

RNA ウイルス感染制御に資する研究

北里大学大村智記念研究所 ウイルス学

戸高 玲子

感染症とは、ウイルスや細菌、寄生虫などの病原体が宿主の体内に侵入後増殖し、宿主側にさまざまな症状を引き起こす疾患の総称である。病原体が体内に侵入しても症状がほとんど現れず（無症候性感染）、自然に病原体が排除される場合もあるが、感染後に重篤な症状を引き起こし死に至る感染症も多く存在する。病原体から身を守り、その感染拡大を最大限に止めるためには、病原体の排除や感染経路の遮断、また宿主側の抵抗力向上といった対策が肝要である。ウイルスはタンパク質と脂質、核酸から構成され、さまざまな感染経路を通じて宿主細胞に侵入後増殖し、宿主側に影響を与えてウイルス感染症を引き起こす。ウイルスの細胞への感染様式や細胞内複製機構、さらにウイルス粒子の構造を詳細に解析することは、抗ウイルス剤や消毒剤の探索・開発につながり、病原体であるウイルスの不活化・排除という感染制御の一端を担うこととなる。また宿主側の対抗策として、ウイルスに対する免疫応答を活性化し、感染防御や重症化阻止の効果を持つワクチンの開発もウイルス感染制御のためには重要である。

以上を踏まえ、本論文では以下の三章に分けて RNA ウイルスの感染制御の実践に資する研究をまとめた。

- I. ウイルスの構造解析による宿主細胞への感染機構の研究
- II. 抗体による実践的ウイルス感染制御の研究
- III. ワクチンによる宿主側免疫応答誘導を用いたウイルス感染制御

I ウイルスの構造解析による感染増殖機構解明

ウイルスの構造解析はウイルスがいかにして宿主に感染し、複製増殖するかを解明することの手がかりとなり、抗ウイルス薬やワクチン開発の上で重要である。ヒトノロウイルス (Human Norovirus: HuNoV) は主に冬季に流行するウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして知られている。第一章では、継代培養が難しい HuNoV の代替ウイルスとして、培養細胞で容易に増殖可能なネズミノロウイルス (Murine Norovirus: MNV) を用いた、ウイルス粒子の構造解析をおこなった。

I-1 MNV 粒子の重金属分子依存的な可逆的形状変化

クライオ電子顕微鏡による MNV 粒子の構造解析をおこなうため、リバーシジェネティックスシステムを用いて Murine Norovirus type1 (MNV-1) を作製した。作製したウイルス粒子をクライオ電子顕微鏡で観察したところ、粒子を懸濁した溶液によって粒子構造が変化することを見出した。粒子は PBS(-) に金属のキレート剤である EDTA を加えた溶液中ではウイルス粒子表面上にある突起状構造 (protruding domain: P 領域) が立ち上がり、隣り合った下部 (P1 サブドメイン) が接合する Rising conformation

(上昇型)を、細胞培養液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) 中では P 領域が縮み、隣り合った上部(P2 サブドメイン)が接合する Resting conformation (静止型)をとっていた。この構造変化は pH と金属イオン濃度の変化によって起こり、可逆的であった。

I-2 宿主細胞への感染は、ウイルス粒子形状変化によって導かれる

P 領域がとるコンフォメーションの違いによってウイルスとしての性質が異なるのかどうかを調べるため、感染感受性細胞である RAW264.7 細胞に両ウイルスを感染させた。その結果、静止型の粒子は上昇型の粒子に比べ細胞への吸着性が高く、感染後 12 時間までの初期ゲノム複製量は約 26 倍、増殖速度は 3-4 時間早いことがわかった。このことから上昇型のウイルス粒子に比べ静止型のウイルス粒子は細胞上のレセプターに容易に結合できる形状であると予想され、その結果としてウイルスの増殖効率に差が生じたと考えられた。

HuNoV においても MNV と同様に 2 つの P 領域の構造が観察されたことから、ヒトの体内でも P 領域の構造変化によりウイルスの感染性が制御されている可能性がある。さらなる解析を進めることで HuNoV に対する治療薬やワクチン開発の基盤となることが期待された。

II 抗体による実践的ウイルス感染制御

ウイルスを不活化させるということは、ウイルスに対する直接的な攻撃となり、抗ウイルス薬や消毒剤の開発は重要な課題である。しかしながら、自身の細胞を持つ細菌とは異なり、ウイルスは宿主細胞の持つ機能を利用して増殖し感染症を引き起こすことから、ウイルスのみを標的とし、宿主側に影響を及ぼさない薬剤を開発することは容易ではない。ウイルスの不活化にはエタノールや次亜塩素酸ナトリウムなどの消毒剤、抗体によるウイルス中和、ウイルス増殖機構に作用しウイルスの増殖を阻害する抗ウイルス薬などが用いられる。第二章では、近年新たな抗体薬のモダリティとして注目されているナノ抗体による SARS-CoV-2 の *in vitro*、*in vivo* での抗ウイルス活性評価について述べる。

