

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 神木 春彦

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、ヒトでの効率的な増殖能と伝播能を獲得することで新たなパンデミックをひき起こす潜在性をもつ。パンデミックを発生させないためには、そういった変異ウイルスを事前に検出するサーベイランス体制を強化する必要がある。したがって、ヒトへの馴化に重要なウイルス変異に関する知見の蓄積が必須である。本研究では、パンデミック対策に貢献しうるウイルス変異に関する基礎的な知見の獲得を目的とする。

第一章第一節では、H9N2 鳥ウイルスの哺乳類馴化に必要な遺伝子変異を同定した。世界中の家禽に広がっている H9N2 鳥ウイルスの一部は、ヒト型レセプターを認識し、ヒトに散発的に感染する。マウス馴化株を作製したところ PB1-K577E 変異を見つけた。人工的に構築した PB1-K577E 変異体は、マウスの鼻甲介における増殖能と低温環境下での RNA ポリメラーゼ活性が上がっており、哺乳類馴化の新しい指標になる。第二節では、H3N2 ウイルスがイヌからネコへ種を超えて感染するのに必要な遺伝子変異を探索した。海外に定着する H3N2 イヌウイルスは稀にネコに感染する。伴侶動物でのウイルス流行はヒトへの感染機会を高めパンデミックの契機になりうる。H3N2 イヌウイルスのネコ細胞馴化株に見られた HA1-K299R、HA2-T107I、NA-L35R、M2-W41C 変異はネコ細胞での増殖性を上げた。HA の変異はウイルスの熱安定性や膜融合の pH 閾値を上げることもわかり、馴化に重要であると考えられた。

第二章では、A 型ウイルスの宿主馴化についてレセプターの視点から解析した。鳥、ヒトウイルスの HA はそれぞれ鳥型 (Sia- α 2,3-Gal)、ヒト型 (Sia- α 2,6-Gal) 糖鎖をレセプターとして使う。ヒト型レセプターへの結合性はヒトへの感染性や伝播能を獲得するとされる。シアル酸糖鎖との物理的な結合性を検出する固相糖鎖結合試験ではウイルス感染能との相関性は評価できない。そこで、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、ウイルスの増殖性を糖鎖結合試

験の結果と比較した。鳥ウイルス株は鳥型糖鎖に特異的に結合し鳥型細胞でよく増殖した。ヒト季節性 H3N2 ウイルスは、鳥型、ヒト型の両糖鎖に弱く結合したがヒト型細胞でのみよく増殖した。2009 パンデミックウイルスや季節性 H1N1pdm は、ヒト型糖鎖に特異的に結合したが鳥型細胞でもよく増殖した。糖鎖結合試験ではウイルス感染能を評価できないこと、今回の KO 細胞を用いることで感染能を指標にレセプター指向性を正確に評価できることがわかった。

第三章第一節では、第二章のヒト型細胞に鳥ウイルス HA をもつウイルス様粒子を馴化させる安全な手法により、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 鳥ウイルスをヒト型細胞で継代すると馴化株が得られた。H4 ウイルスでは HA-Q226L/R、H6 ウイルスでは HA-Q226L と D187N、E190V 変異によりヒト型細胞での増殖性が上がった。いずれも鳥型細胞での高い増殖性が維持されていた。したがって、ヒト型レセプターへの結合性を上げる変異を探索できる新しい手法が確立された。また、糖鎖結合試験では検出されないヒト型レセプターを介して感染するウイルスが検出できるようになった。第二節では、第二章のシアル酸糖鎖をもたない SLC35A1KO 細胞でウイルスが増殖することに注目した。レセプターはシアル酸糖鎖であるという理解に反し、非シアル酸レセプターの存在を示唆している。SLC35A1KO 細胞で馴化株を作出したところ、HA1-S145I、HA1-E190D、HA2-T41S 変異が見つかった。硫酸化ガラクトースをもたない SLC35A2KO 細胞においてもその増殖性は維持されていた。シアル酸糖鎖を介さず効率的に細胞へ感染する HA の遺伝子変異が明らかになった。

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新しい遺伝子変異を複数同定した。また、樹立したシアル酸糖鎖 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正確に評価する仕組みを開発した。樹立したヒト型細胞は、ヒト型レセプターを介して感染し得る動物ウイルスのスクリーニングに利用できる。これらの知見は、今後のウイルスサーベイランスの体制強化に貢献する。加えて、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捕捉した。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解析や新たな創薬への展開が期待される。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基礎知見を提供した。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。