

氏名（本籍）	春山 貴弘（群馬県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博乙第 2692 号		
学位授与年月	平成26年 4月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Findings and analysis of novel spreading mode in influenza virus infection: Tamiflu-resistant but HA-mediated cell-to-cell transmission through apical membranes of cell-associated virions (インフルエンザウイルス感染における新規伝播様式の発見と解析: タミフル非感受性 HA 依存型のウイルス粒子非放出性細胞間伝播)		
主査	筑波大学教授	薬学博士	金保 安則
副査	筑波大学准教授	博士（人間・環境学）	森川 一也
副査	筑波大学講師	博士（理学）	小林 麻己人
副査	筑波大学講師	博士（医学）	福田 邦明

論文の内容の要旨

（目的）

ウイルス粒子の細胞間伝播様式は、感染細胞から放出されて遊離した cell-free virion による遠方伝播と、接触する細胞間をウイルス粒子が横断し移行が成立する近傍伝播（cell-to-cell transmission）の二式に大別される。多くのウイルスでは前者の cell-free virion による伝播を主とするが、レトロウイルスや肝炎ウイルス、ヘルペスウイルスの一部などで、後者の cell-to-cell transmission による感染拡大が確認されており、宿主免疫応答や抗ウイルス剤からの回避といったウイルス側の生存戦略に寄与している可能性から、ウイルス学的にも臨床学的にも注目されている。

インフルエンザウイルスの伝播様式は、これまで cell-free virion による遠方伝播のみとされており、その他の伝播様式については言及されていない。春山氏は、生薬として広く利用されているイチョウ葉エキスが示した抗インフルエンザウイルス活性を詳細に解析する過程で、インフルエンザウイルス感染においても cell-to-cell transmission が存在する可能性に帰着した。そこで、本研究では、イチョウ葉エキスの抗インフルエンザウイルス活性とその作用点について検討し、さらには、インフルエンザウイルス感染における cell-to-cell transmission の存在を証明することを目的としている。

(対象と方法)

MDCK 細胞を用いたプラーク形成試験及び血球凝集阻止試験により、イチョウ葉エキスの抗インフルエンザウイルス活性とその作用点について検討している。また、ウイルス亜型間での活性差異についても検討している。

インフルエンザウイルスが cell-to-cell transmission により伝播する可能性について検討するため、reverse genetics 法により、新生ウイルス粒子の放出過程に寄与しているノイラミニダーゼ (NA, Neuraminidase) を緑色蛍光タンパク質 (GFP, green fluorescent protein) に置換した組換えインフルエンザウイルスを作製している。当該組換えウイルスを MDCK 細胞に感染させ、Live imaging 手法により蛍光を指標として感染の広がりを経時的に観察している。NA 阻害剤として臨床でも繁用されている Oseltamivir phosphate (Tamiflu®) 存在下における野生型のインフルエンザウイルス感染についても cell-to-cell transmission の有無といった観点から蛍光免疫染色法により評価している。また、cell-to-cell transmission の動作メカニズムについて解析するため、Trypsin 要求性、アマンタジン感受性、トランスウェルと感染中和抗体を用いたウイルス伝播の局在確認を行っている。さらに、インフルエンザウイルスの温度感受性変異株と野生株を用いた重感染モデルにて NA 非依存的な細胞間伝播の特性について検討している。

(結果)

イチョウ葉エキスはインフルエンザウイルスに直接作用することで、感染力の低減ないしは宿主細胞への吸着阻害により抗ウイルス活性を示すことを示唆している。イチョウ葉エキスの抗ウイルス活性は A 型 (H1N1, H3N2) 及び B 型インフルエンザウイルスに対しても同様に作用していることを示している。興味深いことに、ウイルス吸着以降にイチョウ葉エキスを含むアガロース含有培地を添加・重層し作用させても、出現プラークの大きさに何ら影響を与えないことを明らかにしている。このイチョウ葉エキスに対する非感受性から、これまで知られていなかったインフルエンザウイルス感染における cell-to-cell transmission の存在に帰着している。その可能性について検証するため、NA 欠損/GFP 発現組換えインフルエンザウイルスによる Live imaging 解析を行った結果、インフルエンザウイルスによる感染が隣接する周囲の細胞へと cell-to-cell で徐々に広がっていく様子を撮影することに成功している。同様の cell-to-cell transmission は、野生型インフルエンザウイルスにおいても Tamiflu® 存在下で局所的に生じていることを確認している。この cell-to-cell transmission は NA 非依存的であるだけでなく、Trypsin 要求性であり、M2 阻害剤であるアマンタジンにより阻害されることを明らかにしている。また、感染中和抗体とトランスウェルを用いた検討から、cell-to-cell transmission は感染細胞の頂端膜 (apical membrane) 側で生じていることを示唆している。既知の cell-free virion による感染伝播の場合、新規合成された NA によって感染細胞表面のレセプター (シアル酸) が除去されるため重感染は起こらないが、NA 活性が薬剤により阻害されている条件下では、感染細胞膜上のシアル酸が感染後期においても残存するため、感染細胞への重感染が充進することを見出している。

(考察)

本研究で見いだされたインフルエンザウイルスの cell-to-cell transmission は、Tamiflu® 存在下においても局所的に進行するため、微小環境における NA 阻害剤の有効性には再考の必要があると考えている。Cell-to-cell transmission は Trypsin による HA の成熟化を必要とし、またアマンタジンに対して感受性を示したことから、cell-free virion の感染過程と同様の経路、即ち、シアル酸を介した細胞への

審査様式 2 - 2

吸着、エンドサイトーシスによる細胞内在化、エンドソーム膜との膜融合を経て感染が成立していると考えられている。さらに、cell-to-cell transmission は極性を有する宿主細胞の頂端側で生じており、この点も cell-free virion と同様であり、Tamiflu®存在下においては、感染細胞表面に残存したシアル酸に起因する重感染が亢進されたが、cell-to-cell transmission はこの重感染を許容しながら局所的に進行し拡大すると考察している。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文では、新たなインフルエンザウイルスの細胞間伝播様式として cell-to-cell transmission を見出している。さらに、この感染様式は NA 阻害薬存在下でも阻害することが出来ず局所的な感染拡大を許容するため、薬剤耐性株等の変異株発生の温床となり得ることを見出している。これらの研究成果は、極めて独創性が高いと評価でき、また、NA 阻害薬に傾倒した現在のインフルエンザ治療を再考する契機となるものと期待できる。

平成 26 年 3 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。