

2. ニパウイルスの病原性発現機序とワクチン開発の研究

米田 美佐子

東京大学医科学研究所実験動物研究施設部門

ニパウイルスは、1990年代終わりにエマージングウイルスとして出現し、ヒトに高い致死率の感染症を引き起こす。我々はニパウイルスのリバースヘネティック系を開発し、本系を用いてウイルスの細胞感受性とリセプター発現との関係、アクセサリ蛋白の病原性への関与を解析した。また、ワクチン開発にも着手し、ニパウイルス膜蛋白発現組換え麻疹ウイルスが高い防御能を示し、有望なワクチン候補となることを示した。

1. はじめに

ニパウイルスは、1998年に我が国に近いマレーシアで出現し、265名の感染者と100名以上の死者を出した。養豚場のブタからヒトに感染が広がったことが明らかにされたため、政府によって流行地域のブタをすべて殺処分することにより流行は収束した¹⁾。屠殺したブタの数は110万頭におよび養豚業のみならず関連産業に広く影響し、国家経済に大きな被害をもたらしたが、その後の政府の徹底した養豚業管理対策等が功を奏して、マレーシアでの再流行は起っていない。しかし、ニパウイルス感染症はインドやバングラデシュで2001年から相次いで発生している²⁾。マレーシアでの出現当初の致死率は40%であったが、バングラデシュでの流行では70から90%にのぼっている (Table.1)。自然宿主は、1994年にオーストラリアで出現し、ニパウイルスと極めて近縁のヘンドラウイルスがオオコウモリであると発見された直後であったことから、ニパウイルスもオオコウモリであることが迅速に同定された³⁾。両者とも死亡率の高いエマージングウイルスであり、自然界に生息するオオコウモリにこれらのウイルスがどのように広まっているのかを調べることは重要課題と考えられた。

ニパウイルス感染症の出現直後から血清抗体調査や遺伝子検出が行われ、アジアからアフリカに渡って生息するオオコウモリにウイルス保有個体が存在すると報告された⁴⁾。これらの発見以降オオコウモリがフィロウイルスを含む様々なウイルスを保有する事が明らかになってきた。ごく最近、ニパウイルスも属するパラミクソウイルス科のウイルス全般についての大規模な血清抗体調査が行なわれて、世界に分布するオオコウモリが広くパラミクソウイルスを保有していることが示された^{5,6)}。ニパウイルスについても、アジア、オーストラリアのみならず、アフリカや南米でも抗体陽性あるいはニパ様ウイルス遺伝子陽性個体が見つかる (Fig.1)。すなわち、ニパ様ウイルスは全ての大陸に生息するオオコウモリが保有していることが明らかになった。

ニパウイルスは、モノネガウイルス目 (一本鎖マイナス鎖の非分節型 RNA ウイルス)、パラミクソウイルス科に属し、ヘンドラウイルスと共にヘニパウイルス属に分類される⁷⁾。ゲノム構造はパラミクソウイルスと同様に ORF が N, P, M, F, G, L の順に並ぶ (Fig.2)。これらの遺伝子から6つの構造蛋白が作られるが、P 遺伝子からはさらに、V, C, W と呼ばれるアクセサリ蛋白が作られる。パラミクソウイルス科のウイルスと比較して異なる特徴は、ゲノム長が他のウイルスは15~16Kb程度であるのに対して、ヘニパウイルスは18Kb以上とかなりゲノムサイズが大きいことがあげられる。近縁の麻疹ウイルスと比較するとゲノム全長で2352塩基長いが、このうち Coding 領域に由来する鎖長の違いは804塩基しかなく (うち606塩基はP遺伝子に由来する)、残りは残りは Non-coding 領域に由来する。特に3'UTR 領域が長くなっており、ここに何ら

連絡先

〒108-8639
東京都港区白金台4-6-1
東京大学医科学研究所実験動物研究施設部門
TEL: 03-5449-5498
FAX: 03-5449-5379
E-mail: yone@ims.u-tokyo.ac.jp

