

【第55回 小島三郎記念文化賞】

急性呼吸器感染症ウイルスの病原性発現ならびに 制御に関する研究

Research on pathogenesis and control of viruses causing acute respiratory infections

たけだ まこと
竹田 誠
Makoto TAKEDA

はじめに

今回は栄誉ある小島三郎記念文化賞をいただき、身に余る光栄でございます。これまでに受賞されました先生方のお名前とご業績を改めて拝見させていただきますと、喜び以上に、身の引き締まる思いでございます。本研究は、多数の先生のご指導のもとで多くの才能に溢れた共同研究者とともに達成した研究成果です。本研究課題に参加させていただきましたことに感謝しますとともに、本研究課題に携わりました全ての関係者の方々に、心よりのお礼を述べたいと思います。

I. 序論

私は、長年にわたり小児科医になることを目標に大学（信州大学医学部）卒業までを過ごしてまいりました。信州大学医学部の小児科学教室に入局し、小宮山淳教授（当時）や中畑龍俊助教授（当時）に感染症、免疫学、血液腫瘍学などを学び、また研究を通じて深く学ぶことの重要性を教わりました。臨床を通じてウイルス感染症を理解したいという思いが強まり、永井美之教授（東京大学医科学研究所：当時）を師事いたしました。永井先生のご指導のもと、麻疹ウイルスの研究をはじめ、その後、国立感染症研究所で田代真人先生のご指導を受けました。その後、米国のロバート・ラム教授（ノースウェスタン大学）のもとへ留学し、インフルエンザウイルスについて学ぶことができました。帰国後は、柳雄介教授（九州大学）のもとで、麻疹ウイルスにつ

いてさらに深く学ぶ機会をいただきました。永井美之先生、ならびに田代真人先生は、「宿主プロテアーゼ依存性ウイルストロピズム」の研究で著名であり、私は恩師らの研究を引き継いでインフルエンザウイルスの生体内活性化プロテアーゼを同定したいという思いから、国立感染症研究所へ部長として就任後は、麻疹ウイルスの研究に加えて、その研究にも取り組みました。宮村達男先生、渡邊治雄先生ら歴代所長のご指導のもとで、麻疹ワクチンの品質管理や麻疹の行政対応、国際協力活動などにも関わらせていただく機会をいただき、2015年の日本からの麻疹排除の達成にも、微力ながらも一部携わることができました。本稿では、これらの研究成果の一部を紹介させていただきます。

II. 麻疹

麻疹は、高熱、咳嗽および全身に広がる発赤疹を特徴とする急性ウイルス感染症である。罹患者に一過性の免疫抑制を引き起こすため、細菌性肺炎などの二次感染がしばしば合併する。今でも発展途上国を中心に年間数千万人が罹患し、数十万人が死亡すると考えられている。近年、わが国では対策が進み、麻疹の伝播は効果的に抑えられており、その結果、2015年には世界保健機関から、わが国が麻疹の排除状態（国内で伝播を続けるウイルス株がない状態）であることが認定されている¹⁾。ただし、海外の多くの国では依然として麻疹の流行が続いているため、わが国でも輸入症例を発端とした孤発例や小流行が続いている¹⁾。

Ⅲ. 野生型麻疹ウイルスの 遺伝子操作系の開発

1954年にEndersらは、ヒトの初代腎臓培養細胞を用いて、麻疹の病原体、麻疹ウイルスの分離に成功した²⁾(図1)。その意義は非常に大きく、その時の分離株であるEdmonston (ED) 株を親株にした複数のワクチン株が、今でも麻疹の制圧に大きく貢献している³⁾。ED株は、長年麻疹ウイルスの標準株として活用され、麻疹ウイルスの理解に大きく貢献するとともに、麻疹ウイルスの受容体として補体の制御因子CD46が同定され⁴⁾(図1)、またED株を用いた麻疹ウイルス遺伝子操作法が開発された⁵⁾。ED株を基軸とした麻疹ウイルス研究が大きく発展する中、1990年に小船富美夫博士(当時、国立予防衛生研究所)らは、Vero細胞など、当時麻疹ウイルスの研究に汎用されていた腎臓由来細胞よりも、マーモセットBリンパ芽球由来B95a細胞の方が、明らかに麻疹ウイルスに対する感受性が高く、このB95a細胞を用いることにより、ED株とは性質の異なる(Vero細胞では増殖能力が著しく低い)麻疹ウイルス株が分離できることを報告した⁶⁾(図1)。そして、B95a細胞分離株が、ED株とは異なり、サル

