスに由来する。PB2蛋白質には注目すべきアミノ酸が2つ知られている。627番目と701番目のアミノ酸である。このどちらかが変わることによってヒトを含む哺乳動物における鳥インフルエンザウイルスの増殖性が増す。2009年パンデミックウイルスのPB2蛋白質の627番目ならびに701番目のアミノ酸はいずれも鳥型にもかかわらず、ヒトでよく増殖し、パンデミックを引き起こした。私達は、PB2の591番目のアミノ酸に変異が生じたために、ヒトで良く増殖するウイルスに変化したことを明らかにした。

Itoh et al., Nature, 2009

Neumann et al., Nature, 2009

Yamada et al., PLoS Pathogens, 2010

### Ⅲ. 宿主特異性

#### 1. ヒトにおける鳥型・ヒト型レセプターの分布

インフルエンザウイルスのレセプターは、シアル酸を末端に持つ糖鎖で、ウイルス表面の糖蛋白質・ヘマグルチニン (HA) によって認識される。HAのレセプター認識はウイルスが分離された宿主動物によって異なり、鳥由来ウイルスはシアル酸がガラクトースに $\alpha$  2,3結合したもの (SA  $\alpha$  2,3Gal) を、ヒト由来ウイルスは主としてSA  $\alpha$  2,6Galを認識する。ヒトのウイルスが増殖するヒトの気管上皮細胞表面にはSA  $\alpha$  2,6Galが多く存在する。私達は、水禽のウイルスが増殖するカモの腸管上皮細胞の細胞

表面にはSA2,3Galが豊富に存在することを報告した。つまり、ウイルスのレセプター認識の違いは、それぞれの宿主動物が持つ粘膜上皮細胞上のシアル酸に対応した特性であり、鳥由来ウイルスは容易にヒトに感染しないと考えられてきた。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鳥からヒトに直接感染し、多くの人がこのウイルスに感染して死亡している。私達は、この矛盾を解明するためにヒトの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解析した。

毎年冬季に人の中で流行を繰り返すインフルエンザが上部気道感染を主体とするのに対し、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染者では、むしろ下部呼吸器症状が強く見られるのが特徴である。そこで、シアリルオリゴ糖に特異的なレクチンを用いて人の呼吸器におけるウイルスレセプターの検索を行った。

検索の結果、ヒトの呼吸器の深部には *Maackia amurensis*レクチン (MAL II, Vector Laboratories) が結合するSA  $\alpha$  2,3Gal、すなわち鳥由来ウイルスのレセプターが存在することがわ

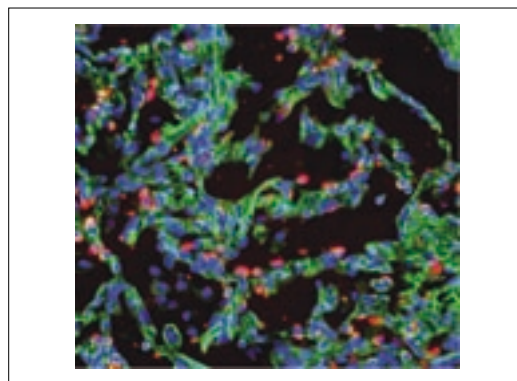


図1. 正常な肺胞組織におけるインフルエンザウイルスレセプター (シアル糖鎖) の発現分布。正常な肺胞組織には、SNAレクチン結合性のシアル糖鎖・SA  $\alpha$  2,6Gal (緑色) だけでなく、MALIIレクチン結合性のシアル糖鎖・SA  $\alpha$  2,3Gal (赤色) を細胞表面に持つ細胞が散在する。

かった (図)。そして上部気道には、線毛を有する鼻粘膜細胞の一部を除いて、*Sambucus nigra* (SNA, Vector Laboratories) が認識する SA  $\alpha$  2,6Gal、すなわちヒトウイルスのレセプターが主として存在していた。この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。ヒトの呼吸器におけるヒトウイルスと鳥ウイルスのレセプター分布の相違は、鳥由来インフルエンザウイルスが人から人へ伝播しにくい原因の一つにもなっていると考えられる。つまり、H5N1ウイルスが人から人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ウイルスのレセプターを認識できるように変異する必要があるのだろう。

ヒトの体内における鳥インフルエンザウイルスのレセプター分布の解明は、本ウイルスによる下部呼吸器の感染防御・治療対策の確立に重要な知見である。また、感染者の体内で鳥インフルエンザウイルスがヒトへの適応を進める過程を理解する上でも重要である。

