

令和元年5月30日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04720

研究課題名(和文) 霊長類モデルを用いたインフルエンザ感染重症化宿主因子の探索

研究課題名(英文) Search for host factors in severe influenza virus infection using a nonhuman primate model

研究代表者

伊藤 靖 (Itoh, Yasushi)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザルを用いて、高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染した時に重症になる遺伝的要因を解析した。免疫抑制剤を投与し、免疫反応が起こりにくい状況で、インフルエンザウイルス感染時に重症になったサルと軽症のサルのゲノム遺伝子を次世代シーケンサーを用いて比較した。その結果、免疫タンパクであるケモカインの1種にアミノ酸の置換を伴う多型が検出された。変異タンパク質は、細胞を活性化する作用が低い傾向があり、これが重症の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスに感染した時に、重症化しやすい遺伝子をもつサルを明らかにした。その結果に基づき、人の遺伝子が解析可能となると、重症になりやすい人があらかじめわかり、治療薬/予防薬開発のための標的分子が明らかになる。また、ワクチン開発と製造には時間がかかるため、パンデミック早期にはワクチン供給量に制限があり、接種の優先順位の決定が必要になる。その際に重症化遺伝子多型解析をハイリスクグループへのワクチンの優先接種に役立てることができる。

研究成果の概要(英文)：To determine genetic backgrounds that affect symptoms in influenza virus infection, we compared genomic sequences of cynomolgus macaques that showed severe clinical signs with those of macaques that showed mild clinical signs under an immunosuppressive condition. Using the next generation sequencing, we found a genetic polymorphism in a gene that codes a kind of chemokine with an amino acid substitution. The chemokine with the amino acid substitution showed a tendency to induce weak immune responses in cells. Therefore, it is suggested that this change is related to severe influenza virus infection in immunocompromised hosts.

研究分野：病理学

キーワード：インフルエンザウイルス 霊長類モデル サイトカインストーム ゲノム 遺伝子多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高病原性鳥インフルエンザウイルスの人での感染は1997年の初報告以来、致死率が6割に達し、抗ウイルス薬の登場にも関わらず、改善が見られない。そのため、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の重症化の原因は、ウイルスの特性のみならず、宿主側の要因との相互作用によると考えられた。

申請者はこれまでカニクイザルを用いて種々のインフルエンザウイルスの病原性の解析を行ってきた。マウスはインフルエンザウイルスに対する感受性が比較的高い一方で、感染しても発熱しないなど人と異なる点もある。そのため人での病原性の予測のために、人と類似の反応を示すカニクイザルを用いて、研究を行なった。

人では、高サイトカイン血症(サイトカインストーム)がインフルエンザウイルス感染時の重症化の原因と考えられている。そこで、サイトカインストームの予防のために、カニクイザルに免疫抑制剤を投与し、免疫低下モデルを樹立した。このサルに H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させると、リンパ球数が減少し、組織学的肺炎の程度は軽減したが、サイトカイン産生は上昇した。この条件下でも起こるサイトカイン反応であるので、重症化はリンパ球以外の細胞の反応によると考えられた。また、全例が重症化するのではないため、免疫抑制状態でもサイトカイン過剰産生を起こして重症化する個体と重症化しない個体の遺伝的差異を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

本課題の目的はカニクイザルを用いたインフルエンザウイルス感染時に重症化を規定する遺伝的要因の同定である。そのために次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスにより、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染時に重症化するサルと軽症で回復するサルとを比較し、重症化を規定する遺伝子多型を特定する。その多型が、実際にタンパク質の機能、発現の違いとして表れることを試験管内で確認する。重症化規定遺伝子を同定後、感染前にカニクイザルの遺伝子検査を行い、感染時の症状を予測する。その後、実際にウイルス感染実験を行い、事前遺伝子検査の正確さを検証する。

3. 研究の方法

カニクイザルに高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させる。重症化した個体と軽症で回復した個体のゲノム DNA を用いて、約 400 個の免疫関連遺伝子のターゲットシーケンシングを実施し、重症化を規定する遺伝子多型を抽出する。エキソン領域に重症化候補遺伝子多型がある場合は、アミノ酸置換タンパク質を用いて、機能、細胞の反応の変化を試験管内で検証する。これら 2 つの結果を総合し、インフルエンザウイルス感染における重症化宿主因子の候補を決定する。重症化因子の証明試験のために、感染前にカニクイザルの末梢血を用いて、重症化規定遺伝子の多型を調べ、感染により重症化が予測される個体を選ぶ。これらのサルに実際に高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させ、症状、サイトカイン反応、遺伝子発現を測定する。これらの情報をもとに治療の標的となる分子を決定する。

4. 研究成果

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染時にカニクイザルの重症化と相関する遺伝子多型を解析した。

まず、高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させた免疫低下状態のカニクイザルの症状と

相関する遺伝子多型を解析した。その結果、ケモカインの1種の遺伝子のエクソン領域に多型が見られた。この多型はアミノ酸置換を伴い、この置換に伴う機能の変化を解析するため、人工合成により野生型ケモカインとアミノ酸置換変異ケモカインを作製した。これらのケモカインとカニクイザル脾臓細胞を混合培養し、活性化に伴い上昇するサイトカインを測定した。変異ケモカインを加えた時、インターロイキン-6 (IL-6) の産生量は、野生型ケモカインを加えた時の2/3程度であった。変異ケモカインと野生型ケモカインを同量混合した時は、変異ケモカインを加えた時と同様のIL-6産生が見られた。従って、変異ケモカインにより野生型ケモカインの機能が阻害されると考えられた。すなわち、一方の対立遺伝子に変異ケモカイン遺伝子があると炎症性サイトカイン反応が抑制されることが示唆された。