に対して明らかな麻疹様症状を引き起こすことを証明し、B95a細胞分離株こそが、真正の野生型麻疹ウイルスであると結論づけた⁶⁾。私たちは、B95a細胞分離株の全ゲノム構造を決定しED株との違いを明らかにするとともに⁷⁾、B95a細胞分離株を基にした麻疹ウイルス遺伝子操作技術を開発した⁸⁾。同年、小船先生らのB95a細胞分離株を譲り受けた九州大学の柳雄介教授らの研究グループが、B95a細胞分離株にはCD46を受容体として利用する能力はなく、免疫細胞上に発現しているSignaling Lymphocyte Activation Moleculer (SLAM) が、B95a細胞分離株が用いる受容体であることを明らかにした⁹⁾(図1, 2)。その後、B95a細胞分離株こそが、本来の麻疹ウイルスの性質を保持した野生型ウイルスであることが広く認められるようになり、ED株は、分離や継代の過程で本来増殖が難しい培養細胞に馴化し、その結果、弱毒化した変異株であることが明らかになっている。

Ⅳ. 麻疹ウイルスの細胞馴化機構

麻疹ウイルスが、本来感染できないVero細胞などの腎臓由来細胞に馴化適応した場合、その結果弱毒化すると考えられた⁶⁾。私たちは、Vero細胞など

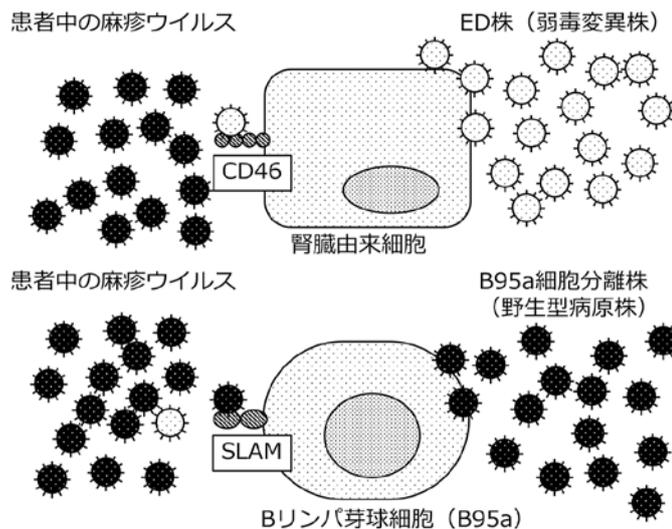


図1 エドモンストン(ED)株と野生型病原株の分離

腎臓由来初代培養細胞やVero細胞で分離した麻疹ウイルスは、多くの場合CD46を利用できるように変異しており、長年、標準株として利用されてきたED株もその一つである。また、馴化の過程で弱毒化していると考えられている。Bリンパ芽球由来B95a細胞を用いると、本来の性質を保持した野生型麻疹ウイルスを分離することができ、その株は病原性を保持している。