Shinya et al., 2006, Nature

## 2. H5N1ウイルスの HA がヒト型レセプターを認識するためのアミノ酸変異

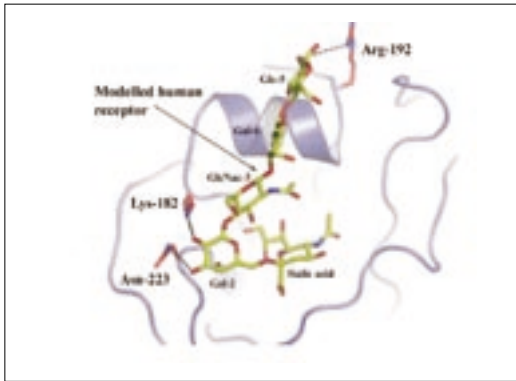
鳥インフルエンザウイルスがパンデミックを起こすようなウイルスに変化する過程において、鳥型からヒト型へのレセプター特異性の変化が重要と考えられている。インフルエンザウイルスは、ウイルス膜表面の糖タンパク質のひとつであるヘマグルチニン (HA) が、細胞表面にあるレセプター分子 (シアル酸) と結合して感染が始まるが、鳥由来のインフルエンザウイルスは、シアル酸がガラクトースに  $\alpha$  2,3 結合しているもの (SA  $\alpha$  2,3Gal) を主に認識するのに対し、ヒト由来ウイルスは、 $\alpha$  2,6 結合するシアル酸 (SA  $\alpha$  2,6Gal) を主に認識する。

このレセプター特異性の違いが、宿主域を大きく左右することが知られている。それ故、H5N1鳥インフルエンザウイルスが、どのような変異を獲得したときにヒト型レセプターを認識できるようになるのか、その分子メカニズムを解明することは重要である。

そこで、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、リバーズ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。

その結果、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 (SA  $\alpha$  2,6Gal) 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、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、系統的に多くのcladeに分類されている。解析を行った上述のウイルスは、clade1に属している。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に属する株で起こったときに同様にSA  $\alpha$  2,6Galを認識するように変化するか否か解析を行ったところ、Q192R、N193Kの変異は、SA  $\alpha$  2,6Gal結合を上昇させたが、N182K、G139Rは、SA  $\alpha$  2,6Gal結合の上昇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 (図)。なお、N182K または Q192R を有するウイルスが、2006 年にアゼルバイジャンおよびイラクにてヒトから分離されている。

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ていることが示された。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際、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、新型ウイルスの出現を監視する上で重要である。

Yamada et al., Nature, 2006.

#### IV. 増殖機構

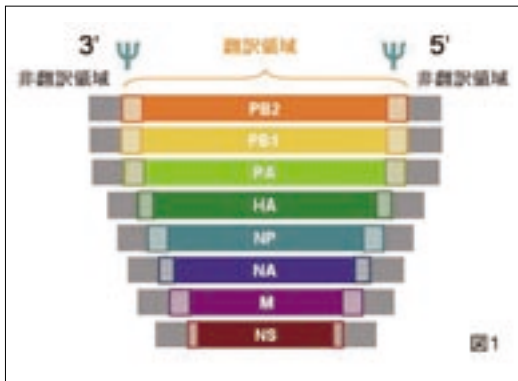
##### 1. インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構

ウイルスのような小さな生物でも、遺伝情報を DNA や RNA の形で次の世代へと正確に伝えていく。インフルエンザウイルスでは、そのゲノム RNA が 8 本に分かれて存在している。ウイルスが増殖するために必須の蛋白質は、8 本すべての RNA 分節上にコードされているため、感染性粒子が産生されるためには、8 種類すべての RNA 分節が細胞内に存在しなければならない。8 本に分かれた RNA 蛋白質複合体 (RNP 複合体) は、どのようなメカニズムでウイルス粒子内に取り込まれるのだろうか？分節化ゲノムのパッケージング機構の謎は、ウイルス学研究者に大きな課題として残されたままであった。

そのメカニズムに関しては、対立する 2 つの仮説が立てられていた。1 つは「ランダム」パッケージング説で、1 つのウイルス粒子内に取り込まれる RNP 複合体の数も種類もバラバラというものである。この仮説では、8 種類の RNP 複合体にはその取り込みに関与する「共通の目印」があり、その目印をもつ RNP 複合体は区別されことなく取り込まれるため、ウイルス粒子によって取り込んでいる RNP 複合体の数と種類が異なる、とされる。つまり、8 種類の RNP 複合体をすべて取り込んだウイルス粒子だけが増殖能力を獲得するという仮説である。もう 1 つの仮説は「選択的」パッケージング説である。この仮説では、それぞれの RNP 複合体には「独自の目印」が存在しており、パッケージングの際にはその目印によって個々の RNP 複合体が区別され、8 種類の RNP 複合体がウイルス粒子内に取り込まれると予想される。しかしいずれの仮説についても、それを支持するような直接的な証拠は得られていなかった。

