

学 位 論 文 題 名

Reverse genetics of influenza virus and its application

（インフルエンザウイルスの遺伝子操作系の確立とその応用）

学位論文内容の要旨

インフルエンザは世界各地で毎年流行を繰り返し、様々な予防対策にも関わらず、未だ多大な被害を及ぼす重要な疫病である。本病を引き起こすインフルエンザウイルスは 8 本の分節を持つマイナス鎖 RNA ウイルスである。本ウイルスの増殖のメカニズムや病原性を解明するために、人工的にインフルエンザウイルスを作出する技術の開発が長年切望されていた。最近、米ウイスコンシン大学の河岡研究室では、cDNA からインフルエンザウイルスを作出する系を確立した。この方法は、ウイルス RNA を供給するための 8 つのプラスミドと、ウイルスの構造蛋白質をコードする 9 種類の発現プラスミドの計 17 種類のプラスミドを細胞に導入することによって、感染性インフルエンザウイルスを作出する。この技術により、自由にインフルエンザウイルスを設計することが可能となり、インフルエンザ研究の幅が広がりつつある。本研究では、この遺伝子操作系を利用して、1) インフルエンザウイルスの増殖における M2 蛋白質の役割を調べ、2) 弱毒生ワクチン、および 3) “半生” ワクチンの開発を試みた。

1. A 型インフルエンザウイルスの増殖における M2 イオンチャンネル活性の役割

A 型インフルエンザウイルスの表面には、ヘマグルチニン (HA)、ノイラミニダーゼ (NA) および M2 蛋白質という 3 種類の蛋白質がある。M2 蛋白質は膜貫通領域にイオンチャンネル活性を有する。このイオンチャンネル活性はインフルエンザウイルスの増殖過程において重要な役割を果たすと考えられているが、証明されていない。そこで、M2 蛋白質のイオンチャンネル活性がインフルエンザウイルスの増殖に必要であるか否かを調べるために、上記の遺伝子操作系を用いて、イオンチャンネル活性を持たない M2 蛋白質を有する変異ウイルスを作出し、それらの生物性状について調べた。

イオンチャンネル活性を持たない、または、HA 蛋白質の膜貫通領域を持つ M2 蛋白質を発現するプラスミドを構築した。上記の遺伝子操作技術を用いて、それらの変異を導入した M2 蛋白質を有する変異ウイルスを作出した。これらの変異ウイルスは培養細胞ではよく増殖したが、マウスでは増殖が抑えられていた。さらに M2 蛋白質の膜貫通領域と細胞内ドメインを持たない変異ウイルスを作出した。このウイルスの増殖の様子を調べたところ、培養細胞では増殖したが、マウスでは全く増えなかった。以上の結果により、

M2 蛋白質のイオンチャンネル活性は、A 型インフルエンザウイルスの *in vitro* における増殖には必要ではないが、*in vivo* における増殖には重要な役割を果たすことが明らかとなった。

2. M2 イオンチャンネル活性欠損インフルエンザウイルスのワクチンへの応用

現在、インフルエンザの予防には不活化ワクチンが広く用いられているが、細胞性免疫や粘膜免疫を誘導しないため、感染防御効果は不十分である。効果的なワクチンの開発が試みられている中、弱毒生ワクチンは最も研究の進んでいるワクチンのひとつであり、病原性復帰の危険性の低いワクチン株の開発が期待されている。そこで、イオンチャンネル活性を持たない M2 蛋白質を持つ変異ウイルスの、弱毒生ワクチンとしての効果を調べるため、マウスに経鼻接種して免疫し、100LD₅₀ のインフルエンザウイルス野生株によって攻撃したところ、対照群マウスの生残率が 0%であったのに対して、M2 変異ウイルスで免疫したマウスの生残率は 100%であった。この結果は、イオンチャンネル活性を持たない M2 変異ウイルスが、ウイルスの侵入門戸において粘膜免疫や細胞性免疫を効果的に誘導したことを示唆している。