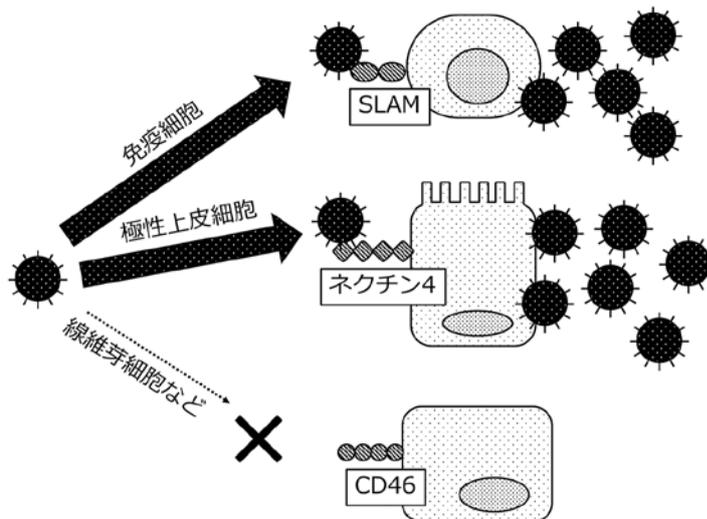


図2 野生型麻疹ウイルスの受容体

野生型の麻疹ウイルスの受容体は免疫細胞上に発現しているSLAMと、極性化する性質をもった上皮がもつネクチン4の二種類である。ワクチン株やED株を代表とする実験室継代株のいくつかは、それらに加えてCD46も利用できるように変異しているが、CD46は麻疹ウイルスの本来の受容体ではない。

の培養細胞への馴化の過程で、ポリメラーゼ機能の低下が起こること¹⁰⁾、そして、このポリメラーゼ機能の低下が、ワクチン株が弱毒であること理由のひとつであることを示した¹¹⁾。腎臓由来細胞への馴化適応の結果生じる大きな変化の一つは用いる受容体の変化であるが、ED株は、SLAMに加えてCD46を利用することができる。私たちは、この変化に必要なアミノ酸変異を特定するとともに¹²⁾、粒子形成に大きく依存した増殖形態に変化することでも麻疹ウイルスが、受容体SLAMのない細胞に馴化適応できることを示した^{13,14)}。

V. 麻疹ウイルスの自然免疫回避機構

ウイルスが、効率的に増殖するためには、宿主の免疫機構(特には自然免疫応答)を効果的に抑え込む必要がある。麻疹ウイルスのP遺伝子には、ポリメラーゼの構成因子Pタンパクに加えて、ふたつの非構造タンパク(CとV)がコードされている。これら非構造タンパクは機能が不明であったため、アクセサリタンパクと呼ばれてきた。私たちはVタンパクが、インターフェロン(IFN)の誘導やシグナル伝達を直接的に阻害する機能を持つことを明らかにした^{15~18)}(図3)。一方、CタンパクにIFNの誘導やシグナル伝達を直接的に阻害する機能は見ら

れなかった。ただし、培養細胞を用いた詳細な解析の結果、CタンパクはウイルスRNAの合成を調整することにより、宿主細胞による認識を回避することでIFNの誘導を抑えていることが明らかとなった^{17,19)}(図3)。結果として、遺伝子操作によってCタンパクの発現を無くした組換えウイルスは、完全に病原性を失っており、麻疹ウイルスが病原性を発揮するために不可欠のタンパクであることが明らかになった²⁰⁾。

VI. 麻疹ウイルスの上皮細胞感染機構

麻疹ウイルスの受容体が免疫細胞の分子SLAMであることが明らかとなり、免疫抑制を伴う麻疹の病態が明らかにされていった。しかしながら、SLAMを介した感染のみで、麻疹の強い伝染力を説明できるかについては、研究者の間でも議論の分かれるところであった。私たちは、野生型の麻疹ウイルスが、CD46はもちろんのこと、SLAMを用いることなく、効率的に上皮細胞に感染する能力を保持していることを見出した²¹⁾。麻疹ウイルスに感染する上皮細胞の特徴としては、密着結合を形成し極性化を起こしている細胞、すなわち外界と接する全ての上皮を覆う組織にみられる細胞であり、この性質が麻疹の強い伝染力の基盤となっていると考えられた^{22~24)}。その後、