私達は、cDNA から人工的にインフルエンザウイルスを合成するリバーシジェネティクス法を用いて以下のような実験を行い、各 RNA 分節に独自の目印が存在することを見出した。

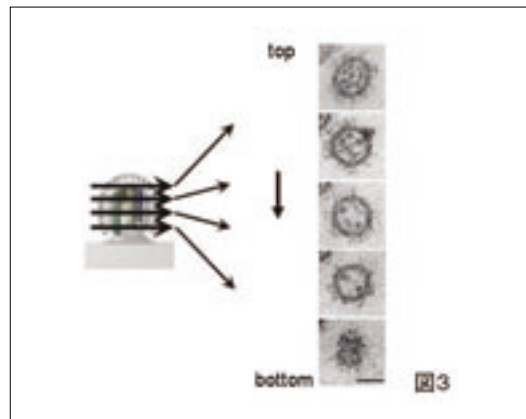
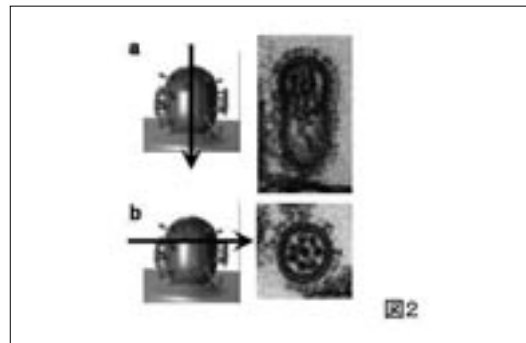
はじめに、NA RNA 分節を用いて様々な欠損領域を持つ変異 NA RNA 分節を作製した。他の 7 種類の RNA 分節とともに、変異 NA RNA 分節を用いてウイルスを人工合成し、どの変異 NA RNA 分節がウイルス粒子内に取り込まれ、どの変異 NA RNA 分節が取り込まれないのかを調べた。その結果、NA 遺伝子の翻訳領域の両末端に、NA RNA 分節がウイルス粒子内に効率よく取り込まれるために重要な領域 (パッケージングシグナル:  $\Psi$ ) が存在することが明らかになった。同様に、他の 7 種類の RNA 分節においても、翻訳領域の両末端にパッケージングシグナルが存在することを明らかにした (図 1)。翻訳領域の塩基配列は各分節で異なっていることから、8 本の RNA 分節は、分節独自



の目印を持っていると言える。以上の成績は、インフルエンザウイルスが8種類のゲノムRNAを選別して取り込む「選択的パッケージング説」を支持している。

電子顕微鏡による観察により選択的パッケージング説をさらに支持する証拠が見つかった。はじめに、A型インフルエンザウイルスを感染させた細胞の超薄切片を作製し、細胞表面から出芽するウイルス粒子を異なる2方向から観察した。出芽ウイルス粒子の縦断面を観察すると、ウイルス粒子内には太さ約15nmの数本のRNP複合体が含まれている様子が観察された(図2 a)。続いて出芽するウイルス粒子を輪切りにしてみると、ウイルス粒子内部には、輪切りにされたRNP複合体が規則的な配置で並んでいる様子が観察された。1つのウイルス粒子内に含まれるRNP複合体の数は8本で、7本のRNP複合体が中心の1本を取り囲むような規則的な配置をとっていた(図2 b)。

さらにウイルス粒子の連続超薄切片を作製し、粒子内部の8本のRNP複合体の長さを調べたところ(図3)、それらはそれぞれ長さが異なるということが明らかになった。RNP複合体の長さは各RNA分節の塩基数に応じて異なることから、以上の観察結果は、規則的な配置に並べられた異なる種類の8本のRNP複合体が個々のウイルス粒子内に取り込まれることを示唆している。



以上、各分節に独自のパッケージングシグナルが存在することや、個々のウイルス粒子が規則的に並ぶ8本のRNP複合体を取り込むという結果から、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングは、8種類8本のRNP複合体が規則的に配置され、それが1つのセットとしてウイルス粒子に取り込まれるものと考えられる。このようなパッケージングメカニズムは、異なる種類の宿主動物(ヒト、ブタ、トリ)から分離されたウイルス株でも広く保存されており、A型インフルエンザウイルスが種を存続させるために共有する重要なメカニズムであると考えられる。

今回解明したゲノムパッケージング機構は、8本の各RNP複合体が特異的に会合していることを示しており、この会合を阻止すればウイルス増殖を抑制することが出来ると考えられる。従って、ゲノムパッケージングのステッ