Table.1 Outbreakes of Nipah virus in Bangladesh and India

Year	Month	Location	cases	fatalities	mortality
2001	Jan	India	66	49	74%
	Apr-May	Bangladesh	13	9	69%
2003	Jan	Bangladesh	12	8	67%
2004	Jan-Feb	Bangladesh	42	14	33%
	Apr	Bangladesh	36	27	75%
2005	Jan	Bangladesh	32	12	38%
2007	Jan-Feb	Bangladesh	7	3	43%
	Mar-Apr	Bangladesh	8	5	63%
	May	India	50<	5	~10%
2008	Feb-May	Bangladesh	9	8	89%
2010	Feb-Mar	Bangladesh	16	14	88%
2011	Jan-Feb	Bangladesh	44	40	91%
2012	Feb	Bangladesh	12	10	83%
2013	Jan-Mar	Bangladesh	24	21	88%
2014	Jan-Feb	Bangladesh	18	9	50%

かの機能があるのではないかと推測されている。

本研究では、ニパウイルスの病原性について解析するため、組換えウイルス作出系の開発とそれをを用いた解析、またニパウイルスに対するワクチン開発を行なった。

2. ニパウイルスの組換えウイルス作出系の開発

ウイルス遺伝子 cDNA から感染性ウイルスを作製するリバースジェネティクス系は、現在ではウイルスの性状解析やワクチン開発に不可欠な技術となっている。そこで我々は、まずニパウイルスについて、本系を開発することを試みた。ウイルス感染細胞からの RNA 抽出および逆転写反応までをフランス、リヨンにある INSERM の P4 施設内で行ない、その後のニパウイルス遺伝子全長をコードするプラスミドおよびサポータープラスミドの作製を日本で行なった。これらを持って再びフランスへ渡り、感染性ウイルスの作製を行なった。当時、minigenome 系を用いたニパウイルスゲノムの複製効率について調べた報告があったので⁸⁾、その中で用いられていた各プラスミドの比を参考に、様々な条件を試し、最終的には感染性ウイルスを得ることに成功した⁹⁾。これはヘニパウイルスでのリバースジェネティクス系の初めての開発となった。この系を用いて、まず EGFP 発現組換えウイルスを作出した。これはレセプターの同定研究にも有用と考えたが、調度その頃、レセプターは Ephrin B2 であることが報告された¹⁰⁾。そこで、ニパウイルスが動物種の壁を越えて伝播した機構を解明するために、まずこの EGFP 発現組換えニパウイルスを、ヒト、マウス、ラット、ハムスター由来等の細胞株に感染させ、Ephrin B2 の発現とウイルス増殖性の

関連を解析した。その結果、P815 および 208f 細胞においては、Ephrin B2 が発現しているにも関わらず、ウイルスの増殖が認められなかった (Fig.3)。動物種による Ephrin B2 の遺伝子配列の相違がウイルスとの結合性に影響する可能性があるため、これら細胞にヒト Ephrin B2 を人為的に発現させた細胞を作製して感染実験を行ったが、やはりウイルス増殖は認められなかった。この結果から、ニパウイルスの増殖を規定するのは、レセプターの有無のみではなく他に関与する重要な因子があることを示唆した。

3. アクセサリー蛋白の病原性への関与

ニパウイルスは致死率の高い病原体であるが、その激しい病原性を誘発する機序は不明である。多くのパラミクソウイルスで、アクセサリー蛋白が IFN 応答カスケードを抑制することが報告されており、それによってアクセサリー蛋白がウイルスの病原性を誘発することに関与すると推測されている。ニパウイルスには3種のアクセサリー蛋白 (V, W, C) が存在する。この3種類および P 蛋白が同様に IFN 応答カスケードを抑制する機能を持つということが、それぞれを単独に transfection して強制発現させる実験系によって示されていた。そこで、ウイルス感染細胞中でもこの抑制機能を発揮するのかを検証するため、アクセサリー蛋白を1つずつ欠損させた組換えニパウイルスを作出した。親株とこれら欠損ウイルスを 293 細胞に感染させ、IFN 応答性をレポーターアッセイで調べた。非感染 293 細胞を IFN α で刺激すると IFN 応答能を示すルシフェラーゼの活性が上昇するが、親株のニパウイルスを感染させた細胞ではこの応答が顕著に抑制された。これは IFN

