

センダイウイルス工学の展開：基礎研究からバイオベンチャーへ

Development of Sendai Virus Technology: From Basic Science to Bio-Venture

永 井 美 之

NAGAI Yoshiyuki

要 旨

新生児肺炎の原因ウイルスとして分離されたセンダイウイルス [Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)] についての特性と構造を解説し、その知見をもとにして筆者らが展開したウイルス工学の現状、今後の展望、さらには、感染症研究の国際連携の現状を解説した。センダイウイルスにまつわる「日本発の知と技」の筆者らによる育成の歴史でもある。

プロローグ

私が一昨年に書きました本「センダイウイルス物語：日本発の知と技」（図1）について、いくつかの新聞に書評が出ました。例えば、読売新聞は「最近、大学や研究所で蔓延しつつある妙な効率優先主義は、このような地道な研究を許容しに

くい雰囲気になりつつある。内容が古臭くても、あるいはもう研究し尽くされているように見えても、決して切り捨ててはいけない。知の蓄積と継続こそが次世代への土壌となり、そこからどんな思いがけない発展があるか、誰にも予想がつかないからである。もし、数十年前に古い学問として、このセンダイウイルス学の研究が切り捨てられていたとしたら、副題にある“日本発の知と技”も育つことはなかっただろう」と書いています。今日、私がお話ししたいことはほぼこのことです。まず、皆様にウイルスがどんなものかというイメージをもていただければ幸いです。

I センダイウイルスとは

1) 由来およびファミリー

センダイウイルスは、日本の医学、微生物学の拠点の1つであります東北大学の黒屋先生と石田先生らによって、新生児肺炎の原因ウイルスとして分類されました。1953年、もう半世紀以上前のことです。患者の肺乳剤をマウスの鼻に接種しますと、マウスは肺炎になり、この肺をすりつぶしてニワトリ受精卵に入れますと、赤血球凝集活性をもつウイルスが採れます。名古屋大学はじめ、



図1 「センダイウイルス物語：日本発の知と技」

他の大学や研究所でも同じウイルスが採れました。ところが、患者サンプルではなく、生理的食塩水をマウスの鼻に接種することでも肺炎が起き、ウイルスが採れました。どうやら、このウイルスは使用した実験マウスに既に潜在しており、食塩水を垂らすという刺激で活性化されたようです。そこで、1955年、日本ウイルス学会は、このウイルスを新生児の肺炎の原因ウイルスとするには至らず、Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) という名前をつけました。しかし、これは、ウイルスの名前としてはもったいぶった大げさな名前であり、世界的にはポピュラーになりませんでした。例えば、エイズウイルスとかエボラウイルスとかインフルエンザウイルスとかのように、分離された土地や病気の名前がつけばいいわけです。石田先生たちはこの肺炎を“センドイ型”と名づけました。これがうまくはまり、センドイウイルスというのが世界での正式名にまでになりました。私が研究対象としてきましたのは、マウスのセンドイウイルスとニワトリのニューカッスル病ウイルス (NDV) という病原体です。NDVは農学関係では非常に有名なウイルスです。これらは、1本 (モノ) のマイナス鎖 (ネガ) RNAをゲノムにもつエンベロープウイルスで、モノネガウイルス目というスーパーファミリーの中のパラミクソウイルス科に属します。パラミクソウイルス科には、他に麻疹やムンプス (オタフクカゼ)、ジステンパー、パラインフルエンザ、ニパウイルスといったポピュラーなものがあり、モノネガウイルス目には、パラミクソウイルス以外のファミリーで、狂犬病ウイルスとかエボラウイルスという凶悪なウイルスも見られます。

少し脱線になりますが、ニパウイルスは、パラミクソウイルスの最も新しい仲間の1つで、マレーシアのニパという村でこのウイルスに感染したブタがけいれんを起こして死に、それからヒトにうつって脳炎が起り、最終的には265名が発症し、その半分ぐらいが死亡しました。なぜこんなことが起こったのでしょうか？ 実は、コウモリがこのウイルスをもっており、彼らはこのウイルスがいても平気ですが、その近くの山地に進出してきた農場のブタに感染したわけです。すなわち、人間の経済活動拡大により、それまで接触していなかった野生動物との接触により出現した新興感染症の1つの典型であります。

2) 構造と“ライフ”サイクル

センドイウイルスやNDVの外側はエンベロープ (Envelope、被膜) と呼び脂質二重層に2種類のとげ状のタンパク質 (F、HN) が埋まっています。エンベロープの内側はM (マトリックス) タンパク質で裏打ちされています (図2左)。内部のコアは、図2の右側にあるように、ウイルスRNAとN、L、Pタンパク質が複合体 (リボヌクレオプロテイン、RNP) を形成しています。有名なタバコモザイクウイルスを結晶化したW. M. スタンレーが言ったように、ウイルスは結局“化学物質の粒”であります。

ウイルスは、細胞に入ってはじめて“生”を得ることができます。センドイウイルスやNDVの場合は、図3のように、HNタンパク質を使って、細胞表面糖鎖のシアル酸に結合し、その後Fタンパク質を使って膜融合を起こし、細胞の中へ入ります。そこで、自らのゲノム情報に基づき転写と

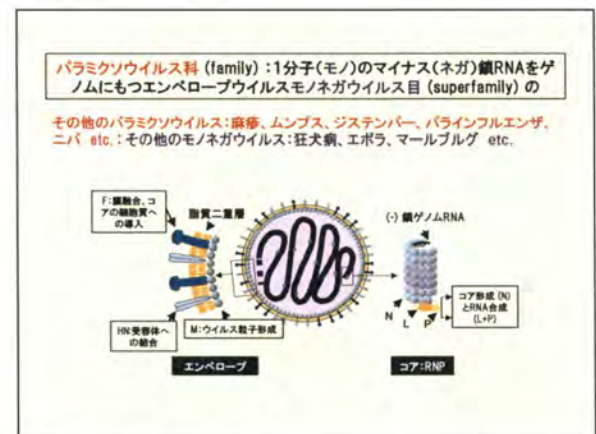


図2 パラミクソウイルスの構造と構成タンパク質の機能

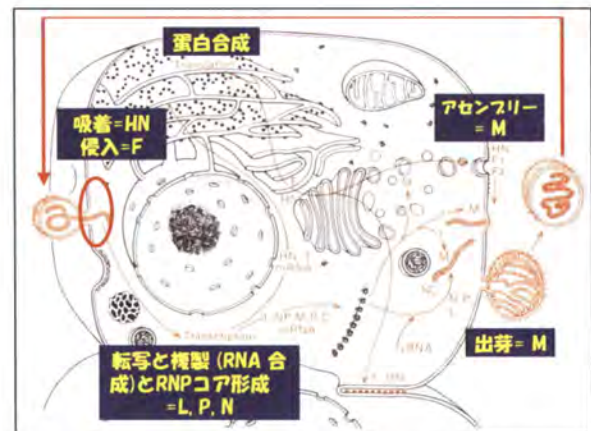


図3 パラミクソウイルスのライフサイクル

複製によってメッセンジャー（m）RNAとゲノムRNAを合成し、さらにその情報に基づいて自己のタンパク質を合成し、最後にはMタンパク質を用いて、ウイルス構成因子（タンパク質とRNP）を細胞膜に集め（アセンブリー）、細胞膜からあたかも芽を出すように子供のウイルスが誕生します。以上がウイルスのライフサイクルです。子ウイルスはさらに次の細胞に感染し、同じ過程を繰り返します。強調すべきことは、後述のテクノロジーにも関係しますが、このウイルスはそのライフサイクルにおいて宿主の細胞核とは一切相互作用をもたないことです。したがって、このウイルスは、人工的に核を取り除いた細胞でも、完全にライフサイクルを全うできます。いずれにせよ、ウイルスは化学物質の粒であり、細胞に入っ