ブは新規抗インフルエンザ薬開発のためのターゲットとなる。

Fujii et al., PNAS, 2003

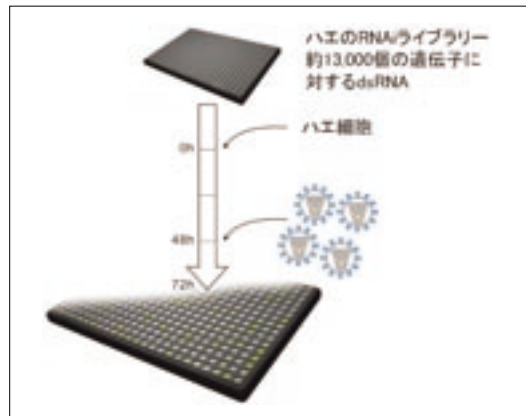
Noda et al., Nature, 2006

## 2. インフルエンザウイルスの増殖に関わる宿主因子の同定

ウイルスは、細菌のように自力で増殖できないため、細胞に感染し宿主蛋白質の働きを利用して増殖する。そのため、ウイルス増殖のメカニズムを解明するには、ウイルスと宿主との相互作用を理解する必要がある。しかしながら、インフルエンザウイルスの増殖に関わる宿主因子については、ほとんど分かってない。現在の生命科学はすでにポストゲノムの時代に入り、生物の全体像を理解するためにプロテオーム、トランスクリプトーム、あるいはデイスラプトーム等の網羅的解析が展開されている。デイスラプトームは、網羅的遺伝子破壊実験とも呼ばれ、解析対象の遺伝子を破壊したのちの表現型を観察することによって、その遺伝子の機能を調べる方法である。このような網羅的な解析は、ウイルス増殖に関わる未知の宿主因子を探索する上で、非常に有効な手段である。

私達は、ハエのRNAiライブラリーを用いて、インフルエンザウイルスの増殖に関わる宿主遺伝子の網羅的スクリーニングを行った(下図)。ハエ細胞で同定された約110個の遺伝子の中から幾つかを選び、ヒト細胞で検証したところ、エンドソームの働きに関わるATP6V0D1、ミトコンドリアの電子伝達系に関わるCOX6A1、および核でのmRNAの輸送に関わるNXF1という宿主因子が、インフルエンザウイルスがヒトの細胞で増殖するために重要な役割を持つことが判明した。ハエ細胞で同定された約110個の遺伝子の多くが、ヒトの細胞においても、インフルエンザウイルスの増殖に重要な役割を担っている可能性は高い。

上述と同様の宿主遺伝子の網羅的スクリーニ



ングが行われており、それらの成績を評価することにより、ウイルス増殖の各ステップにおいて関与する宿主遺伝子が明らかになってきた(右図)。現在、私達の研究室では、それらの遺伝子が果たす役割について検討中である。このような宿主因子の研究から導きだされる成果は、インフルエンザウイルスの増殖メカニズムの解明だけでなく、新しい戦略に基づいた新規の抗ウイルス薬の開発にもつながることが大いに期待される。

Hao et al., Nature, 2008

Watanabe et al., Cell Host&Microbe, 2010

## V. ワクチンおよび抗インフルエンザ薬

### 1. H5N1 ワクチンシードウイルス株の作出

H5N1高病原性鳥インフルエンザが、ヨーロッパ、アフリカに拡大し、ヒトの感染・死亡

数が増えている。ヒトはH5ウイルスに対する免疫を持たないため、新たなパンデミックの危険性が危惧されている。ワクチンは疾病の予防において最大の武器である。そこで、ワクチンとして用いるためのH5N1弱毒改変型組換えウイルスの作製を行った。

流行株と抗原性が同じで、鶏卵でよく増殖する弱毒ウイルスがワクチンシードウイルスの理想である。このようなウイルスはリバースジェネティクス法によって作製できる。私達は、H5N1高病原性ウイルスのHA遺伝子の病原性に関与する開裂部位コード領域を低病原性タイプに改変した (RERRRKKRからRETRに変更)。NA遺伝子もH5N1株からクローニングし、HA、NA以外の6つの遺伝子は、発育鶏卵高増殖性であるPR8株から用意した。これらを用いてPR8/H5N1 6:2 (HAとNAの2つの遺伝子が流行株由来で残りの6つの遺伝子がPR8ウイルス由来) 遺伝子交雑ウイルス (リアソータント) を作製した (図1)。しかしながら、このような方法を用いて英国で作成され現在臨床試験に用いられているNIBRG-14株は、PR8株由来の内部遺伝子を保有するにも拘らず、鶏卵での増殖性が野生型PR8株の1/10である。そこで、より効率よく増殖する新しいワクチンシード候補株の作出法を開発した。

