

論文の要旨

獣医学専攻

平成 29 年度博士課程入学

氏名 神木春彦

指導教員名 堀本泰介

論文題目 A 型インフルエンザウイルスが異なる宿主に馴化する仕組みの研究

A 型インフルエンザウイルスは水禽類を自然宿主とするが、様々な動物に馴化し、それらの動物に固有のウイルスが定着している。動物のインフルエンザウイルスは突然変異や遺伝子交雑を経て、ヒト体内での効率的な増殖能およびヒト間での伝播能を獲得するとパンデミック株になる潜在性を有する。パンデミック株が発生した場合、迅速に公衆衛生上の措置を執り、変異ウイルスの拡散を防ぐ必要がある。初動が遅れるとウイルスの拡散を許してしまう可能性が高いため、パンデミックが起きる前からどの亜型のどのような株への対策が必要になるかを予測し、対処法を準備しておく必要がある。そのためには、有事に至る前に、ヒトへの馴化に重要な遺伝子変異に関する知見を蓄積し、ウイルスサーベイランスの体制を強化することが重要である。

本論文の第一章では、動物由来のウイルスが他の動物宿主に馴化するために必要な遺伝子変異について解析した。第二章では、ウイルスの宿主特異性を決める非常に重要な因子であるレセプター指向性を評価する方法を構築した。第三章では、鳥由来ウイルスがヒトへ馴化するために必須とされるヒト型レセプターへの結合性を上げる変異について解析し、非シアル酸分子がウイルスのレセプターとして機能する可能性について解析した。これらの研究を通して、パンデミック対策に貢献し得る基礎的な知見を獲得することが本研究全体

を通した目的である。

H9N2 亜型の A 型鳥インフルエンザウイルスは、世界中の家禽に拡がっている。近年、家禽から分離される H9N2 鳥ウイルスの一部は、ヒト型レセプターを認識できること、およびヒトに対する散発的な感染が報告されていることから、パンデミックを引き起こすおそれがあると考えられている。第一章第一節では、H9N2 ウイルスの哺乳類馴化に必要な遺伝子変異を同定する目的で、マウス馴化株を作製しそのゲノム配列を解析したところ、PB2、PB1、PA、HA 分節に変異が見つかった。これらの変異の中には、哺乳類馴化を起こす変異としてこれまで報告されていない PB1-K577E 変異が含まれていた。リバーシジェネティクスで構築した PB1-K577E 変異を持つウイルスは、野生型ウイルスに比べマウスの鼻甲介における増殖能が上がっており、高い病原性を示した。さらに、同変異によりヒト由来培養細胞におけるウイルスの RNA ポリメラーゼ活性が低温環境下において上昇した。これらの結果から、PB1-K577E 変異は、H9N2 ウイルスのマウスに対する病原性を規定することが明らかとなり、この変異が哺乳類馴化の新しい指標になることが示唆された。

H3N2 イヌインフルエンザウイルスはアジアと北アメリカの国々に拡がっている。ウイルスがイヌへの感染を繰り返すうち、稀ながらネコに対して感染することがある。仮にこのイヌウイルスがネコでも流行するようになれば、伴侶動物とヒトとの密接な関係性ゆえに、ウイルスのヒトに対する散発的感染の危険性が高まる。また同時に、パンデミックを起こす危険性を有す変異株出現の契機にもなり得る。第一章第二節では、その潜在性を評価するため、H3N2 ウイルスがイヌからネコへ種を超えて感染するために必要な遺伝子変異を探索することを目的とした。ネコ由来 CRFK 細胞に馴化したイヌインフルエンザウイルスを解析したところ、様々なゲノム分節に変異が見つかった。そのうち、HA1-K299R、HA2-T107I、NA-L35R、M2-W41C 変異はそれぞれ個別に CRFK 細胞でのウイルス増殖性を上げた。これらの変異は組み合わせることで、CRFK 細胞だけでなくネコ由来 fcwf-4 細胞におけるウイルスの増殖性も上げた。HA1-K299R および HA2-T107I 変異はウイルスの熱安定性を上げることが明らかになり、さらに HA2-T107I 変異に関しては膜融合の pH 閾値を上げることも示された。以上の結果から、HA1-K299R および HA2-T107I 変異が、H3N2 イヌインフルエンザウイルスのネコ馴化に重要であると考えられた。

A 型インフルエンザウイルスの細胞侵入機構として、ウイルス粒子表面のスパイクタンパク質であるヘマグルチニン (HA) が、細胞表面に存在する糖タンパク質のシアル酸糖鎖に結合し、これを介して感染する経路が知られている。鳥、ヒト由来 A 型インフルエンザウイルスは、それぞれ鳥型およびヒト型レセプターと呼ばれる、ガラクトースに $\alpha 2,3$ または $\alpha 2,6$ 結合したシアル酸に結合して宿主の細胞に侵入する。また、ヒト型レセプターに対する結合性は、ヒト間におけるウイルスの伝播能を決定する重要な要素である。つまり、レセプター指向性がインフルエンザウイルスの宿主域を決定する最も重要な因子の一つであ

