

学位論文題名

Study on the inhibition of influenza A virus infection by
Galectin-9

(ガレクチン9のインフルエンザAウイルス感染の抑制に関する研究)

学位論文内容の要旨

季節性およびパンデミックインフルエンザは社会に甚大な被害を及ぼしてきた。迅速診断キットとノイラミニダーゼ(NA)阻害薬の登場によって重症のインフルエンザとこれによる死亡例は格段に減った。しかしながら、NA阻害薬耐性ウイルスの出現が問題となっている。A型インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属する分節状のマイナスRNA鎖を遺伝子とする。ウイルス粒子の表面には糖タンパク質であるヘマグルチニン(HA)とNAが存在する。HAとNAはそれぞれの抗原特異性によって、HAはH1-16、NAはN1-9の亜型に分けられる。HAはウイルスの宿主細胞への吸着と侵入に関与し、NAは細胞から発芽するウイルスの遊離に関与する。

Galectinは哺乳動物では15種類、うちヒトでは10種類が知られている動物レクチンである。その構造から3つのサブグループに分けられる。すなわち、(1)プロトタイプで糖鎖認識領域(Carbohydrate Recognition Domain: CRD)を1つもつもの、(2)キメラタイプで1つのCRDに糖鎖とは結合しない別のドメインが繋がったもの、そして(3)2つのCRDからなるものである。Galectin-9(Gal-9)は(3)のサブグループに属し、CRDを2つ持つ。生体内では主に免疫細胞や肺、消化器系細胞から分泌され、自己免疫疾患一般に見られる免疫制御性細胞のバランスの異常を制御し、担癌状態の宿主において抗腫瘍活性を示すことが報告されている。Galectin-1(Gal-1)はサブグループ(1)に属し、本実験のコントロールとして使用している。

インフルエンザウイルス表面の糖タンパク質HAとNAの糖鎖に強く結合する物質は、亜型にかかわらずウイルスの増殖を抑制することが期待される。そこで著者は、Galectinが、細胞およびマウスにおいてA型インフルエンザウイルスの感染を抑制するか否かを検討した。

まずGal-9がA型インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染を抑制する効果を明らかにし、その感染抑制メカニズムを解明することを目指した。本研究ではHA亜型の異なるA/Puerto Rico/8/34(PR/8)(H1N1)、A/Aichi/2/68(Aichi/68)(H3N2)およびA/Hong Kong/483/97(H5N1)インフルエンザウイルスを使用した。初めにGal-9とGal-1がウイルスの宿主細胞への感染を抑制するか否かについて調べた。Gal-9とGal-1をそれぞれH1、H3、H5インフルエンザウイルスと混合してMDCK細胞に接種した。プラークアッセイによりGal-9は異なる亜型のウイルスのプラーク形成を抑制することならびにGal-1はその活性を示さないことを明らかにした。また、PR/8ウイルス感染30分前にMDCK細胞をGal-9で前処理し50% Tissue culture infective dose(TCID₅₀) (50%の培養細胞が感染することができるウイルス量)を求めた結果、Gal-9がウイルスの細胞への感染を抑制することを明らかにした。Gal-9とウイルスとの結合をELISAで検討したところ、Gal-9がPR/8およびAichi/68に結合することを示した。つづいて金コロイド標識抗ガレクチン抗体をPR/8ウイルスに反応させ、これを電子顕微鏡で観察した結果、Gal-9はPR/8ウイルス粒子表面に

結合することが明らかとなった。さらにウエスタンブロッティングにより、Gal-9がPR/8ウイルス表面のHAに結合することが明らかとなった。そこで、Gal-9の認識物質を同定するためにGal-9とPR/8ウイルスの混合液にスクロースまたはラクトースを添加し、競合阻害効果をELISAで観察したところ、ラクトースの添加によりGal-9とウイルスの結合が抑制された。このことから、Gal-9はラクトースの骨格の1つであるガラクトースを認識する事が明らかとなった。以上の結果から、Gal-9はHAの糖鎖のガラクトースを認識して結合する事が解った。また、ウイルスの細胞への侵入抑制効果を観察するため蛍光タンパク質を用いて共焦点顕微鏡で観察したところ、Gal-9はPR/8ウイルスの宿主細胞への侵入効率を減少させることが明らかとなった。Gal-1にはGal-9が示した活性は認められなかった。

細胞実験によって得られた知見をもとに、臨床応用への可能性を調べるためにマウスモデルを使用してGal-9のA型インフルエンザウイルス感染抑制効果を検討した。マウスの鼻腔にPR/8ウイルスを接種し、経時的に肺胞洗浄液中のGalectinを定量したところ、PR/8ウイルスを感染させた5日目のマウスの肺胞洗浄液中に対照マウスのその7倍のGal-9が検出された。次に、Gal-9トランスジェニック (Tg) マウスにPR/8ウイルスを感染させ、16日間臨床観察したところ、Gal-9を高発現するGal-9 Tgマウスは野生型マウスと比較してウイルス感染に抵抗性を示し半数が生残した。これらの結果から、Gal-9はA型インフルエンザウイルス感染後に分泌誘導されることが明らかとなった。以上の考察から、Gal-9を外部より投与することによりウイルス感染を抑制出来るのではないかと考え、PR/8ウイルスを実験感染させた後、Gal-9を投与、あるいはGal-9とオセルタミビルを併用投与して治療効果を検討した。その結果、Gal-9はPR/8ウイルス感染マウスの肺のウイルス増殖、サイトカイン応答および体重減少を抑制した。Gal-9とオセルタミビルの併用投与を感染後48時間後に開始したところ、PR/8ウイルス感染マウスの体重減少が見られず、全てのマウスが生残した。したがって、Gal-9とオセルタミビルの併用投与はそれぞれの単独投与に比べウイルス感染抑制効果が高いことが解った。

