

学位論文題名

Studies on Pathogenesis and Genetic Determinants  
of Virulence of Hantaan Virus in Newborn Mice Using Genetic  
Reassortants between Virulent and Attenuated Viruses.

(遺伝子再集合体ウイルスを用いたハンターンウイルスの  
哺乳マウスにおける病原性発現機構および病原性規定因子に関する研究)

学位論文内容の要旨

腎症候性出血熱 (HFRS) の原因となるハンターンウイルスは、ブニヤウイルス科、ハンタウイルス属に分類されるウイルスである。ハンタウイルス属のウイルスは、それぞれ L、M、S セグメントと呼ばれる 3 分節のマイナス鎖 RNA ゲノムを有し、L セグメントにはウイルス RNA の転写、複製を担う RNA ポリメラーゼ (L 蛋白) が、M セグメントには細胞への吸着、侵入に必須である 2 種類のスライク糖蛋白 (G1、G2) が、S セグメントには、ウイルス RNA と結合する多機能蛋白である核蛋白 (NP) がコードされている。

腎症候性出血熱は、高熱、腎障害、出血に加え、ショックなどの全身症状を伴う齧歯類媒介性の人獣共通感染症である。ハンターンウイルスによって惹起される重症型 HFRS は、5-15% の致死率を示し、中国、朝鮮半島を含むアジア極東地域およびロシアにおいて毎年、多くの発症が報告されている。HFRS の発症病理には、宿主の免疫応答やウイルスの臓器指向性が深く関わっていると考えられているが、不明な点が多い。これまでに哺乳動物におけるハンターンウイルスの病原性発現メカニズムは、致死的な感染を起こす動物モデルである哺乳マウスを用いて解析されてきた。ハンターンウイルス感染哺乳マウスの病態は、血管内皮細胞、マクロファージを含む全身性の感染を引き起こし、発症には宿主の免疫応答が関わっているなど一部ヒトの病態と類似することが報告されているが、病原性発現の分子レベルでの解析やウイルスの毒力を決定するウイルス側の因子に関する研究は進んでいない。

最近、著者の属する研究グループによって哺乳マウスに致死的な感染を惹起する強毒株 clone-1 (cl-1) 株からスライク糖蛋白 G2 に対する中和モノクローナル抗体 11E10 によって選択された変異株 mu11E10 株が報告された。この変異株 mu11E10 に感染したマウスは軽症で耐過することから、変異株 mu11E10 は、親株である cl-1 とは異なり、著しく弱毒化していることが明らかになった。このような背景から、著者はハンターンウイルスのマウスにおける病原性発現機序の一端を分子レベルで明らかにするために、強毒株 cl-1 と弱毒株 mu11E10 の病原性を規定しているウイルス側の因子を、感染マウスの発症病理、ウイルスの動態、両株の遺伝子を交雑した遺伝子再集合体 (リアソータント) を用いて解析を行った。

まず著者は、強毒株 cl-1 と弱毒株 mu11E10 の哺乳マウスに対する病原性および感染病態の違いを比較するために両株を哺乳 BALB/c マウスの皮下及び脳内に接種し、両株のマウス内での増殖、臓器親和性、病理学的解析を行った。皮下接種において cl-1 感染マウスは感染後 3 ~ 4 週で 90% の致死率を示したのに対し、mu11E10 感染マウスの致死率は 0% であ

った。さらに両株の皮下接種マウス体内での増殖と臓器親和性を比較した結果、cl-1の方が末梢臓器での増殖力、速度共に高く、中枢神経系(脳)にウイルスが侵入する時期も mu11E10に比べ4日早く、さらに血中抗体が増加してもマウス体内でのウイルス感染価の減少は観察されなかった。これに対して脳内接種マウスでは、両株感染共に100%の致死率を示し、同時期にほぼ等しい感染価のウイルスが脳内に検出され、中枢神経系での両株増殖能には有意な差は認められなかった。さらに皮下接種マウスでの病理学的解析を行った結果、cl-1感染マウスの脳では、皮質における神経細胞の強い壊死、細胞浸潤、髄膜脳炎が観察されたのに対し、mu11E10感染マウスでは、病理変性が軽微であった。以上の結果から、哺乳マウスのハンタウイルス感染における主な標的臓器は脳であり、ウイルスの増殖能の差に伴う中枢神経系への到達速度(神経侵襲速度)の違いが強毒株cl-1と弱毒株mu11E10の毒力の差を規定している因子の一つであることが示された。

