

センダイウイルスの最新知見

入江 崇

広島大学大学院医系科学研究科ウイルス学

要 約

センダイウイルス (SeV) は、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ニパウイルスなど、ヒトおよび動物に大きな被害をもたらす病原体を数多く含むパラミクソウイルス科に属する。パラミクソウイルス科のウイルスは、ゲノムとして一本鎖マイナス鎖 RNA を持ち、狂犬病ウイルスや水疱性口内炎ウイルス (VSV) などを含むラブドウイルス科や、エボラウイルスなどを含むフィロウイルス科などとともに、モノネガウイルススーパーファミリーを形成する。SeV は「センダイ」の名前が示すように、1953 年に東北大学で初めて分離された「日本発の」ウイルスで、実験動物として広く用いられている齧歯類を自然宿主とする呼吸器病ウイルスである。ヒトおよびその他の動物に病原性を持たないにもかかわらず、その生活環に共通点の多いモノネガウイルスのプロトタイプとしてウイルス複製メカニズムや、病原性の発現機構、自然免疫応答を含む宿主との相互作用の解明など、基礎ウイルス学の発展に大きな影響を与えてきた。その中で SeV は、1996 年に東京大学医科学研究所の永井・加藤らによってモノネガウイルスでは最初期に組換えウイルス作製技術が確立され、基礎研究の発展に決定的な勢いを与えただけでなく、蓄積された知見は様々な用途でのウイルスベクター開発につながっており、世界標準のベクターの一つとなっている。本総説では、第 69 回日本実験動物学会総会での発表内容を中心に、SeV に関する基礎研究から得られた最新の知見について紹介し、議論したい。

1. はじめに

去る 2022 年 5 月 18 日から 20 日にかけて仙台国際センターで開催された第 69 回日本実験動物学会総会において、表記のタイトルでの講演の機会を頂いた。名前の通りセンダイウイルス (SeV) 発見の地である仙台で、ウイルス発見 70 周年の節目に、ウイルス発見の当時を知る先生方に初めてお目にかかり、ご講演を拝聴し、ウイルス発見当時の空気を感じられたことは、多くの先輩方の培ってこられた歴史を受け継いでセンダイウイルス研究を進めている著者にとって、大変ありがたく、刺激になる体験であった。本編に入る前に、この度の講演の機会を下さった関係の先生方に心より感謝申し上げたい。

2. 序論

センダイウイルス (Sendai virus, SeV) は、1952 年に東北大学で新生児肺炎の原因ウイルスとして初めて分離された。その後ほどなくして、本ウイルスが新生児肺炎の原因ウイルスであることは否定され、マウスを用いてウイルス分離を試みたことによるコ

ンタミネーション、すなわち SeV はマウス由来のウイルスであることが明らかとなり、本来ならばそのまま忘れ去られるはずであった。しかし以下の 2 つの点から、ヒトの病原ウイルスではなかったにも関わらず注目をあびることとなった。

まず 1 つは、日本各地の大学、研究所のみならず、世界中の実験用マウスから次々とこのウイルスが分離され、多くの実験用マウスが SeV に汚染されている実態が明らかとなり、実験動物対策上の問題が浮き彫りにされたことである。

もう 1 つは、1958 年に大阪大学の岡田善雄博士らにより、ウイルスが細胞同士を融合させる能力をもつことがセンダイウイルスで初めて発見されたことである [1]。この性質を利用して異種細胞の融合を簡便に行うことが可能となり、ハイブリドーマの作製だけでなく、癌免疫・ワクチン研究や再生医療・細胞治療研究など、現在も様々な分野で幅広く活用されている。その後、SeV 粒子の表面に突出するスパイク蛋白質の 1 つである F 蛋白質を介した膜融合による感染メカニズムが明らかとなり、さらに名古屋大学の永井美之博士らによって、近縁のニューカッスル病ウイルス (Newcastle Disease Virus, NDV) を用いて、この融合活性と病原性の関連が解明され