リバースジェネティクスによりPR8株 (高増殖性) とWSN株 (低増殖性) との間で遺伝子交雑体を作製し、それらの鶏卵での増殖性から、PR8株の高増殖性決定因子を同定した。次に、2004年H5N1ヒト分離株VN1203の弱毒改変型HA分節と、他の幾つかの株 (HK213、HK486、Kanagawa、WSN、PR8) 由来のNA (全てN1亜型) 分節あるいは、stalk領域を改変した変異NA (VN1203由来)、そして残りの遺伝子がPR8株という遺伝子交雑体をVero細胞で作製し、それらの鶏卵での増殖性を比較した (図2)。その結果、PR8株の鶏卵高増殖性はウイルスRNAポリメラーゼPB1蛋白質の機能と膜糖蛋白質

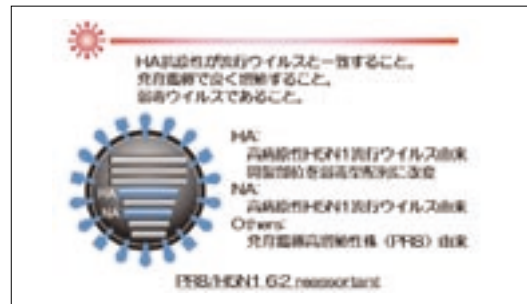


図1. H5N1 ワクチンシードウイルス候補株

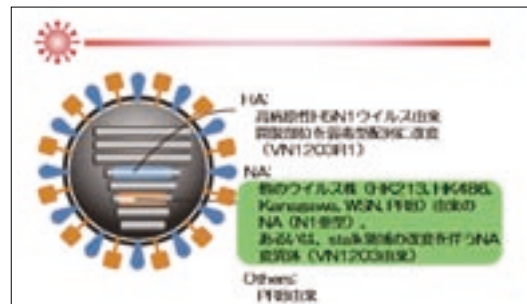


図2. HNA改変型H5N1 ワクチンシード候補株

(HA-NAバランス) により決定されることが明らかになった。また作製したNA改変型組換えウイルスのうち、PR8株由来のNAをもつ組換えウイルスが、それ以外のウイルスよりも3~4倍高い増殖性を示した。

以上の成績から、7:1リアソータント (HA分節のみH5N1株由来) が、従来型の6:2リアソータント (HAおよびNA分節の両方がH5N1株由来) より、鶏卵増殖性に優れることが明らかとなった。本成績は、組換えウイルス作製過程の簡略化、時間の節減、また発育鶏卵供給量減少時に有用であると考えられる。

Horimoto et al., Virology, 2007

Murakami et al., Vaccine, 2008

Murakami et al., J Virol, 2009

## 2. 小児におけるH3N2オセルタミビル耐性A型インフルエンザウイルス

オセルタミビルは、インフルエンザウイルスに有効な薬剤で、ウイルスのノイラミニダーゼ

活性を阻害する。オセルタミビルは、アマンタジンやリマンタジンよりも耐性ウイルスの出現頻度が低いとされているが、オセルタミビル投与患者における本剤耐性ウイルスの出現については限られた情報しかなかった。本研究では、インフルエンザ治療を受けた小児を対象としてオセルタミビル耐性株の出現を検討した。

小児50名からオセルタミビル投与前後に検体を採取し、H3N2亜型のA型インフルエンザウイルスを分離し、解析した。分離したウイルス遺伝子のノイラミニダーゼおよびヘマグルチニンの塩基配列を決定し、ノイラミニダーゼに変異の認められたウイルスについて、オセルタミビルの活性体であるカルボン酸オセルタミビルに対する感受性を調べた。

その結果、オセルタミビル投与を受けた9名(18%)の患者から分離されたウイルスのノイラミニダーゼに変異が検出された。そのうち6名では、292番目のアミノ酸(Arg292Lys)に、2名では119番目のアミノ酸(Glu119Val)に変異が認められた。これらはいずれもノイラミニダーゼ阻害薬に対する耐性を付与することが既知の変異である。1名では、別の変異(Asn294Ser)が認められた。カルボン酸オセルタミビルに対する感受性を調べたところ、Arg292Lys、Glu119Val、Asn294Serの変異(図1)を有するノイラミニダーゼは、薬剤投与前のノイラミニダーゼと比較して、それぞれ約 $10^4 \sim 10^5$ 倍、500倍、300倍耐性になっていた(図2)。オセルタミビル耐性ウイルスは、治療4日目の検体にはじめて検出され、それ以降の検体からも引き続き検出された。薬剤耐性ウイルスが出現しなかった患者でも、治療開始後5日目に1mlあたり $10^3$ 感染価以上のウイルスが検出された例があった。