Geographical range of fruit bats, and henipavirus detections

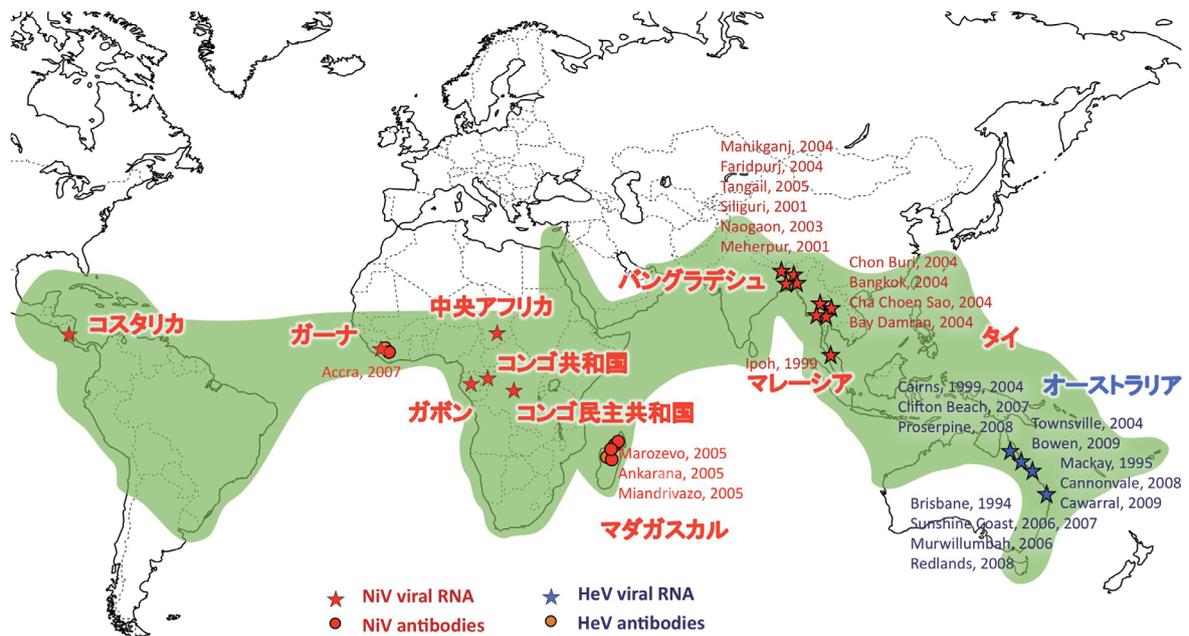


Fig.1

応答系抑制機能をもつ P, V, W, C の 4 種の蛋白のいずれか、または全てが感染細胞中の IFN 応答系に作用して強く抑制したと考えられる。そこで、アクセサリ蛋白のいずれが感染細胞中での抑制作用に重要な働きを担っているのかを調べるために、1 つずつを欠損させたウイルスを感染させた細胞で、同様に刺激を与えた。すると、どのアクセサリ蛋白欠損ウイルスでも同様の強い IFN 応答抑制作用が認められた。すなわち、アクセサリ蛋白のある 1 つだけが強い作用を示すのではなく、1 つだけ欠損しても IFN 応答系の抑制作用には影響はないことが明らかになった。この結果から、もしアクセサリ蛋白の IFN 応答抑制能がニパウイルスの病原性発現を誘導する主要因なのであれば、アクセサリ蛋白 1 つずつの欠損ウイルスの病原性は親株と同等になると推測される。そこで、この仮説を確認するため、個体の病原性を解析する優れたモデル系であるハムスターを用いた動物実験によってこれを検証した。親株のニパウイルスをハムスターに接種すると、ウイルスの接種量依存的にハムスターの死亡率を増加させた。W タンパク欠損ウイルスを接種した場合も、予想どおり親株を接種したときと同様にハムスターを死亡させた。しかし、V または C 蛋白を欠損させたウイルスを接種した場合、驚いたことに全てのハムスターが症状を何も示さずに生存し、これら 2 つのウイルスの病原性が著しく低下したこと