3. “半生” インフルエンザワクチンの開発

弱毒化した生ワクチンは次世代のインフルエンザワクチンとして期待されているが、病原性復帰という危険性をはらんでおり、改良の必要がある。そこで、抗原性は通常のウイルスと変わらないが、増殖能を欠く“半生”インフルエンザウイルスワクチンの開発を試みた。この“半生”ウイルスは、感染初期過程とウイルス構造蛋白質の発現には関わらないが、ウイルス粒子形成には不可欠である NS2 蛋白質をコードする NS2 遺伝子を欠いている。そのため、NS2 遺伝子欠損ウイルスを感染させた培養細胞ではウイルスの構造蛋白質は効率よく発現したが、感染性粒子は産出されなかった。NS2 欠損ウイルスのワクチンとしての効果を検討するため、本ウイルスをマウスに経鼻接種した。免疫したマウスを 100LD₅₀ のインフルエンザウイルスによって攻撃したところ、NS2 欠損ウイルスで免疫したマウスの生残率は 94%であった。この結果は、“半生”インフルエンザウイルスが、ウイルスの侵入門戸において粘膜免疫や細胞性免疫を効果的に誘導し、感染を防御したことを示している。“半生”ワクチンは、増殖能を欠くため、弱毒生ワクチンで危惧されるような野生株への復帰の可能性はなく、安全性の面からも優れたワクチンになることが期待される。

このように新しい遺伝子操作技術は、基礎研究のみならず、ワクチンやベクター開発にも大きく貢献することだろう。さらに遺伝子治療にも応用の可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 助 教 岡 崎 克 則

学 位 論 文 題 名

Reverse genetics of influenza virus and its application

(インフルエンザウイルスの遺伝子操作系の確立とその応用)

最近、ウイスコンシン大学の河岡研究室で人工的にインフルエンザウイルスを作出する系が確立された。本研究は、この遺伝子操作技術を用いて、インフルエンザウイルスの増殖におけるM2蛋白質の機能を解析するとともに、弱毒生ワクチンおよび“半生”ワクチンの開発を試みたものである。

1. A型インフルエンザウイルスの増殖におけるM2蛋白質イオンチャンネル活性の役割

A型インフルエンザウイルスのエンベロップを貫通するM2蛋白質はイオンチャンネル活性を有する。この活性はインフルエンザウイルスの増殖に重要な役割を果たすことが想定されているが、証明されていない。そこで、M2に変異を導入し、イオンチャンネル活性を欠くウイルスを作出した。この変異ウイルスは、培養細胞では野生株と同様に増殖したが、マウスにおける増殖能は劣っていた。従って、A型インフルエンザウイルスのM2のイオンチャンネル活性は、培養細胞における増殖には必要ではないが、マウスにおける増殖に役割を演ずることが明らかとなった。

2. 弱毒生ワクチンとしてのM2イオンチャンネル活性欠損インフルエンザウイルス

現在、インフルエンザの予防には不活化ワクチンが用いられているが、感染防御効果は不十分であるため、次世代のワクチンとして弱毒生ワクチンの研究が進んでいる。本研究では、上記のイオンチャンネル活性を持たないM2変異ウイルスを接種したマウスがインフルエンザウイルスの攻撃から防御されることを証明し、弱毒生ワクチンとして有望であることを示した。

3. “半生”ワクチンの開発

弱毒生ワクチンは病原性復帰の危険があるので、次に、“半生”ワクチンという新しい概念のもとで、ワクチン開発を試みた。“半生”ウイルスとは、ウイルス増殖に必要な遺伝子を欠失しているため、細胞に感染して感染防御に必要なウイルス蛋白質は発現するが、子孫ウイルスは排出しないウイルスである。本研究では、この“半生”ウイルスのワクチンとしての有効性をマウスにて証明した。“半生”ワクチンは増殖能を欠くため、弱毒生ワクチンで危険

されるような野生株への復帰の可能性はなく、安全性の面から優れたワクチンになることが期待される。

人工的にインフルエンザウイルスを合成する技術は、基礎研究のみならず、ワクチンやベクター開発、さらに遺伝子治療にも大きく貢献するであろう。本研究成果がインフルエンザの予防に資するところが大であるので、審査員一同は渡辺登喜子氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。