以上、小児インフルエンザ患者におけるオセルタミビル耐性ウイルスの出現頻度は、これまで知られているよりもはるかに高いことがわ

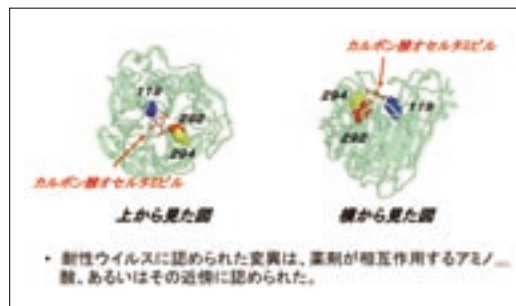


図1. NAに起きたアミノ酸変異の場所

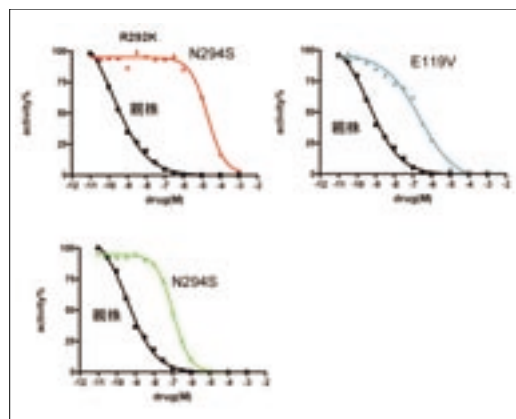


図2. 各種変異株におけるカルボン酸オセルタミビルに対する感受性

かった。また、オセルタミビル投与開始後5日目であっても、小児は相当量のウイルスを排出していることが明らかとなった。

私達は、B型インフルエンザウイルスのオセルタミビル感受性についても研究を行い、変異の種類によってはNA阻害薬耐性B型ウイルスが病原性や伝播力を減ずることなくヒトの間で伝播し得ること示した。この結果は、後に世界的に広まったオセルタミビル耐性季節性H1N1ウイルスの流行を予見するものであった。