てはじめて生を得るという特徴をもっています。これはセンダイウイルスが細胞融合を起こすという事実のはじめての記述です。さらに、岡田先生は、この腹水癌細胞を使い、センダイウイルスによる細胞の融合は紫外線（UV）で不活化したウイルスでも起こることという非常に大きな発見をされ、融合というのは、ウイルスが細胞に入って、連鎖と続くライフサイクルとは無関係に、ごく初期のステージで起る現象であることを明らかにされました。

しかし、ウイルス研究では、細胞の中でウイルスがどうやって複製していくかがメインになりますから、岡田先生は、阪大微生物病研究所の同僚から、一体細胞融合の研究にどういう意味があるのかと言われたそうです。そんなある日、ショッキングな論文が英国から出ました。その内容は、岡田先生のUV不活化センダイウイルスが細胞融合を行うという事実をもとにして、ヒトのHeLa細胞とニワトリの赤血球を融合させたものでした。この実験のミソは、ニワトリの赤血球には核が残骸として不活化された形で残っていることで、融合によってHeLa細胞からニワトリの残骸核の活性化の指令が出て、ニワトリに特異的なタンパク質が合成されたのです。これは1965年に行われた非常に革新的な仕事であり、“種が異なっても、核はお互いに話し合いができる”ということを立証したものです。

この仕事にショックを受けた岡田先生は、盛り返すためにいろいろな実験を行いました。そのうちの1つの有名な実験を紹介します（図5）。普通のヒト赤血球には核はありませんが、センダイ

II 日本における研究史

1) センダイウイルス膜融合能の発見

センダイウイルス研究の長い歴史の中で、最初の大きな仕事として、文化勲章の受章者でもある大阪大学の岡田善雄先生のセンダイウイルスの細胞融合能の発見があります。岡田先生はこの発見でセンダイウイルスを学問の表舞台に引っ張り出したのです。

エールリッヒ腹水癌細胞は、マウスのおなかに入ると、活発に殖えます。岡田先生はセンダイウイルスを使ってこの癌細胞を殺し、マウスの癌を治療しようと考えました。ところが、ウイルスをうっても癌細胞は死なず、今まで見たことのない巨大な細胞と化してしまいました（図4）。こ

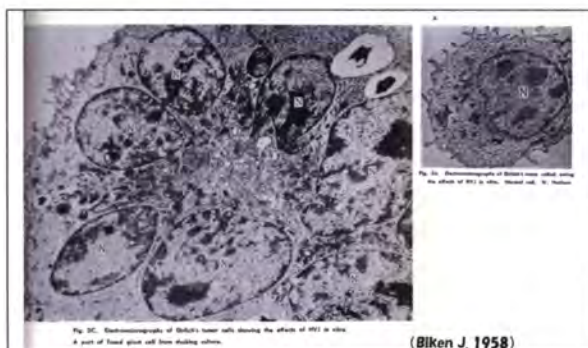


図4 (左)センダイウイルスによる腹水癌細胞の融合
(右)ウイルス非接種対照細胞

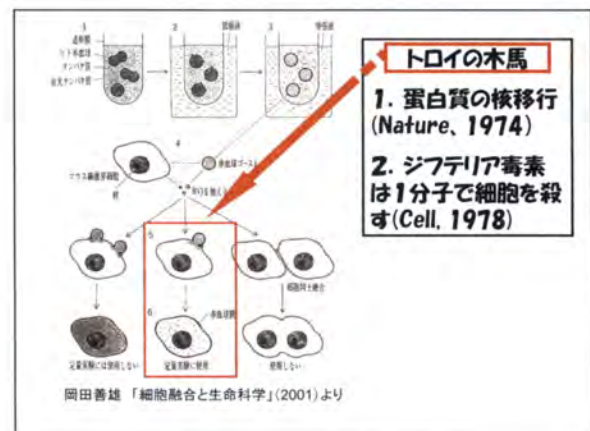


図5 タンパク質を封入した赤血球ゴーストをセンダイウイルスで細胞に融合させ封入タンパク質を細胞内に導入

ウイルスの存在下で、それを低調緩衝液につけ、同時に赤血球に取り込ませたいタンパク質を入れました。すると、低調液で赤血球はいったん破裂しますが、等張液に戻すと、膜再構築によって回復した赤血球に加えておいたタンパク質が封入されます。このような、任意の物質を封入した赤血球とマウス線維芽細胞をセンダイウイルスと融合させると、封入物質はマウス細胞に入って働き出します。“センダイウイルスを使って細胞の中にモノを入れる”ことができることを実証したことになります。それによって、先生は“タンパク質の核移行”や“ジフテリア毒素は1分子で細胞を殺す”ということを次々と示し、センダイウイルスの融合活性を使い細胞工学という分野を立ち上げるという素晴らしい業績をあげられました。そのシステムは「トロイの木馬」として世界的に注目を集めました。木馬はもちろん赤血球、中に入っているタンパク質が兵士です。

この細胞融合を用いた最高の研究の1つは、マウスのミエローマ細胞（これは永久に殖え続ける細胞）と特定の抗原で免疫したマウスのリンパ球をセンダイウイルスで融合し、永久的に増殖する抗体産生細胞株が作製できるというものです。これがモノクローナル抗体作製技術の基盤となりました。この業績によりケーラー（G. Koehler）とミルスタイン（C. Milstein）が1984年にノーベル医学生理学賞を受賞したことは有名です。

2) 宿主依存性修飾のからくりを解く

センダイウイルスには“宿主依存性修飾”という現象があり、これは非常に神秘的な現象で、ウイルス研究者の誰もが惹かれたものでした。そのからくりはハプニングによって解き明かされ、ウイルス感染の普遍的原理を提供することになりました。それは、もう退官されたのですが、東北大学、山形大学を経て神戸大学に移られた本間守男先生の仕事です。卵の尿膜腔にセンダイウイルスを接種すると、ウイルスは尿膜中で殖え、尿液に大量に蓄積します（図6）。このウイルスの培養L細胞に対する感染能は100%プラスですが、興味深いことに、細胞外に出てきた新しいウイルスにはL細胞への感染力はありません。ところが、このウイルスをもう1度、尿膜腔に接種すると、L細胞への感染能はプラスとなり、また、L細胞に通せばマイナスになります。このように、ウイ