が示された。この結果から、V, C 蛋白がニパウイルスの病原性発現に極めて重要な役割を担っていることが明らかになった¹¹⁾。しかもこの病原性発現への関与機序は、これまで唆されていた IFN 応答系抑制によるものではないと考えられた。現在この 2 つの蛋白の担う未知の機能を解明する研究を進めている。

4. ニパウイルスに対するワクチンの開発

ニパウイルスは致死率の高い重篤な病気を発症させることから、その対策研究は必須と考えるが、未だに実用化された有効な防御法および治療法はない。ワクチンの開発研究については、これまでに主に G, F タンパクを目的抗原としたサブユニットワクチンや DNA ワクチン、また他のウイルスベクターを用いた組換えウイルスワクチンが報告されている^{12, 13, 14, 15, 16, 17, 18)}。我々が作製した病原性のない組換えニパウイルスも弱毒化ワクチン開発の候補になると考えられるが、BSL4 のウイルスを組換えによって弱毒化したウイルスであるので、社会的に受け入れられるためのハードルは高いと予想される。組換えウイルスワクチンとしては、ワクチニアウイルス、カナリア痘ウイルスをウイルスベクターとして用いたものが報告されている。我々は、これまでに麻疹ウイルスを初めとするモービルウイルスを研究対象としてその利点も熟知している事から、新た

ニパウイルスの構造

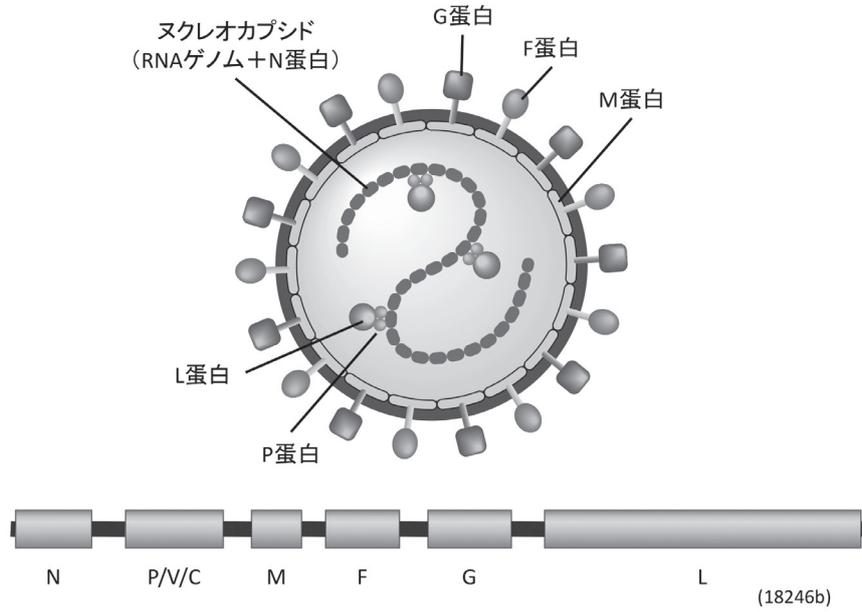
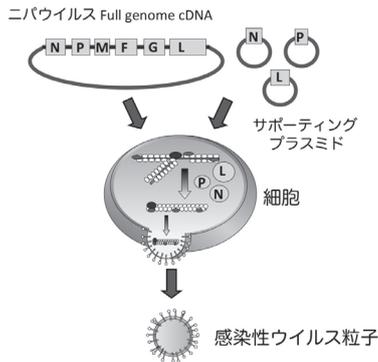