た [2]。これは SeV や NDV にとどまらず、インフルエンザウイルスなど多くのウイルスに適用可能な主要な病原性規定原理の 1 つであった。

これらの大きな発見の後も SeV 研究は勢いを失わず、ウイルス学研究の中でも先頭を走る成果を上げてきた。1986 年には、塩田達雄博士（現大阪大学微生物病研究所）らにより SeV ゲノム全長の塩基配列が解読された [3]。1996 年には、これを基に永井美之・加藤篤博士ら（東京大学）によって、マイナス鎖 RNA ウイルスでは 1994 年ドイツの Conzelmann 博士らのグループの狂犬病ウイルスに続いて [4]、cDNA 化したウイルスゲノムからの感染性ウイルスのレスキューに成功した [5]。これにより組換えウイルスの作製が可能となり、任意の変異を導入したウイルスを用いた研究が可能となっただけでなく、これを応用したウイルスベクター開発への道が開けた。

SeV は、細胞宿主域が広く高増殖性で、安全性も高いことから扱いやすく、また実験動物として広く利用されているげっ歯類を自然宿主とするため、分子から個体レベルまでのシームレスな研究が可能である。これらの利点から、ヒトや家畜の病原ウイルスでは無いにも関わらず、ヒト及び動物の重要な病原ウイルスを数多く含むマイナス鎖 RNA ウイルスのプロトタイプとしてのウイルス学的研究だけでなく、自然免疫など宿主免疫との相互作用についても多くの研究がなされ、その発展に貢献してきた。また、蓄積されてきた成果は、遺伝毒性の無い様々な用途でのウイルスベクターの開発へと応用されている。

以下では、ウイルス学的研究の例として、多彩な機能を発揮する SeV アクセサリー蛋白質、SeV 感染と I 型インターフェロン系の関係、ウイルスベクターとしての応用などについて簡単に紹介したい。

3. アクセサリー蛋白質

マイナス鎖 RNA ウイルスでは共通して、ゲノム上にヌクレオカプシド蛋白質 (N)、リン酸化蛋白質 (P)、マトリクス蛋白質 (M)、スパイク糖蛋白質 (F, HN, G など)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L) がこの順に直列にコードされている (図 1)。パラミクソウイルス科のウイルスのうち、SeV、麻疹ウイルス、ニパウイルス、ムンプスウイルスなどを含むパラミクソウイルス亜科では、他のマイナス鎖 RNA ウイルスとは異なり、P 遺伝子の P 蛋白質とは異なるフレームから C 蛋白質が、また転写時に特定の部位に G 残基が挿入される RNA 編集により V や W 蛋白質が発現する (図 1)。

これらの P 遺伝子から発現する P 蛋白質以外の蛋白質の欠損は、増殖効率を低下させる場合があるものの、ウイルスの複製は維持されることから「お飾り」、すなわち「アクセサリー」蛋白質と呼ばれている。SeV の C 蛋白質欠損ウイルスを作製した場合、増殖効率は著しく低下する。しかし、数回の継代で、複数箇所導入した欠損変異が復帰し、増殖性が回復する [6]。このことから、C 蛋白質はただの「お飾り」ではなく、ウイルスの増殖に重要な機能を担っていることが示唆される。実際に、著者らを含む様々なグループにより、SeV の C 蛋白質が、ウイルス増殖の本質を担う、また免疫などの宿主応答をコントロールする様々な機能を発揮することが明らかとなった (表 1)。

4. I 型インターフェロン系との関係

近年様々な病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) と、これを認識して自然免疫応答を活性化するパターン認識受容体 (Pattern recognizing receptors, PRRs) が同定され