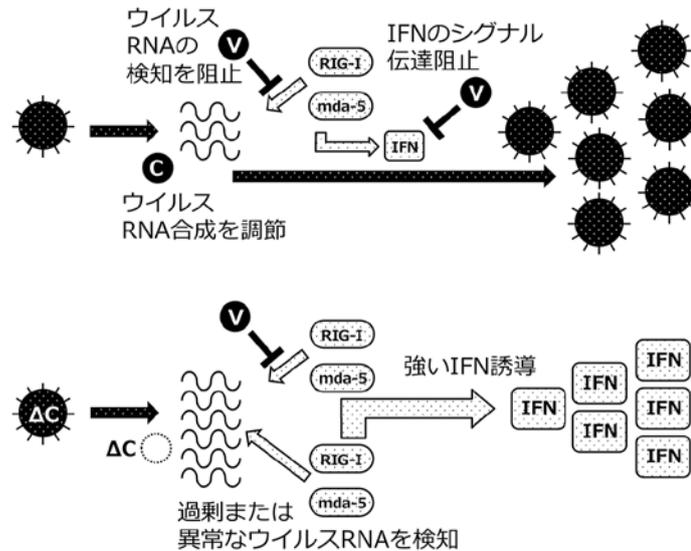


図3 麻疹ウイルスの自然免疫回避機構

麻疹ウイルスは、遺伝子に二つの非構造タンパク(CとV)をコードしている。Cタンパクは、ウイルスのRNA合成を調節する機能を持ち、過剰もしくは異常なRNAウイルスが合成されることを防いでいる。宿主のRIG-Iやmda-5は細胞内のウイルスRNAを検知してIFNを誘導する機能を持つが、Vタンパクは、その検知機能を防ぐ働きがある。また、VタンパクはIFNの下流のシグナルを阻害して細胞が抗ウイルス状態になるのを防ぐ働きもある。Cタンパクを発現しないように変異させた麻疹ウイルス(Δ C)は、自身の過剰もしくは異常なRNA合成のために、Vタンパクだけでは、もはやIFNの誘導を抑えることはできず、結果として増殖が著しく制限され、病原性を完全に消失する。

海外の研究チームによって麻疹ウイルスの上皮細胞上受容体が、接着結合部に発現しているネクチン4であることが証明された^{25, 26)} (図2)。

VII. 宿主プロテアーゼ依存性 ウイルストロピズム

ウイルスが感染できる動物の種類、臓器または細胞は、それぞれ決まっており、この性質はウイルスのトロピズムと呼ばれている。ウイルスのトロピズムを決める因子として、最も分かりやすい例は、受容体である。どの動物種のどの分子を受容体として利用できるか、そしてその受容体がどの臓器、組織、細胞に発現分布しているかで、それぞれのウイルスが感染できる動物種、組織、細胞が決まってくる。同様のことが、宿主のプロテアーゼに関しても明らかになっている。多くのウイルス膜融合タンパクは、活性を持たない前駆体として合成され、宿主のプロテアーゼによって開裂されることにより膜融合能を持った活性型になる(開裂活性化)。すなわち、膜融合タンパクを開裂活性化するプロテアーゼを持った細胞、組織、臓器でしかウイルスは増殖できない

ため、宿主のプロテアーゼの種類や局在、そしてそれらプロテアーゼに対するウイルス膜融合タンパクの感受性の違いがウイルストロピズムの重要な決定因子の一つになっている。この原理は「宿主プロテアーゼ依存性ウイルストロピズム」と呼ばれ、本原理の基礎となる発見は、センダイウイルスを研究していた本間守男先生(東北大学:当時)とその研究チームによってなされた^{27, 28)}(田代真人先生は、本研究チームの一員である)。永井美之先生らは、トリの病原体ニューカッスル病ウイルス(NDV)を用いて、この原理が、ウイルス株の病原性の違いを明確に説明することを示した²⁹⁾(図4)。NDVには、強い呼吸器症状、神経症状を呈する致死性の強毒株と、軽い呼吸器症状もしくは無症状の病態しか示さない弱毒株がある。強毒株の膜融合タンパク(Fタンパク)は、細胞に普遍的に発現しているプロテアーゼで開裂活性化する性質をもち、常に活性型の粒子が産生される²⁹⁾。この性質が、強毒株に全身臓器で増殖できる潜在的能力を与えている³⁰⁾。のちの研究で強毒株の膜融合タンパクを開裂活性化させる宿主プロテアーゼが、ゴルジ装置やトランスゴルジネットワークに普遍的に発現しているフーリンやフーリ