Fig.2

ニパウイルスのリバースジェネティクス系の樹立



ニパウイルスの増殖性とレセプター発現

細胞株	Ephrin B2	ウイルス増殖性
BHK 21	+	+
293T	+	+
HeLa	+	+
CHO	—	—
* P815	+	—
* 208f	+	—
L2	+	+
RM4	+	+

Fig.3

に麻疹ウイルスをベクターとしたニパウイルスに対する二価ワクチンの開発を試みた。麻疹ウイルスワクチンは世界的に広く用いられており安全性、安定性が高いことが実証されており、細胞性免疫を強く誘導する。その免疫持続期間は終生免疫と言われるほど長い。また、相同性組換えを起こすこともない。その上で、リバースジェネティクス系が確立されており、比較的容易に組換えウイルスを作ることが可能であるなど、多くの優れた特徴を持つ。

我々はワクチン株である麻疹ウイルス Edmonston 株と、野外株である麻疹ウイルス HL 株のそれぞれのリバースジェネティクス系を用いて、ニパウイルス膜蛋白 G

を発現する組換え麻疹ウイルスを2種類作出した。これらの組換え麻疹ウイルスの in vitro での増殖性は親株と遜色なかった。そこで、その免疫効果をハムスターの動物実験系を用いて検証した。ハムスターに 2×10^4 TCID₅₀ の組換え麻疹ウイルスを腹腔内投与し、3週間後に2回目の免疫として等量を投与した。2回目の免疫から1週間後のハムスター血清中のELISAによる抗ニパG抗体価は1600倍まで上昇していた。これらのハムスターに、 10^3 TCID₅₀ のニパウイルスを接種する攻撃試験を行ったところ、非免疫群のハムスターが攻撃後8日で90%死亡したのに対し、ニパG発現麻疹ウイルスで免疫した群では、全く症状を