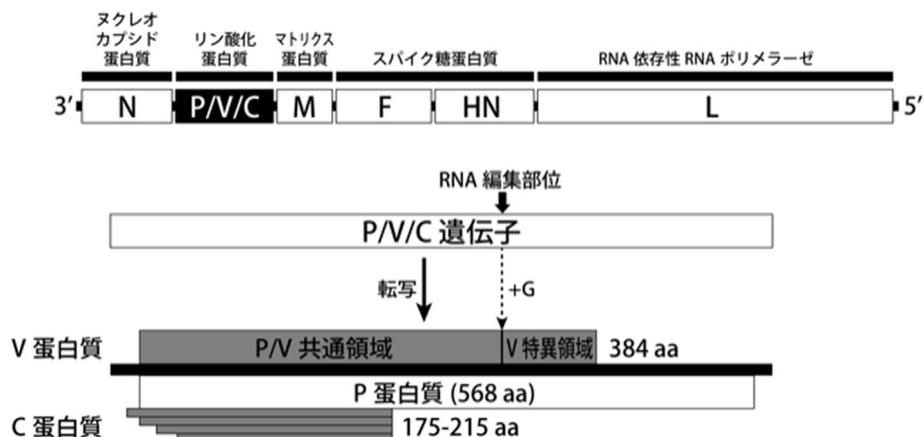


図 1 センダイウイルスゲノム構造の概要とアクセサリー蛋白質発現

てきた。例えば RNA ウイルス感染では、ウイルス由来 RNA 分子が宿主の RLRs (RIG-I-like receptors) と呼ばれる RIG-I (retinoic acid inducible gene-I) や MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) などの細胞質内レセプターによって認識される。この認識により、宿主に I 型 IFN 産生が誘導され、I 型 IFN 受容体を介して様々なエフェクター分子 (Interferon-stimulated genes; ISGs) の発現により抗ウイルス状態に至る (図 2)。宿主内での自身の感染、増殖を有利に進めるために、様々なウイルスがこの自然免疫経路を阻害し、回避する能力を有しており、病原性発現の重要な一因となっていることが明らかにされてきている。他のウイルスに先駆けて、SeV のアクセサリ蛋白質である C 及び V 蛋白質が、I 型 IFN 経路を阻害することが明らかにされた [7, 8]。

その後、I 型 IFN 経路の単一の段階だけでなく、複数の段階を抑制していること [9-13]、経路の抑制だけでなく、そもそもウイルス感染が宿主に認識されないように RLRs を刺激するような RNA 分子の産生を抑制していること [14-16] などが明らかとなり、ウイルスが確実に宿主への感染をスタートさせ、効率よく増殖して子孫を拡散させるために、様々な側面から自然免疫を回避する危機対応策を講じている様子が明らかとなった (図 2)。また、その詳細な意義は不明だが、アクセサリ蛋白質は細胞死にも関与しており、C 蛋白質がアポトーシスを抑制、C 蛋白質のヴァリエントである Y 蛋白質がネクロトーシスを亢進することが報告されている [17, 18]。

この様に SeV は、多種多様に、かつ強力に宿主の I 型 IFN 系を抑制、回避する仕組みを持つことが明

表 1 SeV C 蛋白質の多彩な機能

機能	文献
ウイルス粒子形成・出芽を促進する	Sugahara 2004; Sakaguchi 2005; Irie 2007, 2008a, 2010
ウイルス RNA 合成の極性を制御する	Curran 1991, 1992; Cadd 1996; Irie 2008b, 2014
I 型 IFN 誘導を促す異常な RNA 合成を抑制する	Irie 2010, 2015, 2018; Sánchez-Aparicio 2017
I 型 IFN 系を抑制して宿主の自然免疫を回避する	Garcin 1999; Gotoh 1999; Irie 2010, 2012, 2013, 2015; Oda 2015, 2018
アポトーシスの誘導を抑制する	Koyama 2003; Irie 2010, 2012
ネクロトーシスを促進する	Schock 2017

(本表の文献については、参考文献欄にすべてを挙げていない)