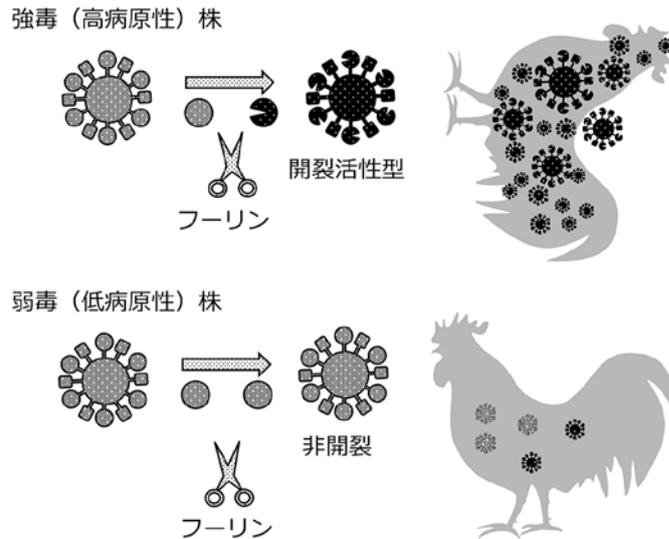


図4 ウイルスの病原性とフーリンによる開裂活性化との関係

鳥インフルエンザウイルスやニューカッスル病ウイルスには、病原性が顕著に異なる強毒(高病原性)株と弱毒(低病原性)株とがある。強毒(高病原性)株ウイルスの膜融合タンパクは、細胞のゴルジ装置に普遍的に発現しているフーリンで開裂活性化できるために、ウイルスは全身性感染を起こし、強毒性を発揮する。一方、弱毒(低病原性)株ウイルスは、フーリンでは開裂活性化できず、何らかの組織偏在性のプロテアーゼが開裂活性化に必要と考えられ、局所感染に止まり、病原性が低い。

ン様プロタンパク転換酵素 PC5/6 であることが明らかになっている^{31, 32)} (図4)。一方、弱毒株は一般的な培養細胞で増殖させた場合、開裂活性化しないため、培養細胞で増殖させるためには、培養液にプロテアーゼの一種であるトリプシンを添加する必要がある。すなわち、特定の細胞や組織に偏在するプロテアーゼが弱毒株ウイルスの活性化に必要であると考えられ、弱毒株が局所感染に止まる理由になっていると考えられている³⁰⁾ (図4)。永井先生らが NDV で明らかにしたこの原理は、鳥インフルエンザウイルス(高病原性と低病原性とがある)においても、ほぼ同様の原理が当てはまることが示されている^{33, 34)}。

VIII. 呼吸器ウイルス活性化酵素 TMPRSS2

上記で述べたように、強毒株 NDV や高病原性鳥インフルエンザウイルスの膜融合タンパク(インフルエンザウイルスの場合は HA タンパク)を開裂活性化するプロテアーゼはフーリンまたは PC5/6 である^{31, 32)}。一方、弱毒株(または低病原性)ウイルスを細胞内もしくは生体内で活性化するプロテアーゼは明らかになっていなかった。ヒトの季節性 A