次に両株の毒力の違いを規定している遺伝子及びその変異を明らかにするために、両株の全ゲノム塩基配列を決定、比較した。その結果、両株間でLゲノムセグメント上の5'側非翻訳領域に1ヶ所の塩基置換(cl-1: T — mu11E10: C)とMゲノムセグメント上のG1蛋白コード領域に1ヶ所のアミノ酸置換(cl-1: イソロイシン — mu11E10: トレオニン)が検出された。続いてL、Mどちらのゲノムセグメントが哺乳マウスでの病原性を規定しているかを特定するために両株の両株のリアソータントを作成し、マウスへの感染実験を行った。その結果、皮下接種において強毒株cl-1由来のMセグメントを有するリアソータント感染マウスの致死率は85%なのに対し、弱毒株mu11E10由来のMセグメントを有するリアソータント感染マウスでは17%の致死率を示したことからMセグメントが病原性発現に関与していることが明らかになった。さらにMセグメントG2蛋白上のアミノ酸置換がマウス体内での感染拡大機序と臓器親和性に関係しているかを明らかにするためにハンタウイルスの感染標的細胞だと考えられている血管内皮系細胞(マウス脳微小血管内皮細胞: MBMEC)及び単球/マクロファージ系細胞(マウス腹腔マクロファージ)での親株とリアソータントの増殖を産生ウイルス量で経時的に比較した。その結果、cl-1由来Mセグメントを有するウイルスの方がmu11E10由来Mセグメントを有するウイルスに比べ、MBMECにおいて増殖速度が速く、ウイルス産生量も約10倍高いことが明らかになった。さらにマクロファージでは感染初期に同様な増殖能の差が観察された。

以上の結果から、スパイク糖蛋白G1蛋白上の疎水性領域515番目の1ヶ所のアミノ酸置換(cl-1: イソロイシン — mu11E10: トレオニン)が強毒株cl-1と弱毒株mu11E10間の毒力の違いを規定していることが明らかにされた。さらに、感染マウスでの臓器親和性及びin vitroでの標的細胞の増殖能の解析の結果から、G1蛋白上のアミノ酸変異が末梢での増殖能と、それに伴う中枢神経系への神経侵襲性を規定していることが示唆された。また、このG1蛋白上のアミノ酸置換は、G2蛋白に対する中和抗体11E10の中和エピトープ内に存在すると考えられるが、他のグループによって中和抗体11E10の中和エピトープ領域がG2蛋白C末端付近にも存在することが示されている。さらに弱毒株mu11E10は強毒株cl-1に比べ、スパイク糖蛋白による感染細胞の融合活性が低いことが明らかになっており、これらの知見からG1蛋白上の疎水性領域515番目のアミノ酸置換は、G1蛋白とG2蛋白が相互作用している領域に位置し、細胞融合活性及び病原性発現に影響を与えることが示唆された。また、強毒株による感染マウス脳の病理変性には宿主免疫応答が関わっていることから、ハンタウイルスの神経侵襲性と哺乳マウスの免疫の成熟・応答とのバランスが病原性発現に深く関わっており、ヒトのハンタウイルス感染における免疫病原性を一部反映するモデルとなり得ることが示された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎  
副 査 教 授 皆 川 知 紀  
副 査 教 授 高 田 賢 藏

## 学 位 論 文 題 名

### Studies on Pathogenesis and Genetic Determinants of Virulence of Hantaan Virus in Newborn Mice Using Genetic Reassortants between Virulent and Attenuated Viruses.