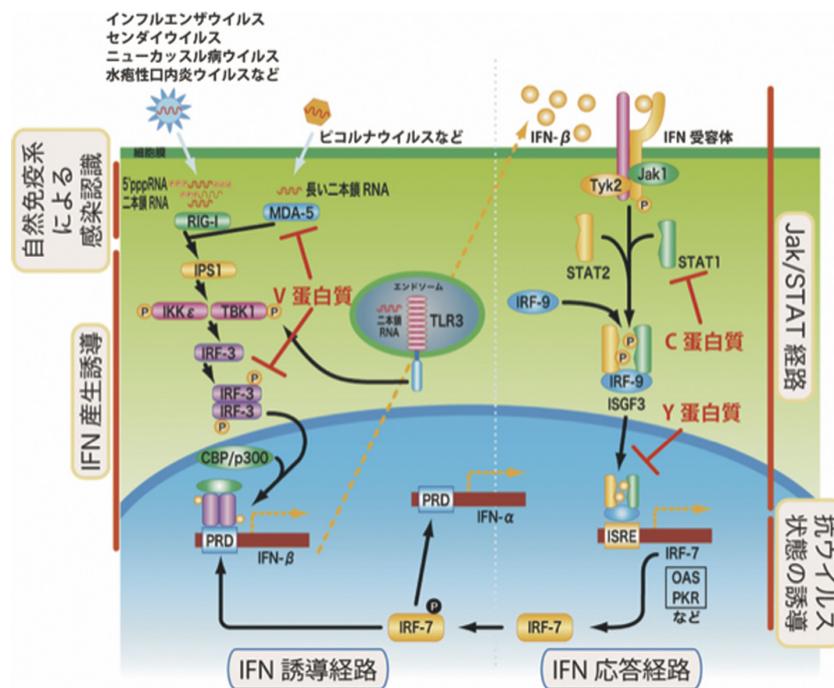


図 2 RNA ウイルス感染によって惹起される I 型 IFN 経路の概要図と SeV アクセサリ蛋白質による阻害

らかにされてきた。一方で、特に自然免疫研究の分野においては、I型IFN誘導時にSeVが用いられている。この相反する性質は何に起因するのであろうか？

2010年にBaumらによって、実際のSeV感染でRIG-Iが認識するPAMPとして、コピーバック型欠損干渉(copyback-type defective interfering, cbDI)ゲノムのRNAが同定された[19]。以前からマイナス鎖RNAウイルスを高力価で継代を繰り返すとcbDIゲノムが発生して、ウイルス様粒子(DI粒子)中に取り込まれ、ウイルスサンプル中に蓄積することが知られていた。著者らが自然免疫研究で広く用いられているSeVカンテル株(ATCC, VR-907)を入手したところ、その市販サンプル中に大量のDI粒子が含まれており、これが強力なIFN誘導因子となることが示された[20, 21]。DI粒子の存在はウイルスの増殖に抑制的に働くことから、著者の学生時代の恩師(河合明彦博士[京都大学])より、DIゲノム/DI粒子の発生を防ぐためにウイルスを増やす際には低いウイルス量からじわじわと増やさないといけない、と教わったことを思い出し、詳細な解析を行ったところ、このDI粒子の由来は、ウイルス増殖中に、DI産生性を獲得したウイルスが偶発的に出現したことによることが明らかとなった[21]。

ここで得られたDI産生性ウイルスクローンは、cbDIゲノムを恒常的に産生し、I型IFN産生を強力に誘導する。自然免疫を賦活化するPAMPsがアジュバント効果を発揮することが知られており、実際にSeVのdbDIゲノムが高いアジュバント効果を発揮することが報告されている[22]。著者らは、上記のcbDIゲノム産生性クローンの高いアジュバント効果を確認しており、新しい高効率ワクチンベクターのバックボーンとしての応用が期待される。

5. その他の研究と応用

①自然界でのウイルスの長期維持メカニズムについて

センダイウイルスがげっ歯類に呼吸器病を起こすウイルスであることは間違いなく、世界中の研究用マウスが感染していたことは事実であるが、実は自然界での宿主は同定されておらず、自然界のげっ歯類で蔓延している事実も確認されていないだけでなく、野生のネズミからの分離例も知られていない。その一方で、最近、メタゲノム解析によりセンザンコウからコロナウイルスに加えてセンダイウイルスが検出されている[23]。

また、げっ歯類が自然宿主だとしても、SeVのような急性感染性のウイルスが自然界で長期に渡ってどの様に維持され続けているのか、そのメカニズムは全く明らかにされていない。

SeVを始めとする様々なマイナス鎖RNAウイルスでは、偶発的な変異により持続感染性が獲得される場合があることが知られており、著者らも生体温度での増殖性を保持した持続感染性ウイルスを得ることに成功している。このようなウイルスの出現が自然界でのウイルスの維持に関与しているのかもしれない。