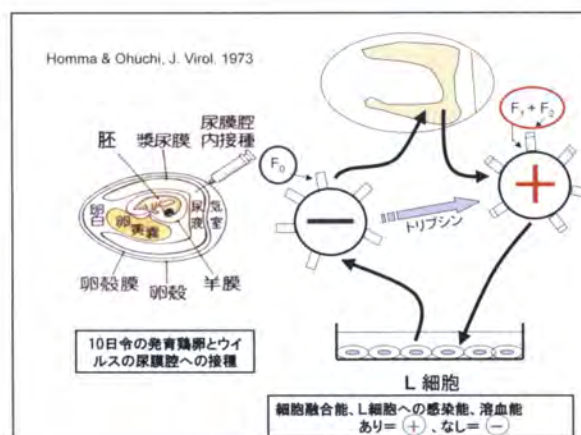


図6 センダイウイルスの宿主依存性修飾と膜融合タンパク質非活性前駆体 F_0 のトリプシンによる F_1 と F_2 への切断による活性化
細胞融合能、L細胞への感染能、溶血能：あり＝＋、なし＝－

ルスの性質が1代で完全に変わってしまうのは遺伝現象ではなく、宿主による修飾であるとししか解釈できません。このからくりは、不思議に思いながらも、なかなか解けませんでした。

タンパク質分解酵素トリプシンは、増殖してシャーレに張りついている細胞をはがすときに使うのですが、はがしたL細胞を新しいL細胞層の上にばらまくと、ばらまいた細胞が周りの新しい細胞と融合しました。そこでL細胞で増殖したウイルスそのものをトリプシンで処理したらどうなるのかということで試したところ、あまりきれいな結果は得られませんでした。ところがある日、実験助手が間違えて、トリプシンを100倍に薄めて使ったのです。そうするとウイルスのL細胞への感染能は見事に息を吹き返す結果となりました。細胞融合も溶血能活性も、すべてトリプシン処理で息を吹き返すこととなり、それらの能力は共通の分子基盤で成り立っているという理解にたどりついたのです。トリプシンはタンパク質をズタズタに切断するので、通常濃度ではこの活性化を再現性よく観察できなかったのです。

では、以上のようなトリプシンによるウイルスの能力回復の背後には何が起っていたのでしょうか？ 本間先生たちはこの謎を解くことができました。L細胞で殖えた感染性や融合活性をもたないウイルスのとげの1つは F_0 というタンパク質で、これを低濃度のトリプシンで処理すると、融合活性をもつ F_1 と F_2 に限定切断されます。この切

断が起ってはいじめてウイルスエンベロープは細胞膜と融合し感染能を回復するということが判明しました。このタンパク質分解による限定切断のプロセスが、実は卵の中ではオートマティックに行われていたことが明らかとなり、宿主依存性修飾のからくりが解けたのです。

3) NDV病原性のプロテアーゼ依存性

私達はセンダイウイルスの近い親戚にあたるニワトリのNDVを使って仕事をしてきました。私は1965年に名古屋大学を卒業し、松本利貞先生の研究室に入り、その後ドイツ、ギーセン大学のウイルス研究所に留学し、そこで一連の研究をしました。その間を振り返ってみますと、先に紹介したように、岡田先生のセンダイウイルスによる細胞融合活性の発見あり、本間先生による非活性型タンパク質 F_0 の F_1 と F_2 への切断による感染性や膜融合の活性化の発見がありました。

私はNDVを使って、組織培養細胞においても実はFタンパク質の切断活性化は細胞内ゴルジ装置のプロテアーゼで自然に行われ、トリプシン処理は不要であるということに気がきました。考えてみれば、用いたNDV株は強毒株であり、全身の臓器に感染拡大し、致死性です。弱毒株は気道や腸管などごく一部臓器にのみ感染し、致死性ではありません。例えば、ニワトリの卵の尿膜腔に、センダイウイルスの場合と同じように（図6）、NDV株を接種すると、強毒株は全身に感染し、50時間ぐらいで発育卵を殺してしまいます。しかし、弱毒株では非接種と変わりません（図7）。そこで、一連の強毒株と弱毒株の組織培養細胞で

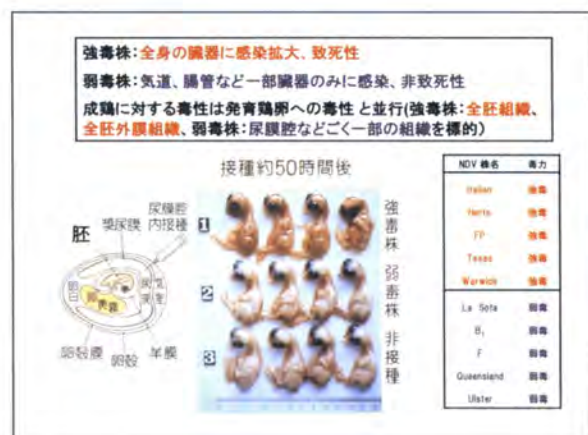


図7 ニューカッスル病ウイルス (NDV) の強毒株と弱毒株の性状比較

F_0 から F_1 、 F_2 への切断がどうなるかを調べました。その結果、強毒株ではFタンパク質の切断プロセッシングによる活性化はすべての細胞系で起き、次から次へと新しい細胞に感染し、自動的に多段増殖することが可能であるとわかりました（図8）。一方、弱毒株では、活性化はウイルスをルーチンに殖やす尿膜腔内でしか起こりません。また、他の細胞系ではトリプシン存在下ではじめて多段増殖が可能となり、トリプシンがないと増殖できません（図8）。こうして強毒株では全身感染が起こるが、弱毒株では全身感染は起きず、弱毒株が増殖しうるのはトリプシン様のものを分泌している特別な臓器だけだということが他の実験結果を含めて明らかになりました。

次に、強毒株と弱毒株のFタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を比べました。塩基配列が指定するアミノ酸配列から、強毒株の F_1 と F_2 の切断部位の前にはRRQRR（アルギニン-アルギニン-グルタミン-アルギニン-アルギニン）、RRQKR（アルギニン-アルギニン-グルタミン-リジン-アルギニン）などの塩基性のアミノ酸（太文字）がペアまたはマルチプルに存在していることがわかりました（図8）。一方、弱毒株の場合は、塩基性のアミノ酸が切断部位の手前に1個しかありません、すなわちモノベーシックでありました（図8）。したがって、Fタンパク質がすべての細胞で切れるか、あるいは一部の細胞・臓器でしか切れないということはアミノ酸配列の違いにより決定されていることがわかりました。