ニパウイルスG蛋白発現組換え麻疹ウイルスの防御能

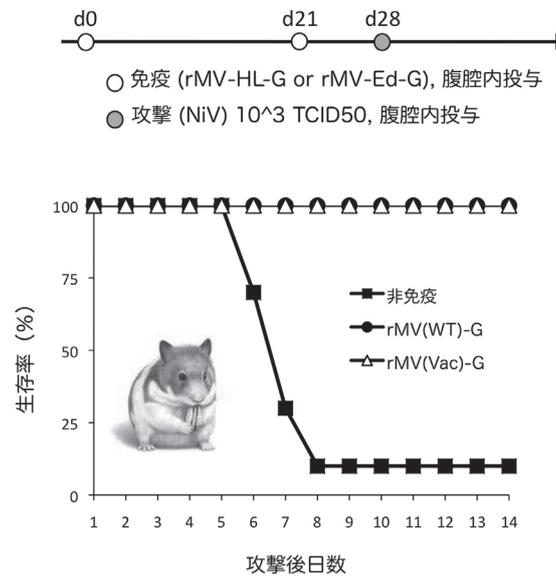


Fig.4

示さず全て生存した (Fig.4)¹⁹⁾. この結果から, 作出した組換え麻疹ウイルスがハムスターに対し完全な防御能を付与できたと考えられた. そこで, さらにヒトに近い霊長類での検証を行なった. 当時はまだニパウイルスの霊長類感染モデル系の報告がなかったためサルの感染モデル系の確立から始め, 最終的にアフリカミドリザルを用いることによって成功した. アフリカミドリザルへは, ほぼ最大可能量であった 10^8 TCID₅₀ と, 10^6 TCID₅₀ の2段階で腹腔内と経鼻および経口投与を行なった. 腹腔内投与の場合は, ウイルス接種量に関わらず2頭中2頭とも接種後2日目から体重減少が認められ, 5日目位からは顕著な臨床症状を呈し7日目に死亡した. それに対して経鼻, 経口投与したサルでは, 腹腔内投与の場合より少し遅れて症状を示し, 接種後2週間で最も重篤になり瀕死になった. しかし瀕死期を脱した後回復が見られ24日目まで生存した. 臓器の病理組織像をみると, 肺における肺胞内への血漿成分貯留や浮腫, 鬱血, また脳, 脾臓などの出血, 壊死, 炎症像, 巨細胞形成など, ヒトでのニパウイルス感染症の場合とよく似た所見が得られた. これらの結果から, アフリカミドリザルはニパウイルス感染モデル系として有用と考えられた. そこで, G発現組換え麻疹ウイルスのニパウイルスに対する防御効果をアフリカミドリザルでの検証を行った. その結果, 非免疫群のサルは, 激しい発熱や体重減少などを示し瀕死となったが, 組換え麻疹ウイルスで免疫したサルでは, 全く症状を示さず健常に経過した¹⁹⁾. しかし, ヒトでは既に麻疹ワクチンを接種している場合が多いと想

定され, 今回作出した組換えウイルスを接種しても排除されてしまう可能性がある. そこで, カニクイザルに麻疹ウイルスワクチン株を接種し, 抗麻疹抗体の上昇が認められた後 (ワクチン接種から12週後) に我々が作出したG発現組換え麻疹ウイルスを接種しG蛋白に対する抗体価を調べたところ, 抗体価の明らかな上昇を認めた. このことから, 既に麻疹ワクチンを受けている人においても, 有効性を発揮することが示唆された. 以上の結果より, 作出したニパウイルスG蛋白発現麻疹ウイルスは極めて有望なワクチン候補になると考えらる.

おわりに

ニパウイルス感染症については, 基礎的にも未解明の課題が多く残されており, またその致死率の高さやウイルスやウイルス保有動物の広い分布から予防法・治療法の開発研究も急務と考えられる. また, 今回記載した実験の感染性ウイルスを扱う部分は全て海外のBSL4施設で行った. ニパウイルスはBSL4に分類されているため, 残念ながら現状では国内で全ての実験を遂行する事ができない. 我が国や近隣諸国で発生するBSL4ウイルス感染症に対して貢献するためには日本でもBSL4施設を使用できるよう整備することは重要と考える.