②ウイルスゲノム遺伝子間配列により遺伝子発現調節機構

先に述べたように、一本鎖マイナス鎖RNAウイルスのゲノム上には、全てのウイルスで同じ順番に各ウイルス蛋白質をコードする遺伝子が直鎖状に並んでコードされている(図1)。これらの各遺伝子は、1から数十塩基の遺伝子間領域で隔てられており、上流遺伝子から順番に転写されるが、下流に行くに従って転写量が減少する。すなわち、各遺伝子のコードされた順番は、各蛋白質の必要量を反映している。著者らは最近、この並び順だけではなく、各遺伝子間に存在する塩基配列によっても遺伝子の転写量が制御されていることを見出した。

③ウイルスベクターとしての活用

SeVは、これまでも述べてきたように、げっ歯類以外に病原性が無いこと、染色体に傷をつけず遺伝毒性が無いこと、細胞宿主域が広いこと、増殖性が高いことなど、ウイルスベクターとして優れた性質を有している。さらに、基礎研究により蓄積した豊富な知識を利用した性能の改変が可能であり、例えば複数の外来遺伝子を発現させたり、持続感染性を付与したり(上記①など)、温度感受性変異体やウイルス干渉作用を利用することで任意の時点で感染ウイルスを除去したり、自立増殖性を欠損した半生ウイルス化を行ったり、スパイク蛋白質の改変により細胞種や組織に対する特異性を変更したり、導入遺伝子の発現量を調節したり(上記②)といった、様々な用途に応じた性能のチューニングが可能である。

実際、様々な遺伝子治療用ベクターとして臨床試験が進められており、株式会社IDファーマの発売する高効率iPS細胞作製用ベクター(CytoTune®シリーズ)は広く世界中で使用されている。これらに加え、基礎研究用途でも特定組織のトラッキングベクターやゲノム編集用ベクターなども開発されている。また著者らも、様々な真核細胞で適用可能な高効率蛋白質産生用ベクターの開発を進めている。

6. 終わりに

SeVは、ヒトや家畜に病原性を示さない「重要でない」ウイルスであるにも関わらず、この日本で発見されたウイルスは、主として日本の研究者による

緻密で粘り強い研究やセレンディピティにより発展し続けており、ウイルス学的貢献の蓄積のみならず、多様な分野への広がりを見せている。今後も、多くの先生方との共同研究、ディスカッションを通じて、この日本初のウイルスを広く役立つツールとしてさらに発展させる一翼を担うことができれば、これほど光栄なことはない。

最後に、本稿の趣旨とはすこし外れるが、現在著者は、東京大学医科学研究所の佐藤佳教授が主宰するウイルス学研究コンソーシアム「G2P-Japan」のコアメンバーとしても活動を行っている。このコンソーシアムでは、国内の複数の研究機関の若手、中堅研究者がそれぞれの得意分野を担当し、2019年から現在に至るコロナパンデミックの勃発という有事において、海外グループを凌駕する質の成果を、*Nature* 誌、*Cell* 誌などの所謂 TOP ジャーナルにいち早く発表し続けている。このような研究コンソーシアムの構築は、感染症分野のみならず様々な分野の研究を効率化し、発展させるものであると考える。現在、基礎研究者を志す若手の減少が問題となっているが、本コンソーシアムでは次代につながる若手研究者の育成を進めることも目標としている。少しでも興味を持たれた若手研究者（とその卵）の方は、主宰の佐藤教授または著者にご一報いただければ幸いである。