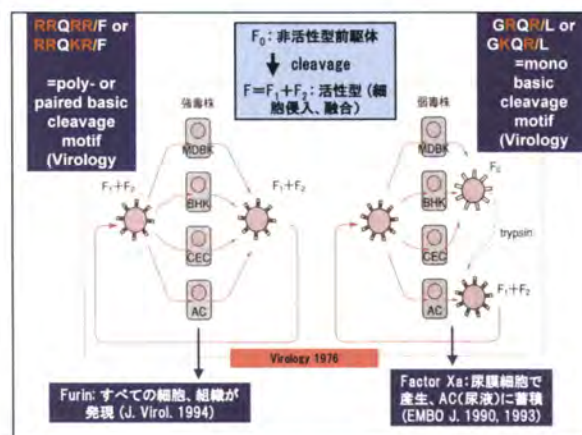


図8 NDV強毒株と弱毒株Fタンパク質の活性化パターン、活性化部位アミノ酸配列の違い、および切断にあずかる宿主プロテアーゼ

次の疑問は、強毒株と弱毒株という2つのカテゴリーのFタンパク質の切断と活性化に関わる酵素は何かということであります。その結論は、弱毒株F₀を卵の中で切断活性化していたものは尿膜細胞で産生される血液凝固第十因子（Factor Xa）でした（図8）。また、強毒株F₀の活性化に関わるすべての細胞、組織で発現しているプロテアーゼはフェーリン（furin）でありました（図8）。こうして、2つのカテゴリーのプロテアーゼを同定することができました。

名古屋で行いましたこの仕事で、私達は、尿液を何リッターも集め、血液凝固第十因子を精製しました。尿液からプロテアーゼを採ろうという実験は多くの人が試みていましたが、すぐ失活してしまうということで、全然採れませんでした。しかし、それは失活によるものではなく、遠心処理で夾雑物を除くときに、カルシウム塩が大量に沈殿して、この沈殿にくっついてこの酵素は落ちてしまい、結果的には捨ててしまっていたわけです。

現在では、いろんなウイルスで非活性型前駆タンパク質が切断によって活性型成熟（膜融合）タンパク質に変わることがわかり、活性化されたタンパク質の端には膜融合ドメインが現れ、これがターゲットの細胞膜に突き刺さることで融合が始まり、また、それがウイルス感染の始まりであるということがわかっています（図9）。このような一連の研究によってNDVで見出された原理、“切断部位がポリベーシックであれば全組織に感染拡大でき、通常強毒であるが、切断部位がモノベーシックならば一部の組織にしかいかないために弱毒あるいは無毒である”ということは、現在

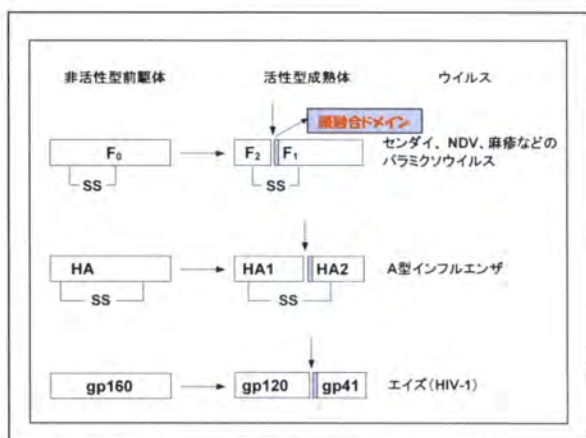


図9 各種ウイルスの膜融合タンパクの切断活性化

膜融合糖蛋白質の切断活性化部位	切断活性化酵素の発現	組織・臓器向性（トロピズム）	同一種株間の毒性の違い
Polybasic	全組織	全身性（全～多臓器向性）	強毒
Monobasic	気道、腸管など一部臓器	局所性（気道、腸管など）	弱毒～無症候

他の多くのパラミクソウイルス、インフルエンザウイルスにそのまま適用、エイズウイルスにも拡大される。

Nagai Y: Protease-dependent viral tropism and pathogenicity. Trends Microbiol. 1993.

図10 ウイルストロピズムと病原性のプロテアーゼ依存性（病原性のNDVパラダイム）

問題になっていますH5N1などの鳥インフルエンザウイルスにもほとんど機械的に適用されることがわかってきました（図10）。つまり、従来型のヒトの気道に局限感染するインフルエンザウイルス（H1、H2、H3）では、膜融合タンパク質（HA）の切断部位の前に1個のアルギニンがあるだけだから、感染は気道に局限され全身には広がらない、と説明されます。ただ、4,000万人もの死者を出したH1スペインカゼウイルスの場合には、その強い病原性は開裂部位のアミノ酸配列以外の構造が関係しており、ウイルスそのものが肺で強烈なサイトカインストームを起こすとか、当時抗生物質がなかったので、細菌の混合感染による肺炎の重症化であろう、と今は解釈されています。

高病原性鳥インフルエンザと低病原性鳥インフルエンザウイルスにおける臓器向性（トロピズム）と病原性は、例外なく、NDVと全く同じ原理で決まっているということで、NDVパラダイムそのものが適用できます。ところが、問題はヒトに感染しているH5型です。これは現在世界で300人以上感染して、その半分以上が死んでいます。このウイルスは、通常型のインフルエンザウイルスと違って、ヒトでは血液や髄液や便から分離され、ときとして脳炎や経胎盤母子感染を起こし、全身感染の兆候を示しています。それは、このHAタンパク質が切断されるところにKKKRのポリベーシックなモチーフがあることと関係しているのではないかと考えられています。こういうウイルスを卵で殖やし、それを殺してワクチンを作りますが、その際、ワクチン生産者への危険性が考えら

れますから、切断部位をモノベーシックに変えたウイルスをもとにして、ワクチン開発が今なされているところです。

4) ゲノム解読

さて、次はゲノム解読の話です。80年代はウイルスゲノム解読の時代ですが、今と全く違って、非常に原始的な方法で解読されておりました。東大の塩田達男（現在、阪大微研教授）先生、亡くなりましたが、渋谷博教授たちが一生懸命に努力され、はじめてパラミクソウイルスのゲノムをセンダイウイルスで確定しました（図11）。15,384塩基の左3'端から順番に6つの遺伝子があり、3'に結合したRNA合成酵素LとPは、各遺伝子の転写の開始シグナル（S）、終結シグナル（E）を認識して、スタートストップ、スタートストップを繰り返し、5'端に向かって順次mRNAができるということがわかってきました（図11左）。このmRNAから作られたタンパク質が蓄積し始めると、全長ゲノムが読まれ、複製が開始されます。まず、マイナス鎖((-)RNA)からプラス鎖(+)RNAができ、これをもとにしてまたマイナス鎖ができます。どちらのRNAも新生されながらNタンパク質に包装されていくので、図ではそれぞれ(-)RNP、(+)RNPとしてあります（図11右）。両鎖の3'末端の12塩基は1塩基違う（赤字）だけで、非常によく似ています。LとPという2つのタンパク質がマイナス鎖からプラス鎖、プラス鎖からマイナス鎖の両方を作ることが説明できるようになりました。こうして、ウイルスのゲノム像というのがだんだんでき上がりました。