型インフルエンザウイルスは、低病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに適応したウイルスであり、低病原性鳥インフルエンザウイルスの場合と同様に、このウイルスを呼吸器上皮で開裂活性化するプロテアーゼは未解明であった。2005 年頃までに、多数のプロテアーゼがインフルエンザウイルスの開裂活性化のための候補として報告されていた³⁵⁾。それら候補のひとつ、II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、その局在、発現様式、認識される基質配列の特徴、HA タンパクに対する酵素活性の強さなどから、最も有力な候補であると私たちは考えた^{36~38)}。TMPRSS2 がインフルエンザウイルスの生体内での増殖に関与していることを明らかにするために、TMPRSS2 ノックアウトマウスを作成し、解析を行った³⁹⁾。TMPRSS2 ノックアウトマウスの肺内では、インフルエンザウイルス HA タンパクの開裂活性化は、著しく制限されており、ウイルスの増殖性は非常に低く、致死量のウイルス量の投与に対しても、全く症状を示さなかった³⁹⁾ (図5)。ほぼ、同様の成果が、同時期に2つの海外のグループからも発表され、ヒト季節性インフルエンザウイルスや低病原性鳥インフルエンザウイルスの生体内開裂活性化酵素が TMPRSS2 であることが証明された^{39~41)}。

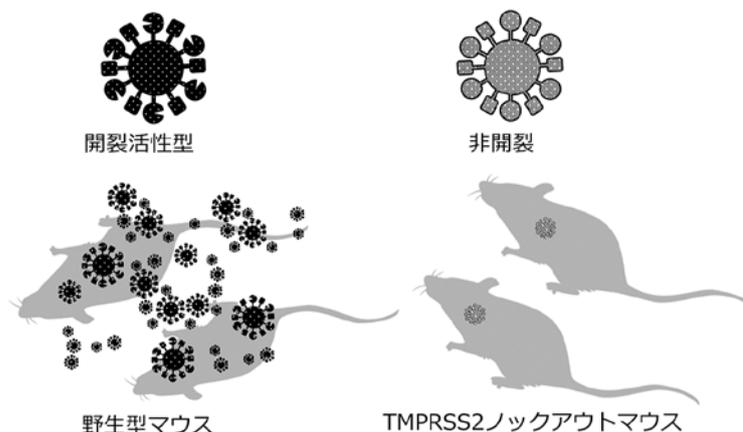


図5 インフルエンザウイルスの開裂活性化と TMPRSS2

ヒトの季節性インフルエンザウイルスや低病原性鳥インフルエンザウイルスは、TMPRSS2の発現をノックアウトしたマウスの肺内では開裂活性化できず、増殖性も著しく低い。すなわち、TMPRSS2は、インフルエンザウイルスの生体内での開裂活性化プロテアーゼであると考えられる。

さらに私たちは、重症呼吸器感染症を引き起こす SARS コロナウイルスや MERS コロナウイルスに関しても類似の解析を行い、SARS そして MERS コロナウイルスの気道感染においても TMPRSS2 が重要な役割を果たしていることを明らかにした^{42, 43)}。

謝 辞

今回紹介させていただきました研究の内容は、沢山の共同研究者やご指導くださいました恩師の先生方、そして、様々な形でご協力してくださいました多くの方々のお陰で達成できたものであります。全ての方々に心よりの感謝の気持ちを表したいと思います。また、今回の受賞に関しまして、黒住医学研究振興財団の諸先生方、関係各位に心より御礼を申し上げます。また、推薦の労をお取りくださいました倉田毅先生（元国立感染症研究所長）、ならびにご審査くださいました審査委員長の渡邊治雄先生、審査員の諸先生方に対しまして、深い敬意と感謝を表したいと思います。本賞受賞者の列に加わる者として、その荣誉に恥じぬよう、より一層の努力を続けたいと思います。