(遺伝子再集合体ウイルスを用いたハンターンウイルスの  
哺乳マウスにおける病原性発現機構および病原性規定因子に関する研究)

腎症候性出血熱 (HFRS) の原因となるハンターンウイルスは、ブニヤウイルス科、ハンタウイルス属に分類される3分節型マイナス鎖RNAウイルスである。ハンターンウイルスによって引き起こされる重症型のHFRSは、高熱、腎障害、出血に加え、ショックなどの全身症状を伴う齧歯類媒介性の人獣共通感染症である。HFRSの発症病理には、不明な点が多く、ウイルスの病原性発現機構やウイルスの毒力を決定する因子などに関する研究も進んでいない。申請者はハンターンウイルスの哺乳マウスにおける病原性発現機序の一端を分子レベルで明らかにするために、感染マウスに致死的な強毒株cl-1とcl-1から中和抗体エスケープ変異株として選択され、感染マウスが軽症で耐過する弱毒株mu11E10を用いて病原性を規定しているウイルス側の因子について解析を行った。まず申請者は、強毒株cl-1と弱毒株mu11E10の感染哺乳マウスにおける主な標的臓器は脳であり、両株の中樞神経系への到達速度の違いが強毒株と弱毒株の毒力の差を規定している因子であることを明らかにした。次に両株の毒力を決定する遺伝子を明らかにするために両株の全ゲノム塩基配列を決定した。さらにハンタウイルスが分節型のゲノムを有する事を利用して両株の遺伝子を交雑させた遺伝子再集合体ウイルス (リアソータント) を作製し、マウスに対する病原性の解析を行った。その結果、スパイク糖蛋白G1の515番目のアミノ酸置換 (cl-1:Ile-mu11E10:Thr) が主に両株間の毒力を決定していること、末梢標的細胞での増殖能の差に関与していることが明らかになった。

学位論文の公開発表に際して、主査の有川教授から、哺乳マウスモデルとヒト症例間での類似点についての質問があり、申請者はマウスの感染実験結果と、これまでの報告に基づき、ヒト、マウス共に感染の標的細胞が類似していること、宿主免疫応答が発症病理の重要な因子であること等を挙げて質問に回答した。副査の皆川教授からは、感染マウスで観察される神経病理に関して、ヒトとの類似点、免疫の関与、全身症状におけるサイトカインの関与についての質問があった。申請者は、ヒトの症例における神経症状、リンパ球の活性化、

サイトカインの検出などの報告例からヒトの感染病態との類似点を挙げ、また、マウスの免疫応答に関しては、これからの課題であると述べた。弱毒株のワクチンへの応用については、これから最も期待される領域の課題であることを述べた。副査の高田教授から、糖蛋白G1上のアミノ酸置換のウイルス病原性と増殖への影響について質問があった。申請者は、この質問に対して、ウイルスの糖蛋白の機能の指標となる細胞融合活性や細胞への侵入能を両株で比較した実験結果を示し、これまでの文献報告と併せて糖蛋白上のアミノ酸置換がウイルスの生物活性や糖蛋白の構造にどのような影響を与えるかについての考察を述べた。さらにマウスにおける病原性発現と持続感染成立に対する宿主側免疫の関与と機序についての質問に対しては、申請者は、病理学的解析から中枢神経系での炎症病変が致死的な感染の要因になっていることを示して免疫介在性の病原性発現機序について回答した。また回復マウスにおける持続感染成立のメカニズムに関しては、血中抗体によってウイルスが排除されない感染実験の結果を示し、さらに文献的知識からウイルスの感染によって宿主側の細胞性免疫応答が抑制されている可能性について述べた。このように申請者は実験結果に基づき、また文献的知識を用いて、概ね適切に回答し得た。

この論文は、ハンタウイルスの哺乳動物における病原性発現の分子基盤の一端をマウスモデルと分子生物学的手法を用いて解析した研究であり、審査員一同は、成果を評価し、大学院課程における研鑽や修得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有するものと判定した。