り、動物由来のウイルスは、ヒト型レセプターへの指向性を獲得することでヒトに対してパンデミックを起こし得る。ウイルスが種を超えた感染を起こす理由や、パンデミックウイルスの発生機序を理解するためには、レセプター指向性を詳細に解析する必要がある。レセプター指向性を解析する固相糖鎖結合試験など既存の方法では、ウイルスの鳥型およびヒト型糖鎖との物理的な結合性を評価するが、ウイルスのレセプターに対する結合性と宿主に対する感染能の関係を評価することはできない。そこで第二章では、鳥型レセプターノックアウト (KO) 細胞 (ヒト型細胞)、ヒト型レセプターKO 細胞 (鳥型細胞)、両レセプターKO 細胞 (DKO 細胞)、全てのシアル酸糖鎖を KO した細胞 (SLC35A1KO 細胞) を作製し、これらの細胞におけるウイルスの増殖性を調べることで、ウイルスの生物学的なレセプター指向性、すなわちどのレセプターを介して感染、増殖するのかを評価し、固相糖鎖結合試験による各レセプターへの物理的な結合性と比較した。その結果、鳥由来ウイルスおよびヒト由来の実験室株である PR8 (H1N1) は、鳥型糖鎖に特異的に結合し、鳥型細胞でよく増殖した。ヒトの季節性 H3N2 ウイルスは、鳥型、ヒト型の両糖鎖に対する低い結合性を示したが、ヒト型細胞でのみよく増殖した。ヒト由来の 2009 パンデミックウイルスや派生する季節性 H1N1pdm ウイルスおよび Aichi/68 (H3N2) 株は、ヒト型糖鎖に特異的に結合したが、ヒト型細胞だけでなく鳥型細胞でも高い増殖性を示した。これらの結果から、一部のヒト由来ウイルスは、糖鎖結合試験の評価に反して鳥型レセプターを介しても感染することが明らかになった。つまり本研究により、ウイルスのレセプター結合性と増殖性の間の生物学的な関係を評価できるようになった。

鳥インフルエンザウイルスが遺伝子変異しヒト型レセプターへの結合能を獲得すると、ヒトへの感染が可能となりパンデミックを起こす潜在性が増す。そのため、ヒト型レセプターへの結合性を上げる遺伝子変異の同定は、ウイルスサーベイランスに重要である。そこで第三章第一節では、第二章で樹立した鳥型レセプターを持たない MDCK 細胞 (ヒト型細胞) にウイルスを馴化させるという手法により、ヒト型レセプターへの結合性を上げる変異を同定した。H4 および H6 亜型の鳥由来ウイルスをヒト型細胞で継代すると、HA 分節に変異を有する複数の馴化株が得られた。固相糖鎖結合試験により、H4、H6 両ウイルスとも HA-Q226L 変異がヒト型糖鎖 (6'SLN) に対する結合性を上げることが明らかになった。一方、結合試験において、H4 亜型の Q226R 変異、H6 亜型の D187N および E190V 変異は、ヒト型糖鎖への結合性をほとんど上げなかったにもかかわらず、ヒト型細胞での増殖性を上げた。本研究により、鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプターに対する結合性を上げる変異を探索するための新しい手法が確立された。また、鳥型レセプターを介した感染能を低下させることなくヒト型レセプターを介した感染能を獲得する新しい種類の変異の同定が可能となった。

A 型インフルエンザウイルスのレセプターとしてシアル酸糖鎖のみが知られている。し

かし第二章の実験において、シアル酸糖鎖を有さない SLC35A1KO 細胞にもウイルスは弱いながらも感染することが示された。これは、レセプター非依存性の感染の存在、あるいはシアル酸以外の未知レセプターの存在を示唆する知見である。そこで、SLC35A1KO 細胞でウイルスを連続継代することでシアル酸非依存的な経路で効率よく細胞に感染する馴化株を作出した。決定した塩基配列を基にリバーシジェネティクス法で解析したところ、馴化株に見られた HA1-S145I、HA1-E190D、HA2-T41S それぞれの変異が、SLC35A1KO 細胞での増殖性向上に関与することがわかった。次に、SLC35A1KO 細胞が豊富にもつ硫酸化ガラクトースがレセプターとして機能している可能性を調べるために、それをほとんど有さない SLC35A2KO 細胞に馴化株を感染させたところ高い増殖性を示すことがわかり、硫酸化ガラクトースは未知レセプターではないことが示唆された。本研究により、シアル酸糖鎖を介さず効率的に細胞へ感染するために必要な HA の遺伝子変異が初めて明らかになった。その知見は、今後未知レセプターの存在を明らかにするための有用な情報になり得る。

以上、本研究において、動物由来のインフルエンザウイルスが異なる哺乳類宿主に馴化する際に生じるこれまでに報告されていない遺伝子変異を複数同定することができた。また、本研究で作製したシアル酸糖鎖 KO 細胞でウイルスの増殖性を調べることにより、ウイルスのレセプター指向性を簡便に評価する仕組みを開発した。樹立したヒト型細胞をスクリーニングに活用することで、ヒト型レセプターを介して感染し得る動物由来ウイルスを確実に検出できるようになると考える。これら全ての知見は、今後のウイルスサーベイランスの体制強化に貢献するものである。加えて、本研究では、インフルエンザウイルスの未知レセプターの存在を初めて示した。パンデミックウイルス発生機構の解明につながるウイルスの細胞侵入機構の詳細な理解や新たな創薬への展開が期待される成果である。総じて、本研究は、インフルエンザパンデミック対策に多大に貢献し得るウイルス学的な基礎知見を提供した。