しかし、謎めいた遺伝子が浮上してきました。

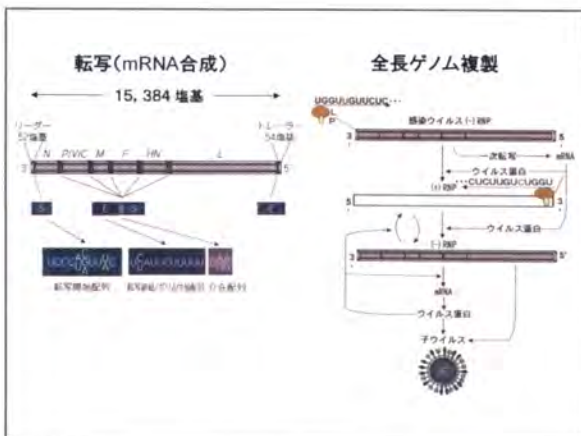


図11 パラミクソウイルスゲノムの転写と複製

それは、パラミクソウイルスのアクセサリー遺伝子と呼ばれるVとCです。これらはP遺伝子上にコードされています（図11左）。Pは昔からわかっているタンパク質で、一番右の長いLというタンパク質とともにRNA合成酵素を構成しています。VとC遺伝子はすべてのパラミクソウイルスにあるわけではありません。あるパラミクソウイルスではVとCではなく、別のアクセサリー遺伝子がコードされています。

Ⅲ センダイウイルス工学の立ち上げと展開

1) センダイウイルスリバーシジェネティクスの確立

ウイルスのアクセサリー遺伝子は、“これをノックアウト（削除）しても、感染・増殖能は完全には失われない遺伝子”であると定義されています。その機能は、削除ウイルスを作り、細胞レベルの増殖、宿主個体レベルでの病原性などを元の親のウイルスと比較をすることによってはじめて明らかになります。しかしながら、RNAゲノムを遺伝子操作することは、現在の技術ではできません。削除など、意のままのゲノム改変はDNA上でのみ可能です。そのため、センダイウイルスRNAをまず2本鎖DNAに変換し、このDNAから再びRNAウイルスとして回収する技術、すなわちリバーシジェネティクス（遺伝子操作系）を立ち上げることが必須の要請になったわけです。古典的手法で導かれた理論については、その裏を取る必要があります。例えば、NDVの強毒と弱毒の理論は、切断活性化部位を取り替えて毒性の変換が起ることを示さねばなりません。ですから、学術的な必要性からパラミクソウイルス遺伝子操作系の確立が待望され、業界では非常に激しい競争が起りました。

私はその時点で、名古屋から東大医科研の研究室に移り、先に触れましたように、センダイウイルスゲノムの全解読を行ったグループに属しましたので、これはメンツにかけて成功しなければならないということでした。幸い、先頭グループの1つとして、私達の成果は最優秀作品に仕上がりました。その仕事をしてくれたのが塩田さんとか、加藤さんとか坂井さん達であり、素晴らしいシステムができました。私達のシステムとは、センダイウイルスの15,384塩基をコードするRNAを、

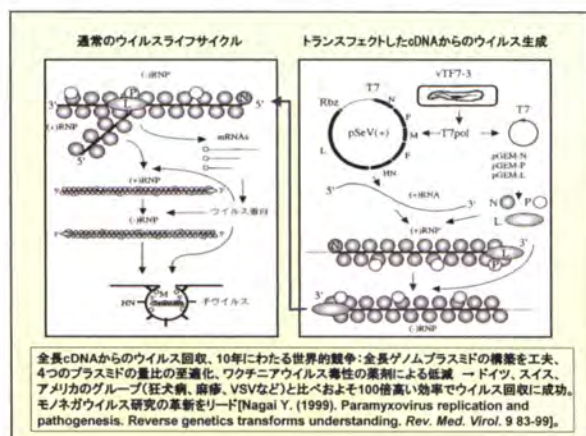


図12 cDNAプラスミドからのセンダイウイルスの生成

いったんDNAに変えてT7プロモータを配したプラスミドに挿入し、L、P、Nの3つのタンパク質をやはりT7依存性に発現するプラスミドとともに細胞にトランスフェクト（導入）し、これらをT7と呼ぶバクテリオファージのRNA合成酵素で駆動させるものです（図12）。T7RNA合成酵素はその遺伝子を組み込んだワクチニアウイルスから発現供給します。このようにして、プラスミドDNAから子供のウイルスができるわけです。このシステムは、そのころ別のパラミクソウイルスで成功した他のグループのものとは比べて、100倍高い効率でDNAからウイルスを回収することができ、私達はその後のウイルス研究の革新をリードすることができました。

2) アクセサリー遺伝子の研究

このシステムの活用という点で一番のターゲットはアクセサリー遺伝子で、これが本当に削除可能かどうかということです。

まず、かなり複雑なセンダイウイルスのVおよびC遺伝子の発現様式を説明します。どちらも、Pタンパク質とともに第2遺伝子にコードされています。V mRNAはP遺伝子の特定部位にあるRNA編集シグナル(UUUUCCCC)と想定される鋳型を、RNAポリメラーゼが誤ってコピーし、Gをひとつ余分に挿入したもの(+1G)です（図13）。

この転写随伴RNA編集による1塩基挿入によりORF (open reading frame) のシフトが起こります。P遺伝子の正確なコピー(+0G)がP mRNAです。したがって、Vタンパク質は、G挿

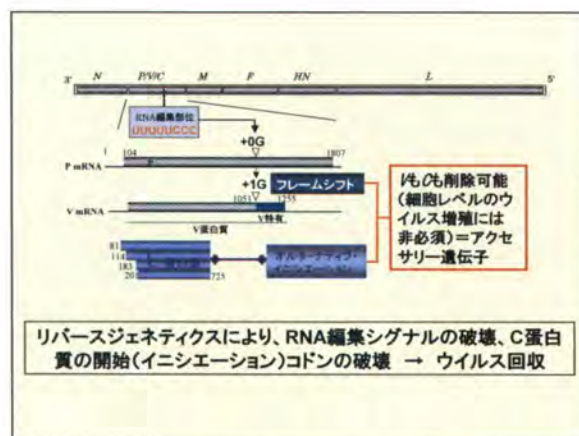


図13 センダイウイルスアクセサリー遺伝子VとCの発現様式とそれらの欠失ウイルスの回収

入以前のPタンパク質と全く同じアミノ酸配列のP/V共通領域とG挿入（フレームシフト）後のPタンパク質とは全く異なるV特有領域からなります（図13）。

Pタンパク質のORFには全く変化を与えることなくRNA編集シグナルを破壊し（2塩基置換）、実際に、Vタンパク質を全く生成しないV₍₋₎センダイウイルスが回収できました。このウイルスの力価、細胞レベルの増殖能は親ウイルスと全く遜色なかったので、V遺伝子は容易に削除可能な非必須アクセサリー遺伝子であることが確定しました。