参考文献

- 1) Chua, K.B., Goh, K. J., Wong, K. T., Kamarulzaman, A., Tan, P.S., Ksiazek, T. G., Zaki, S. R., Paul, G., Lam, S. K. and Tan, C. T. (1999). Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 354; 1257-1259.
- 2) Enserink M. (2004). Emerging infectious diseases. Nipah virus (or a cousin) strikes again. *Science* 303 (5661):1121.
- 3) Yob J.M., Field H, Rashdi A.M., Morrissy C., van der Heide B., Rota P, bin Adzhar A., White J., Daniels P, Jamaluddin A., and Ksiazek. T. (2001). Nipah virus infection in bats (order chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis.* 7(3);439-441.
- 4) Field H., Young P, Yob J.M., Mills J., Hall L. and Mackenzie J. (2001). The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.* 3(4); 307-14.
- 5) Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Cottontail VM, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Knörnschild M, Oppong S, Adu Sarkodie Y, Pongombo C, Lukashyev AN, Schmidt-Chanasit J, Stöcker A, Carneiro AJ, Erbar S, Maisner A, Fronhoffs F, Buettner R, Kalko EK, Kruppa T, Franke CR, Kallies R, Yandoko ER, Herrler G, Reusken C, Hassanin A, Krüger DH, Matthee S, Ulrich RG, Leroy EM, Drosten C. (2012). Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun.* 3:796.
- 6) Hayman DT, Suu-Ire R, Breed AC, McEachern JA, Wang L, Wood JL, Cunningham AA. (2008). Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS One* 3(7):e2739.
- 7) Fields Virology 6th edition pp1070-1085.
- 8) Halpin K., Bankamp B., Harcourt B.H., Bellini, W.J. and Rota P. (2004). Nipah virus conforms to the rule of six in aminogenome replication assay. *J Gen Virol.* 85(Pt3);701-7.
- 9) Yoneda M., Guillaume V, Ikeda F, Sakuma Y., Sato H., Wild T.F. and Kai C. (2006). Establishment of a Nipah virus rescue system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16508-16513.
- 10) Negrete O.A., Levroney E.L., Aguilar H.C., Bertolotti-Ciarlet A., Nazarian R., Tajyar S. and Lee B. (2005). EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus. And emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436(7049); 401-5.
- 11) Yoneda M., Guillaume V, Sato H., Fujita K., Georges-Courbot M.C., Ikeda F, Omi M., Muto-Terao Y., Wild T.F. and Kai C. (2010). The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. *PLoS One* 5(9):e12709.
- 12) Guillaume V., Contamin H., Loth P., Geroges0Courbot M.C., Lefurbre A., Marianneau P, Chua K.B., Lam S. K., Buckland R., Deubel V. and Wild T.F. (2004). Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *J. Virol.* 78;834-40.
- 13) Mungall B.A., Middleton D., Crameri G., Bingham J., Halpin K., Russell G. Green D., McEachern J., Pritchard L.I., Eaton B.T., Wang L.F., Bossart K.N. and Broder C.C. (2006). Feline model of acute Nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J. Virol.* 80;12293-302.
- 14) Wang X., Ge J., Hu S., Wang Q., Wen Z., Chen H. and Bu Z.(2006). Efficacy of DNA immunization with F and G protein genes of Nipah virus. *Ann NY Acad Sci* 1081; 243-45.
- 15) Weingartl H.M., Berhane Y., Caswell J.L., Loosmore S., Audonnet J-C., Roth J.A. and Czub M. (2006). Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *J Virol*, 80; 7929-38.
- 16) McEachern J.A., Bingham J., Crameri G., Green D.J., Hancock T.J., Middleton D. Fen Y.R., Border C.C., Wang L.F. and Bossart K.N. (2008). A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats. *Vaccine*, 26; 3842-52.
- 17) Ploquin A., Szécsi J., Mathieu C., Guillaume V, Barateau V, Ong K.C., Wong K.T., Cosset F.L. and Horvat B. (2013). Protection against henipavirus infection by use of recombinant adeno-associated virus-vector vaccines. *J Infect Dis.* 207; 469-78.
- 18) Lo M.K., Bird B.H., Chattopadhyay A., Drew C.P., Martin B.E., Coleman J.D., Rose J.K., Nichol S.T. and Spiropoulou C.F. (2013). Single-dose replication-defective VSV-based Nipah virus vaccines provide protection from lethal challenge in Syrian hamsters. *Antiviral Res.* 101; 26-29.
- 19) Yoneda M., Georges-Courbot M.C., Ikeda F, Ishii M., Nagata N., Jacquot F, Raoul H., Sato H. and Kai C. (2013). Recombinant measles virus vaccine expressing the Nipah virus glycoprotein protects against lethal Nipah virus challenge. *PLoS One*, 8; e58414.

Study of pathogenicity of Nipah virus and its'vaccine development.

Misako YONEDA

Laboratory Animal Research Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Nipah virus (NiV), a paramyxovirus, was first discovered in Malaysia in 1998 in an outbreak of infection in pigs and humans, and incurred a high fatality rate in humans. We established a system that enabled the rescue of replicating NiVs from a cloned DNA. Using the system, we analyzed the functions of accessory proteins in infected cells and the implications in *in vivo* pathogenicity. Further, we have developed a recombinant measles virus (rMV) vaccine expressing NiV envelope glycoproteins, which appeared to be an appropriate to NiV vaccine candidate for use in humans.