Kiso et al., Lancet, 2004

Hatakeyama et al, JAMA, 2007

### 3. オセルタミビル耐性H5N1インフルエンザウイルスの出現

アジアに始まり、ヨーロッパそしてアフリカに

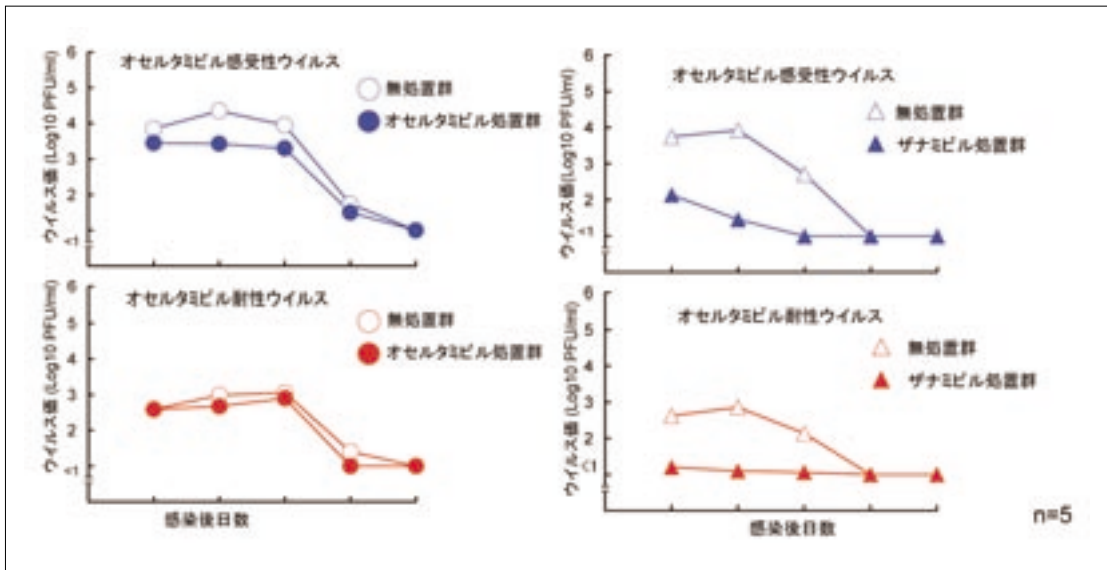


図 フェレットにおけるオセルタミビル耐性および感受性ウイルスのNA阻害剤に対する感受性

伝播したH5N1鳥インフルエンザにより多くの人が死亡しており、世界的なインフルエンザの流行（パンデミック）が危惧されている。H5N1ウイルスによるパンデミックが生じた場合、抗ウイルス薬の多用が予想される。現在流行しているH5N1インフルエンザウイルスの一部は、既にM2阻害剤（アマンタジンなど）に対し耐性を獲得している。従って、ノイラミニダーゼ阻害剤に頼るしかない。薬剤の使用には、常に耐性の問題が付きまとうが、H5N1ウイルスのノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスの出現に関しては全くわかっていなかった。

本研究では、H5N1インフルエンザに感染した兄を看病している間に、H5N1ウイルスに感染した14歳のベトナムの少女から分離されたウイルスの性状を解析した。少女は予防的に3日間オセルタミビルを治療量の半量服用していた。ノイラミニダーゼ遺伝子の塩基配列解析から、274番目のアミノ酸に変異を検出した。この変異はオセルタミビル耐性を付与することがわかっている。検出された変異ウイルスおよびその親株（オセルタミビル感受性ウイルス）を用いて、フェレットでの感染実験を行った。オセルタミ

ビル耐性ウイルスは親株と比較しその増殖性は低下していた。また、ザナミビルはオセルタミビル感受性ウイルスのみならずオセルタミビル耐性ウイルスに対しても有効であった（図）。

本ウイルスに対してヒトは感染したことがないため、ウイルス排除がままならず、耐性ウイルスが出現しやすいと考えられる。H5N1ウイルスのみならず他の鳥インフルエンザウイルスに対しても誰もが初感染であるため、ウイルスが体内で増殖しやすく薬剤耐性ウイルスが容易に出現することが予想される。本研究の成績は、抗インフルエンザ薬は特定のものに限定せず、幅広く備蓄する必要があることを示している。  
Mai et al., Nature, 2005

#### 4. 新しいインフルエンザ治療薬、ファビピラビル

抗ウイルス薬の使用には、絶えず耐性ウイルス出現の可能性が付随する。現在、幅広く治療に用いられる抗インフルエンザ薬についても、近年では耐性ウイルスが問題となる状況が見られた。このような、背景の基、新たな抗インフルエンザ薬の研究開発が世界各国で進められている。ファビピラビルは、ウイルスのRNAポ

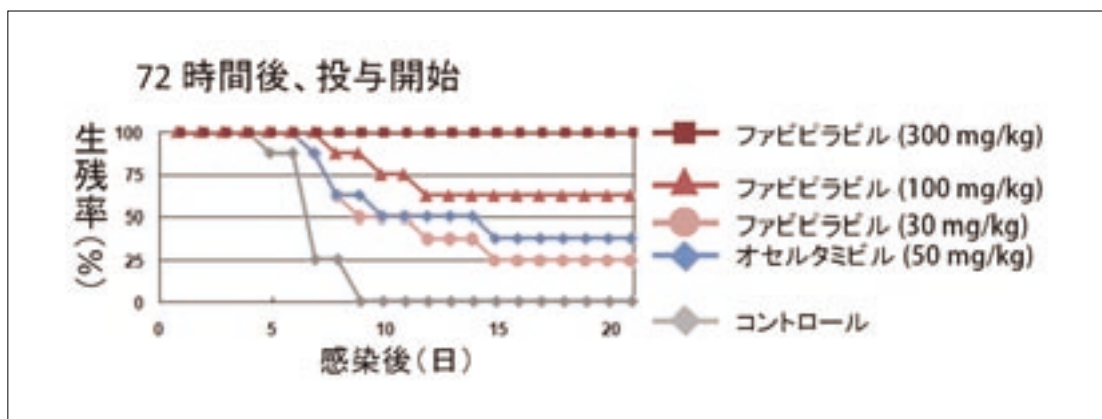
リメラーゼの働きを抑制することでウイルスの増殖を妨げる。このファビピラビルは、これまでの薬剤と作用機序が全く異なることから、既存の抗インフルエンザ薬に対する耐性ウイルスへの効果も期待されている。