Cタンパク質はPタンパク質のORFとは別のフレームを使って、P mRNA, V mRNAのどちらからでも、異なる開始コドンを使用（オルターナティブ・イニシエーション）して4種のタンパク質として生成されます（図13）。これらを総称してCタンパク質といいます。P/V ORFを完全に保存したまま、Cタンパク質の開始コドンの破壊などにより、これら4種のCタンパク質を全く発現しないウイルスも回収できました。したがって、C遺伝子も削除可能なアクセサリー遺伝子であることが確定しました。

センダイウイルスの感受性宿主であるマウスの肺内では、V₍₋₎ウイルスは感染後1日目までは親株と同様に活発に増殖しますが、その後は、親株が宿主のウイルス排除能に抗して高いレベルのウイルス量を維持し、すべてのマウスを肺炎で死亡させるのに対して、V₍₋₎ウイルスは急速に排除され、マウスは肺炎を起こすことなくすべて生残しました（図14右）。

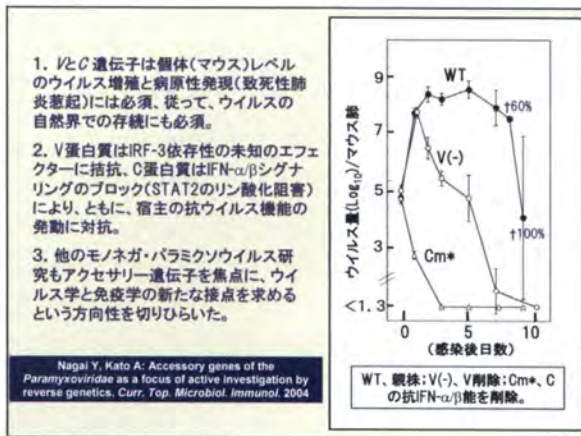


図14 アクセサリ-遺伝子VとCの個体レベルでの役割

C欠損ウイルスは細胞レベルでもRNA合成の調節やウイルス粒子形成に大きく貢献することがわかりました。さらに、ウイルス感染によって誘導されるインターフェロンによる抗ウイルス状態に対抗することがわかりました。そこで、RNA合成調節と粒子形成への貢献は親株と同じレベルに復帰させ、抗インターフェロン能力のみを欠くウイルスCm*というのも作ってみました。Cm*はマウスでは全く増殖できず、肺炎も惹起できません(図14右)。

図14左にはV(-)やCm*を使って得られた結論を列記しました。アクセサリ-遺伝子は、試験管内細胞レベルでは、確かに、非必須のアクセサリ-であるが、個体レベルでの増殖と病原性発現には必須で、アクセサリ-ではなく、主役を演ずることが明快に示されました。こうして、長年の謎であったアクセサリ-遺伝子の正体が、リバーシジェネティクスによりはじめて見えてきたのです。目下の最大の関心はVタンパク質が拮抗するIRF-3依存性のエフェクター(図14左第2項)は何かということです。

パラミクソウイルスの細胞レベルでのライフサイクル、侵入から成熟までのいろいろな仮説やドグマのリバーシジェネティクスによる検証も行い、多くの積年の課題に決着をつけることができました。

かくして、リバーシジェネティクスは、パラミクソウイルス研究を一新して新次元へと導いたのです。

3) 基礎科学からバイオベンチャーへ

上述のセンダイウイルスリバーシジェネティクスを活用して、センダイウイルスに何らかの遺伝子をつなげて発現させるという考えはどうだろうということで、研究を始めました。センダイウイルスを新規の発現ベクターにしよう、ということです。ディナベック(DNAVEC)社が、製薬7社および厚生労働省の医薬品機構などの産官連携により国家プロジェクトとして1995年に設立されました。彼らは私達のシステムに非常に興味をもっていましたから、センダイウイルスリバーシジェネティクスの技術移転を直ちに行い、彼らを支援しました。この国家プロジェクトの時代が2004年に終わり、今新しいフェーズに入っておりますが、その活動を基礎科学からバイオベンチャーへということで紹介いたします。

この計画は“かなりいける”と、最初から感じていました。というのは、センダイウイルスのゲノムにエイズウイルスのgp120というエンベロープタンパク質の遺伝子を組み込んで、組み換えセンダイウイルスとして回収して細胞にかけますと、gp120が大量に生産できることが既にわかっていたからです(図15)。哺乳類細胞でタンパク質を生産するいろんな動物ウイルスベクターがありますけれども、センダイウイルスベクターによるgp120の生産量は、群を抜いて高いものでした。細胞の培養液(sup)を精製しないで電気泳動しても主要バンドとして認められるほどです(図15)。

ロンドンのインペリアルカレッジ医学部では、気道、呼吸器に遺伝子を導入する研究を行っていましたが、いいシステムがないということで悩ん

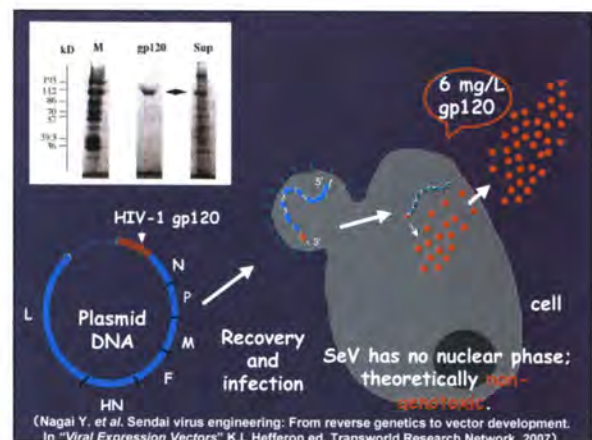


図15 センダイウイルスベクターによるエイズウイルスgp120の大量発現

でいました。センダイウイルスベクターを使ってみたいとの申し入れがあり、このウイルスにlacZというマーカー（目印）遺伝子を挿入したベクターを送りました。その結果、通常使われているアデノウイルスベクターを使うより数千倍のlacZの産物である β -ガラクトシダーゼの発現量が確保できるということがわかりました。これらの仕事は、“Send in a Sendai Vector”という新しいコンセプトを生み出したものとして注目を浴びるようになりました。