II-1 ナノ抗体 (VHH) によるウイルス中和

ラクダ科動物は、重鎖 (H 鎖) と軽鎖 (L 鎖) からなる IgG 抗体の他に、重鎖のみからなる抗体 (HCAb) を持つことが知られている。この重鎖抗体の可変領域を VHH (Variable domain of Heavy chain of Heavy chain) と呼ぶ。ナノ抗体とも呼ばれる VHH は従来の抗体の 1/10 の大きさであり、シングルドメイン抗体であるため、他のタンパク質やペプチドなどと容易に融合することで新たな機能を付加することが可能である。今回、cDNA ディスプレイ法により得られた SARS-CoV-2 の S タンパク質に特異的に結合する VHH(K-874A)の抗ウイルス活性を評価した。SARS-CoV-2 は肺組織を標的とし、重篤な呼吸器疾患を誘導することから、K-874A の評価には、SARS-CoV-2 に感受性があるヒト肺胞由来のオルガノイドを用いた。オルガノイド細胞を SARS-CoV-2

と 1 時間インキュベートした後、感染細胞を K-874A 含有培地で 3 日間処理した。未処理の細胞は、3 日目に 1×10^7 RNA コピー/ μL 以上のウイルスを培養上清に放出したが、K-874A 処理により新生ウイルスの産生は 1×10^4 RNA コピー/ μL に減少した。

II-2 ハムスターモデルにおけるウイルス増殖の抑制

SARS-CoV-2 感染モデルであるシリアンハムスターを用いて、K-874A の経鼻投与によるウイルス増殖抑制効果を調べた。K-874A を投与しなかった群のみ体重が減少し、K-874A を投与した群では新型コロナウイルスの感染によって引き起こされる症状が緩和されたことが確認された。また、肺におけるウイルス量を測定したところ、K-874A 非投与群では $1 \times 10^7/\mu\text{L}$ であったのに対し、投与群では $10^3/\mu\text{L}$ 程度にまで減少した。

以上より K-874A は *in vitro* においてウイルス中和活性を示し、*in vivo* においても経鼻投与でウイルス増殖を抑制したことから新たな新型コロナウイルス感染症治療薬候補の可能性を示した。

III ワクチンによる宿主側免疫応答による感染制御

2019 年中国武漢で発生した未知の肺炎の原因ウイルスとして報告された SARS-CoV-2 は数ヶ月のうちに旅行者を通じて全世界に広がった。未曾有のパンデミックを引き起こしたこのウイルスについて、WHO は 2020 年 3 月 11 日に緊急事態宣言を発表、効果的なワクチンの迅速な開発が期待された。その中でも二つの mRNA ワクチン、BNT162b2 (Comirnaty[®]、Pfizer-BioNTech) と mRNA-1273 (Spikevax[®]、Moderna) は大規模な第Ⅲ相臨床試験を経て異例のスピードで緊急認可、世界各国での予防接種が行われた。第三章では、これら二つのワクチンの免疫後応答を評価するため、ワクチンによる一次およびブースター免疫後の血清を用いて、SARS-CoV-2 各変異株に対する中和抗体価、S タンパク質に対する血中 IgG およびサイトカイン産生量の測定をおこない、細胞性および液性免疫応答の持続性を解析した。

III-1 血清中 IgG 量と中和抗体価の変化

BNT162b2 および mRNA-1273 を接種した成人よりそれぞれ血清を採取し、各変異株に対する血清中の S タンパク質に対する IgG 量と中和抗体価を測定した。両ワクチンを接種した群とも 2 回目接種後 1 ヶ月に比べ、3 ヶ月後で S タンパク質に対する IgG 量が低下、中和抗体価の減少がみられた。また、オミクロン株に対する中和抗体価はアルファおよびデルタ株に比べて有意に低下していた。ブースター免疫後中和抗体価と IgG 量は再び上昇し、良好なブースター効果が認められた。

III-2 血清中サイトカインの解析

免疫後血清を用いた血中サイトカイン量解析では、両ワクチン群とも接種後に細胞性免疫応答の指標である Th1 サイトカイン量が上昇していた。また Th2 および炎症性サイトカイン量は mRNA-1273 接種群でより高く、強い液性免疫応答を示した。無症候性感染が疑われる被験者において IL-6 量の増加が認められ、中和抗体価の上昇に寄与

していることが示唆された。

以上、三章に分けてウイルスの感染制御に関わる研究について述べた。ウイルスの構造を知り、その特性を利用した抗ウイルス薬や消毒剤の開発、ワクチンの開発がなされることで、多方向かつ複合的に病原体であるウイルスにアプローチし、最終的にウイルス感染症の制圧につながると考えている。