文 献

- 1) Seki F et al. 2019. Nationwide molecular epidemiology of measles virus in Japan between 2008 and 2017. *Front Microbiol* **10** : 1470.
- 2) Enders JF, Peebles TC. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* **86** : 277-286.
- 3) Bankamp B et al. 2011. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J Infect Dis* **204** Suppl 1 : S533-548.
- 4) Dorig RE et al. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75** : 295-305.
- 5) Radecke F et al. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* **14** : 5773-5784.
- 6) Kobune F et al. 1990. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol* **64** : 700-705.
- 7) Takeda M et al. 1999. The genome nucleotide sequence of a contemporary wild strain of measles virus and its comparison with the classical Edmonston strain genome. *Virology* **256** : 340-350.
- 8) Takeda M et al. 2000. Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J Virol* **74** : 6643-6647.
- 9) Tatsuo H et al. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406** : 893-897.
- 10) Takeda M et al. 1998. Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J Virol* **72** : 8690-8696.
- 11) Takeda M et al. 2008. Measles viruses possessing the polymerase protein genes of the Edmonston vaccine strain exhibit attenuated gene expression and growth in cultured cells and SLAM knock-in mice. *J Virol* **82** : 11979-11984.
- 12) Tahara M et al. 2007. Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquire the ability to use receptor CD46 efficiently. *J Virol* **81** : 2564-2572.
- 13) Tahara M et al. 2005. Contributions of matrix and large

- protein genes of the measles virus Edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol* **79** : 15218-15225.
- 14) Tahara M et al. 2007. Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J Virol* **81**.
 - 15) Takeuchi K et al. 2003. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* **545** : 177-182.
 - 16) Ohno S et al. 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol* **85** : 2991-2999.
 - 17) Nakatsu Y et al. 2008. Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J Virol* **82** : 8296-8306.
 - 18) Ikegame S et al. 2010. Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *J Virol* **84** : 372-379.
 - 19) Nakatsu Y et al. 2006. Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus. *J Virol* **80** : 11861-11867.
 - 20) Takeuchi K et al. 2005. Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J Virol* **79** : 7838-7844.
 - 21) Takeda M et al. 2007. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. *J Virol* **81** : 12091-12096.
 - 22) Tahara M et al. 2008. Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells by using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. *J Virol* **82** : 4630-4637.
 - 23) Takeda M. 2008. Measles virus breaks through epithelial cell barriers to achieve transmission. *J Clin Invest*.
 - 24) Shirogane Y et al. 2010. Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus. *J Biol Chem* **285** : 20882-20890.
 - 25) Muhlebach MD et al. 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **480** : 530-533.
 - 26) Noyce RS et al. 2011. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* **7** : e1002240.
 - 27) Homma M, Ouchi M. 1973. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. 3. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *J Virol* **12** : 1457-1465.
 - 28) Tashiro M, Homma M. 1983. Evidence of proteolytic activation of Sendai virus in mouse lung. *Arch Virol* **77** : 127-137.
 - 29) Nagai Y et al. 1976. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* **72** : 494-508.
 - 30) Nagai Y. 1993. Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends Microbiol* **1** : 81-87.
 - 31) Stieneke-Grober A et al. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* **11** : 2407-2414.
 - 32) Horimoto T et al. 1994. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol* **68** : 6074-6078.
 - 33) Klenk HD et al. 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **68** : 426-439.
 - 34) Bosch FX et al. 1979. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* **95** : 197-207.
 - 35) Kido H et al. 2008. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *J Mol Genet Med* **3** : 167-175.
 - 36) Bottcher E et al. 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* **80** : 9896-9898.
 - 37) Shirogane Y et al. 2008. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol* **82** : 8942-8946.
 - 38) Abe M et al. 2013. TMPRSS2 is an activating protease for respiratory parainfluenza viruses. *J Virol* **87** : 11930-11935.
 - 39) Sakai K et al. 2014. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol* **88** : 5608-5616.
 - 40) Tarnow C et al. 2014. TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. *J Virol* **88** : 4744-4751.
 - 41) Hatesuer B et al. 2013. Tmprss2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice. *PLoS Pathog* **9** : e1003774.
 - 42) Matsuyama S et al. 2010. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* **84** : 12658-12664.
 - 43) Iwata-Yoshikawa N et al. 2019. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. *J Virol* **93**.