参考文献

- Okada Y. The fusion of Ehrlich's tumor cells caused by HVJ virus in vitro. 1958. *Biken's J.* 1: 103–110.
- Nagai Y, Klenk HD, Rott R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. 1976. *Virology*, 72: 494–508.
- Shioda T, Iwasaki K, Shibuta H. Determination of the complete nucleotide sequence of the Sendai virus genome RNA and the predicted amino acid sequenced of the F, HN, and L proteins. 1986. *Nucleic Acids Res.* 15: 2927–2944.
- Conzelmann KK, Schnell M. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. 1994. *J Virol.* 68: 713–719.
- Kato A, Sakai Y, Shioda T, Kondo M, Nakanishi M, Nagai Y. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. 1996. *Genes Cells*, 1: 569–579.
- Yoshida A, Sakaguchi T, Irie T. Passage of a Sendai virus recombinant in embryonated chicken eggs leads to markedly rapid accumulation of U-to-C transitions in a limited region of the viral genome. 2012. *PLoS One*, 7: e49968.
- Gotoh B, Takeuchi K, Komatsu T, Yokoo J, Kimura Y, Kurotani A, Kato A, Nagai Y. Knockout of the Sendai virus C gene eliminates the viral ability to prevent the interferon-alpha/beta-mediated responses. 1999. *FEBS Lett.* 459: 205–210.
- Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J, Gotoh B. C and V proteins of Sendai virus target signaling pathways leading to IRF-3 activation for the negative regulation of interferon-beta production. 2004. *Virology*, 325: 137–148.
- Takeuchi K, Komatsu T, Yokoo J, Kato A, Shioda T, Nagai Y, Gotoh B. Sendai virus C protein physically associates with Stat1. 2001. *Genes Cells*, 6: 545–557.
- Kiyotani K, Sakaguchi T, Kato A, Nagai Y, Yoshida T. Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice. 2007. *Virology*, 359: 82–91.
- Irie T, Nagata N, Igarashi T, Okamoto I, Sakaguchi T. Conserved charged amino acids within Sendai virus C protein plays multiple roles in the evasion of innate immune responses. 2010. *PLoS One*, 5: e10719.
- Irie T, Kiyotani K, Igarashi T, Yoshida A, Sakaguchi T. Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein. 2012. *J Virol.* 86: 7136–45.
- Irie T, Yoshida A, Sakaguchi T. Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its RAN GTPase-mediated nuclear localization. 2013. *PLoS One*. 8: e73740.
- Takeuchi K, Komatsu T, Kitagawa Y, Sada K, Gotoh B. Sendai virus C proteins plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA. 2008. *J Virol.* 82: 10102–10110.
- Yoshida A, Kawabata R, Honda T, Tomonaga K, Sakaguchi T, Irie T. IFN- β -inducing viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA-type-dependent manner. 2015. *Front Microbiol.* 6: 804.
- Sánchez-Aparicio MT, Garcin D, Rice CM, Kolakofsky D, García-Sastre A, Baum A. Loss of Sendai virus C protein leads to accumulation of RIG-I immunostimulatory defective interfering RNA. 2017. *J Gen Virol.* 98: 1282–1293.
- Koyama AH, Irie H, Kato A, Nagai Y, Adachi A. Virus multiplication and induction of apoptosis by Sendai virus: role of the C proteins. 2003. *Microbes infect.* 5: 373–378.
- Schock SN, Chandra NV, Sun Y, Irie T, Kitagawa Y, Gotoh B, Coscoy L, Winoto A. Induction of necrotic cell death by viral activation of the RIG-I and STING pathway. 2017. *Cell Death Differ.* 24: 615–625.

19. Baum A, Sachidanandam R, García-Sastre A. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. 2010. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 16303–16308.
20. Mercado-López X, Cotter CR, Kim WK, Sun Y, Muñoz L, Tapia K, López CB. Highly immunostimulatory RNA derived from a Sendai virus defective viral genome. 2013. *Vaccine*, 31: 5713–5721.
21. Yoshida A, Kawabata R, Honda T, Sakai K, Ami Y, Sakaguchi T, Irie T. A Single Amino Acid Substitution within the Paramyxovirus Sendai Virus Nucleoprotein Is a Critical Determinant for Production of Interferon-Beta-Inducing Copyback-Type Defective Interfering Genomes. 2018. *J Virol*. 92: e02094-17.
22. Martínez-Gil L, Goff PH, Hai R, García-Sastre A, Shaw ML, Palese P. A Sendai virus-derived RNA agonist of RIG-I as a virus vaccine adjuvant. 2013. *J Virol*. 87: 1290–1300.
23. Liu P, Chen W, Chen JP. Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*). 2019, *Viruses*, 11: 979.