ここで、センダイウイルスを遺伝子治療やワクチンのベクターとして使うことの意味を考えてみましょう。センダイウイルスベクターには、既存のアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスのベクターにない新規性があります。その1つは、細胞質で増殖し、核との相互作用がなく、遺伝毒性は基本的にはないということです。遺伝毒性の有名な例としては、重症の免疫不全症をレトロウイルスで治すということが今世紀のはじめにフランスでありました。この場合、治療はうまくいきましたが、白血病が非常に高頻度で発生しました。また、最近有名になっております再生医療の中で、京都大学で開発された細胞をリセットするために、4種類の遺伝子をレトロウイルスで発現するシステムがあります。しかし、それは将来の安全性に問題があるという指摘がされております。2つ目は、センダイウイルスは非常に広範な細胞種に、しかも、分裂、非分裂細胞を問わず感染できることから、応用範囲が広いということです。3つ目は、思わぬ組み換えウイルス出現の恐れは理論的にはないことです。あるいは、今まで起こったことがないといった方がいいのかもしれません。4つ目には、カセット式に簡単に遺伝子挿入が可能であり、発現量は既存のウイルスベクターに比べて格段に高いということでもあります。そして5つ目には、ヒトへの病原性はないと考えられていることです。

DNAVEC社が行ったことは実用可能なセンダイウイルスベクターの創出でした。センダイウイルスはDNAからの合成系では、ワクチニアウイルスに組み込んだT7ポリメラーゼを使ってドライブしますが、これはアメリカのNIHから基礎研究に限り使っているということで分与してもらったものです。実用可能なベクターを開発するためには、ワクチニアウイルスフリーの系にしな

ければいけないということで、CAGプロモーターをもつプラスミドにして、細胞のDNA依存性RNAポリメラーゼIIでドライブする系を作りました。これでアメリカNIHとのしがらみはなくなったわけです。

次に試みたことは安全性の向上であります。ヒトへの病原性がないとはいえ、完全長のセンダイウイルスのゲノムに外来遺伝子を入れ、治療に用いるとすると、この組み換えウイルスは完全長でありますから、そのターゲットパーソンの体の中で殖え、伝播する可能性がありますし、また、ターゲットパーソンがウイルスを排出して周りの人に広まる可能性もありますから、安全性に問題があるということです。そこで、細胞から細胞へ、あるいはヒトからヒトへのトランスミッション（伝播）に必要な遺伝子を削る必要があると考えました。

ベクターの駆動に必要なN、P、Lの3つの遺伝子以外のエンベロープのタンパク質のすべてを欠失したウイルスも作ることに成功しました。このウイルス変異株の作り方を、Fタンパク質遺伝子を欠失した ΔF ウイルスで説明します。まず、GFP（緑色蛍光タンパク質）をコードする目印の遺伝子をF遺伝子を欠失させたプラスミドに挿入します。これを別のプラスミドでウイルスFタンパク質を発現する細胞にトランスフェクトし、ウイルスを回収します。できたベクターウイルスはこの借り物のFタンパク質をもっていますから新しい細胞に感染します。感染したことはGFPが発現されることでわかりますが、この新しい細胞から出てきたウイルスはもうF遺伝子を自分でもっていませんし、供給されるFタンパク質もありませんから、新しい細胞には感染しないことになります。F遺伝子を欠失したウイルスでも、ラットの脳質上皮細胞や錐体細胞などに非常に効率よくGFPを発現する能力を保持しています（図16）。

もう1つ応用例を紹介します。ウイルスのアセンブリーでは、ウイルスの部品を集めるのにも、また出芽にも、Mタンパク質が必要です。このタンパク質の遺伝子を欠損した ΔM ウイルスを使いますと、アセンブリーは起きませんから、スパイク糖タンパク質は細胞表面に蓄積します。そこで、これをトリプシンで処理すれば、隣の細胞と効率よく融合して巨大な多核細胞ができます。プロテアーゼ依存性の原理を応用して、腫瘍塊へのター

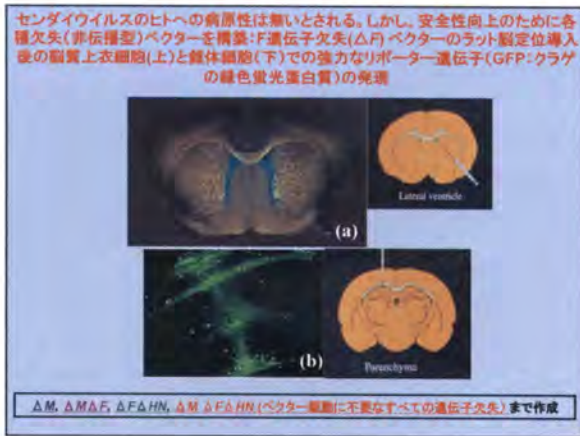


図16 センダイウイルスF遺伝子欠損ベクターによるリポーター（GFP）遺伝子の発現

ゲティングを試みました。センダイウイルスFタンパク質はモノベーシックな切断部位をもっていて、トリプシンで活性化されます。しかも、Mタンパク質が欠損していますから、細胞の表面には多量の糖タンパク質があり、トリプシン処理した培養細胞では大きな融合細胞ができますが、この融合細胞はやがて死にます。Fタンパク質のトリプシンで活性化される部位を、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）で活性化されるように変えてみました。MMPは腫瘍細胞が高発現するプロテアーゼとして知られています。このウイルス感染細胞をMMP2またはMMP9で処理をしますと、従来型のΔMウイルス感染細胞をトリプシンで処理したときと同じように、うまく融合が起こり、細胞が死にます。しかし、もはやトリプシンでは融合が起こらなくなります。マウスにある腫瘍の塊りを植えておいて、その中心にいろんな対照ウイルス、生理食塩水やこのMMPで活性化されるウイルスを注射してやります。すると、このMMPで活性化されるウイルスのみが腫瘍の増殖を抑えました。

このような過程を経て、DNAVEC社ではさまざまな製品を備えたパイプラインができました（図17）。また、さまざまなコラボレーションをしており、もう私たちが技術的面倒をみる必要はほとんどなくなるだけの力をもつようになりました。その中のいくつかの成果として、重症虚血肢とエイズの話を紹介します。

重症虚血肢は、動脈硬化症あるいは糖尿病をベースにして動脈が閉塞してしまうのですが、まず、しびれや冷感から始めて、50mぐらい歩くと痛

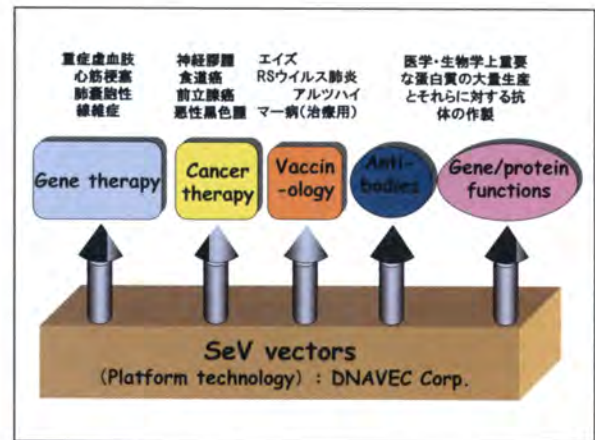


図17 センダイウイルスベクターの医学、生物学への応用

くて歩けない間欠性跛行となり、安静時痛ができて、最後には潰瘍、壊疽ができてしまいますので、足を切らなければならない深刻な病気であります。その安静時痛と壊疽のステージを重症虚血肢といいます。マウスのモデルで、動脈を縛って10日ぐらいすると足が落ちますが、動脈を縛ると同時に、その近辺にFGF2（fibroblast growth factor-2）を発現するセンダイウイルスを注射しておく、足がちゃんと残ります。これはスタートの実験であり、さまざまな予備実験を経て、今、九大病院で臨床研究が始まっています。これは、日本オリジナルのウイルスベクターによるはじめての遺伝子治療です。その第1ステージでは5 X 10⁷のベクターを入れて、第4ステージでは5 X 10⁹というように100倍まで順次増やして安全性と効果のチェックをするという計画で行われています。