以上のことから、Gal-9はA型インフルエンザウイルス表面のHA糖タンパク質に結合する糖鎖のガラクトースに結合することにより、ウイルスが宿主細胞表面のレセプターとの結合を抑制するものと結論される。Gal-9がH1, H3, H5ウイルスの感染を抑制したことは、Gal-9が季節性およびパンデミックインフルエンザに対する新規の抗ウイルス薬として利用できる可能性を示すものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬
副 査 教 授 山 下 正 兼
副 査 教 授 有 賀 早 苗

学位論文題名

Study on the inhibition of influenza A virus infection by Galectin-9

(ガレクチン9のインフルエンザAウイルス感染の抑制に関する研究)

博士學位論文審査等の結果について (報告)

季節性およびパンデミックインフルエンザは社会に甚大な被害を及ぼしてきた。迅速診断キットとノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬の登場によって重症のインフルエンザとこれによる死亡例は格段に減った。しかしながら、NA 阻害薬耐性ウイルスの出現が問題となっている。従って、他の阻害メカニズムの開発と新しい抗インフルエンザ薬の開発が待たれている状況である。

本論文は、このような状況のもと、生体内のタンパク質であるガレクチン9が、A型インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着と侵入に関与する糖タンパク質であるヘマグルチニン (HA) に結合することを見出し、この結合能により、ガレクチン9がインフルエンザウイルスの細胞への感染を阻害することを見出したものである。著者は更に、マウスへの感染実験において、ガレクチン9が抗インフルエンザ薬の候補となり得ることを明らかにした。

ガレクチンは哺乳動物では15種類存在し、生体内では免疫応答の制御等に関与するが、いずれも糖鎖を認識するドメインを有することが特徴である。インフルエンザウイルス表面の糖タンパク質であるHAやNAの糖鎖に強く結合する物質は、亜型にかかわらずウイルスの増殖を抑制することが期待される。そこで著者は、ガレクチンが、細胞およびマウスにおいてA型インフルエンザウイルスの感染を抑制するか否かを検討した。

著者は、まず、ガレクチン9が、HA亜型の異なるH1N1、H3N2およびH5N1インフルエンザウイルスの培養細胞への感染を抑制することを明らかにした。ウイルスの細胞への侵入抑制効果を観察するため、共焦点蛍光顕微鏡でウイルスタンパク質を観察したところ、ガレクチン9はウイルスの宿主細胞への侵入効率を減少させることが明らかとなった。また、この感染抑制は、ガレクチン9が直接ウイルス粒子に結合する結果であることを、生化学的アッセイや電子顕微鏡法を用いて示した。更にウエスタンブロッティング法により、ガレクチン9がウイルス表面のHAに結合することを明らかにした。そこで、ガレクチン9の認識物質を同定するために、ガレクチン9とインフルエンザウイルスの混合液にスクロースまたはラクトースを添加し、競合阻害効果をELISAで観察したところ、ラクトースの添加によりガレクチン9とウイルスの結合が抑制された。このことから、ガレクチン9はラクトースの骨格の1つであるガラクトースを認識する事が明らかとなった。

以上の研究成果は、ガレクチン9が新しい機構によってインフルエンザウイルスの感染を抑制できることを示したものであり、画期的であると言って良い。

著者は更に、臨床応用への可能性を調べるためにマウスモデルを使用してガレクチン9のA型インフルエンザウイルス感染抑制効果を検討した。マウスの鼻腔にウイルスを接種し、経時的に肺胞洗浄液中のガレクチン9を定量したところ、ウイルスを感染させた5日目のマウスの肺胞洗浄液中に対照マウスのその7倍のガレクチン9が検出された。次に、ガレクチン9トランスジェニックマウスにウイルスを感染させ、16日間臨床観察したところ、ガレクチン9を高発現するマウスは野生型マウスと比較してウイルス感染に抵抗性を示し半数が生残した。以上の結果から、著者は、ガレクチン9を外部より投与することによりウイルス感染を抑制出来るのではないかと

考え、ウイルスを実験感染させた後、ガレクチン9を投与、あるいはガレクチン9とノイラミニダーゼ阻害薬であるオセルタミビルを併用投与して治療効果を検討した。その結果、ガレクチン9はウイルス感染マウスの肺のウイルス増殖、サイトカイン応答および体重減少を抑制した。加えて、ガレクチン9とオセルタミビルの併用投与では、ウイルス感染マウスの体重減少が見られず、全てのマウスが生残した。したがって、ガレクチン9とオセルタミビルの併用投与はそれぞれの単独投与に比べウイルス感染抑制効果が高いことが解った。

以上の研究成果は、ガレクチン9の臨床応用への端緒を開く可能性を示唆するものであり、高く評価できる。

これを要するに、著者は、ガレクチン9がA型インフルエンザウイルス表面のHA糖タンパク質のガラクトース骨格に結合することにより、ウイルスが宿主細胞表面のレセプターと結合することを抑制するとの新知見を得たものであり、インフルエンザに対する予防、治療法の開発へ向けて貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。