クレードの異なる2種類のヒト由来高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルス (A/Vietnam/UT3040/2004ならびにA/Hanoi/UT30408/2005) をマウスに10MLD50 (MLD50: 50%のマウスを殺すのに必要なウイルス量) 経鼻接種し、ファビピラビルおよび比較対照としてオセルタミビルを経口投与し、治療効果を確認した。感染後21日間の生残率および感染3、6日後の肺におけるウイルス価の結果から、ファビピラビルの8日間投与はいずれのH5N1ウイルスについても有効であることが判明した。また、A/Vietnam/1203/2004 (VN1203) にオセルタミビル耐性を示す変異 (H274YおよびN294S) を導入したウイルスについて、ファビピラビルの治療効果を検討した結果、ファビピラビル (100mg/kgあるいは300mg/kg) はオセルタミビル耐性変異株に対しても有効であった。マウスへのファビピラビル投与を、A/Vietnam/UT3040/2004 (H5N1) 接種1時間後、24時間後、48時間後、72時間後より開始する実験を行った結果では、投与を感染72時間後に開始した場合でも、ファビピラビルを300mg/kg投与されたマウスは100%生残した

(図)。この遅延投与の実験結果は、今後臨床に適用する際、ファビピラビルの大きな利点となりうることを示している。以上のマウスの結果から、ファビピラビルは極めて病原性の強い高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスにも有効であることが予想される。

2009年パンデミックA/California/04/2009あるいは季節性インフルエンザウイルスA/Kawasaki/UTK-23/2008 (オセルタミビル感受性)、A/Kawasaki/UTK-4/2009 (オセルタミビル耐性) をマウスに感染させ、ファビピラビルの効果を検証した。その結果、ファビピラビルを60mg/kgおよび300mg/kg、5日間投与すると、パンデミックウイルス、通常の季節性オセルタミビル感受性および耐性ウイルスの肺におけるウイルス増殖が有意に減少していた。特に300mg/kg投与群ではウイルス増殖がほぼ完璧に抑制された。これらの結果から、ファビピラビルは2009パンデミックウイルスに対しても有効性が高いことが予想される。2008-2009年シーズンの季節性H1N1ウイルスのように、ノイラミニダーゼ阻害剤耐性変異を獲得し、蔓延してしまう可能性は否定できない。このような状況下で、全く作用機序の異なるファビピラビルに期待するところは大きい。

Kiso et al., PNAS, 2010



## 5. 新しいインフルエンザ治療薬、ラニナミビル

現行の抗インフルエンザ薬に対する耐性ウイルスが出現している状況を考慮し、新たに開発された抗インフルエンザ薬、ラニナミビルの効果を調べた。ラニナミビルはオセルタミビル、ザナミビルと同じ作用機序をもつNA阻害剤で、吸入薬として用いられる。

2009年パンデミックH1N1ウイルスA/California/04/2009および季節性インフルエンザウイルス(A/Kawasaki/UTK-4/2009：オセルタミビル耐性、A/Kawasaki/UTK-23/2008：オセルタミビル感受性)に対する *in vitro* 活性について調べたところ、ラニナミビルは、上記いずれのインフルエンザウイルスに対しても同等の効果があらることが確認された。

2009年パンデミックウイルスA/California/04/2009あるいは季節性ウイルスA/Kawasaki/UTK-23/2008（オセルタミビル感受性）、A/Kawasaki/UTK-4/2009（オセルタミビル耐性）をマウスに感染させ、オセルタミビルとラニナミビルの効果を検証した。その結果、ラニナミビルは単回投与にて、パンデミックウイルス及び通常の季節性オセルタミビル感受性および耐性ウイルスのマウス肺における増殖を有意に抑制した。また、オセルタミビル耐性パンデミックウイルスにもラニナミビルは効果を示した。これらの結果から、ラニナミビルは現在

流行中のすべてのインフルエンザウイルスに対して高い有効性が期待される。

ヒト由来高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルス(A/Hanoi/UT30408/2005-clone7)をマウスに感染させ、ラニナミビルを経鼻投与および比較対照としてオセルタミビルを経口投与し、治療効果を調べた。ラニナミビルの投与は感染2時間後1回のみである。感染後21日間の生残率および感染3、6日後の肺におけるウイルス価の結果から、ラニナミビルはH5N1ウイルスについて、単回投与で効果があることが判明した。また、オセルタミビル耐性を示す変異型(H274Y) H5N1ウイルス(A/Hanoi/UT30408/2005-clone9)についても、ラニナミビルは治療効果を示した。

ラニナミビルはマウス体内で速やかに活性体に変換され、長期間肺に貯留する。この性質に基づき、マウスを用いて本剤の予防効果を検証した。その結果、H5N1ウイルス(A/Hanoi/UT30408/2005-clone7)を感染させる7日前にCS-8958を単回投与した場合でもマウスは比較対照群に比較して有意に高い生残率を示した(図)。以上の結果から、ラニナミビルは極めて病原性の強い高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスの治療及び予防に有効であることが予想される。

Kiso et al., PLoS Pathogens, 2010.