エイズウイルスの総感染者は約4,000万人、2006年の新規感染者は430万人、1日平均11,000人の感染者が出ています。エイズワクチンはどうしても必要ですが、開発は非常に困難な状況にあります。エイズの表面タンパク質のgp120とかgp41（図8参照）を抗原にして中和抗体を作るという試みは数々なされてきましたが、あまりうまくいっていませんでした。そこで、私達はサルモデルを用い、サルの野生型エイズウイルスであるSIVmac239のGagというタンパク質をセンダイウイルスに挿入して、発現させるというやり方で、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を誘導して感染が防げないかと考えました。これは私が東大医科研と感染研のエイズセンターにいたときに始

めた実験です。まず少数のカニクイザルで予備実験をしました。ワクチン接種後SIVmac239で攻撃したところ、急性期のウイルス量はワクチンと非ワクチン処理間で差は見られませんが、慢性期のウイルス量は100分の1ぐらいに抑えられました。当時、これだけの効果を示すサルエイズワクチンのプロトコルはなく、これはいけるということで、一生懸命やりました。

アカゲサルを用いて、DNAワクチンというもので、まず“入れ知恵”、“点火”（プライム）をしておいて、センダイベクターでGagを発現させて押し上げる（ブースト）というやり方です。なるべく簡単にDNAも1回、センダイベクターも1回ということで刺激し、19週後SIVmac239で攻撃をするというやり方をしました。すると、さらに良いコントロールができました。しかし、コントロールできたものは8頭中5頭です（図18）。CTLの誘導は、MHC class Iという宿主側の分子によって決まるものですから、特定のMHCハロタイプを共有するサル群5頭（そのタイプは決定済み）にしか有効なCTL誘導ができなかったのです。しかし、CTL誘導ができたものでは急性期のウイルス量が大きく低下し、慢性期のウイルス量は検出限界以下ということでもあります。

これらの成績は野生型サルエイズウイルスのコントロールにはじめて成功したものととして、国際エイズワクチンイニシアティブ（各国政府、民間財団、世界銀行などの出資でエイズワクチンの臨床試験をコーディネートするNGO、ニューヨーク）に認められて、ヒトでの試行を目指した共同研究の締結を行いました。日本発のワクチン手法

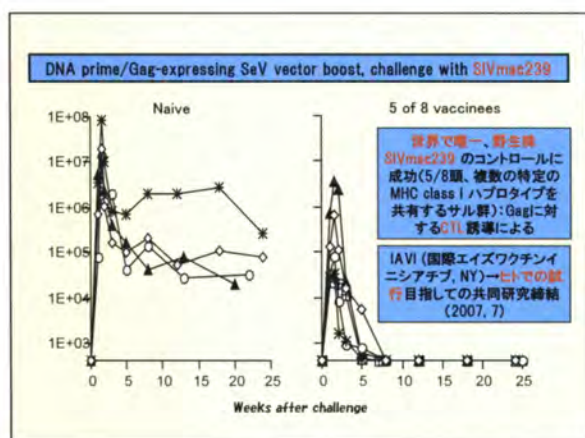


図18 センダイウイルスベクターを利用したエイズワクチン手法（サルモデル）

が国際的注目を集めたということで、何回も新聞報道されました。アデノウイルスベクターを使った臨床試験は最近行われましたが、効果がなく中止になりました。その点、日本のワクチンは、他とは似ていない独自のものであり、大変期待されています。そのわけは、サルを使った実験で効果が確認されているのはこのセンダイウイルス系だけだからです。もう1つの注目点は、鼻の粘膜から接種していることです。それは、粘膜免疫といって、性交時に粘膜を介して感染するのを防ぎ得る免疫を誘導する可能性もあるということにあります。今後どうなるかということはまだわかりませんが、期待しております。

学術研究からのいくつかの偶然と必然を経て日本オリジナルの技術が生まれました。それは、DNAVEC社とのタイミング良い出会いがあり、産学のコラボレーションがあったということです。将来の展望は、臨床試験の結果次第ということでもあります。

おわりに

最後に今私がやっている仕事を一部紹介します。これは1900年から2000年までの主要死因の推移です（図19）。主要死因は、50年代を境にして、それ以前には肺・気管支炎、胃腸炎、全結核すべてが感染症です。ところが、それ以降、脳血管障害、心疾患、悪性新生物というように、疾病のパターンも変わり、感染症はだんだん軽視され、人材育成にもこと欠くようになりました。しかしながら、ラッサ熱などをはじめとして、SARSあるいは高病原性鳥インフルエンザが発生し、新しい問題が

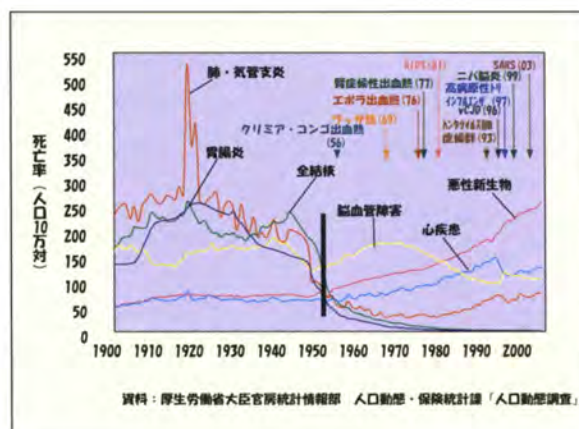


図19 わが国の主要死因の推移

著 者

永井美之 (NAGAI Yoshiyuki)

1939年生まれ。1965年名古屋大学医学部卒業。名古屋大学医学博士。1970年同大医学部付属癌研究施設助手、助教授、同付属病態制御研究施設助教授、教授、東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部教授、国立感染症研究所エイズ研究センター長、富山県衛生研究所長を歴任。1974年から76年までドイツのギーセン大学ウイルス研究所研究員、ウイルス病原性の研究等に対して、フンボルト賞、野口英世記念医学賞、中日文化賞、武田医学賞、紫綬褒章受章、日本学士院賞。現在、理化学研究所・感染症研究ネットワーク支援センター長、名古屋大学名誉教授。中部大学客員教授。