次にあらかじめカニクイザルの血液を採取し、このケモカイン遺伝子の塩基配列を決定し、重症化と相関する多型を持つサルと持たないサルを選別した。免疫抑制剤を投与後にH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させたところ、重症化遺伝子多型を持つサルでは2/3の割合で重症化し、相関することが証明された。

免疫低下時にサイトカインを産生する細胞の種類を調べるために、高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させたカニクイザルの肺組織を用いて、in situ hybridizationを行い、IL-6産生細胞を検出した。免疫抑制状態の時、肺胞上皮細胞にIL-6 mRNAのシグナルが検出され、重症化の原因はウイルスに感染した肺胞上皮細胞の反応によることが示唆された。

新たに免疫抑制のない条件で、高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させたカニクイザルの遺伝子を用いて、症状と相関する遺伝子多型を解析した。インフルエンザウイルス感染、免疫応答、血液型に関連する遺伝子 545 個から約 5700 個のエクソンを回収するために sequence capture probe を設計した。重症になったサルと軽症のサル 6 頭ずつの組織からゲノム DNA を抽出、PCR により標的のエクソンを増幅、probe で capture した。この遺伝子の塩基配列を次世代シーケンサーで決定し、多型を解析した。その結果、重症と関連する変異を 9 個、軽症と関連する変異を 12 個検出した。そのうち、非同義置換を伴う重症と関連する遺伝子は 1 個、軽症と関連する遺伝子は 4 個であった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. [Itoh Y](#), [Shichinohe S](#), [Nakayama M](#), [Igarashi M](#), [Ishii A](#), [Ishigaki H](#), [Ishida H](#), [Kitagawa N](#), [Sasamura T](#), [Shiohara M](#), [Doi M](#), [Tsuchiya H](#), [Nakamura S](#), [Okamoto M](#), [Sakoda Y](#), [Kida H](#), [Ogasawara K](#). Emergence of H7N9 Influenza A Virus Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Nonhuman Primates. *Antimicrob Agents Chemother*, 査読有, 59: 4962-4973, 2015. PMID:26055368, doi: 10.1128/AAC.00793-15
2. [Shiina T](#), [Yamada Y](#), [Aarnink A](#), [Suzuki S](#), [Masuya A](#), [Ito S](#), [Ido D](#), [Yamanaka H](#), [Iwatani C](#), [Tsuchiya H](#), [Ishigaki H](#), [Itoh Y](#), [Ogasawara K](#), [Kulski JK](#), [Blancher A](#). Discovery of novel *MHC-class I* alleles and haplotypes in Filipino cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) by pyrosequencing and Sanger sequencing. *Immunogenetics*, 査読有, 67:563-578, 2015. doi: 10.1007/s00251-015-0867-9.
3. [Itoh Y](#). Translational research on influenza virus infection using a nonhuman primate model. *Pathol Int*, 査読有, 66: 132-141, 2016. doi: 10.1111/pin.12385
4. [Shichinohe S](#), [Itoh Y](#), [Nakayama M](#), [Ozaki H](#), [Soda K](#), [Ishigaki H](#), [Okamoto M](#), [Sakoda Y](#), [Kida H](#), [Ogasawara K](#). Comparison of pathogenicities of H7 avian influenza viruses

- via intranasal and conjunctival inoculation in cynomolgus macaques. *Virology*, 査読有、493:31-38, 2016. doi: 10.1016/j.virol.2016.03.007.
5. Nakayama M, Ozaki H, Itoh Y, Soda K, Ishigaki H, Okamatsu M, Sakoda Y, Park C-H, Tsuchiya H, Kida H, Ogasawara K. Vaccination against H9N2 avian influenza virus reduces bronchus-associated lymphoid tissue formation in cynomolgus macaques after intranasal virus challenge infection. *Pathol Int*, 査読有、66: 678-686, 2016. doi:10.1111/pin.12472
 6. Yasui F, Itoh Y, Ikejiri A, Kitabatake M, Sakaguchi N, Munekata K, Shichinohe S, Hayashi Y, Ishigaki H, Nakayama M, Sakoda Y, Kida H, Ogasawara K, Kohara M. Sensitization with vaccinia virus encoding H5N1 hemagglutinin restores immune potential against H5N1 influenza virus. *Sci Rep*, 査読有、2016 Nov 28;6:37915 doi:10.1038/srep37915
 7. Nakayama M, Itoh Y, Shichinohe S, Nakabayashi R, Ishigaki H, Sakoda Y, Le QM, Kawaoka Y, Kida H, Ogasawara K. Potential Risk of Repeated Nasal Vaccination that Induces Allergic Reaction with Mucosal IgE and Airway Eosinophilic Infiltration in Cynomolgus Macaques infected with H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Vaccine*, 査読有、35: 1008-1017, 2017. 10.1016/j.vaccine.2017.01.008
 8. 伊藤靖、小笠原一誠: カニクイザルモデルを用いた免疫抑制状態における鳥インフルエンザウイルスの病原性の解明、臨床免疫・アレルギー科、査読無、第68巻第1号、31-37, 2017.
 9. Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Yamayoshi S, Uraki R, Ito M, Nakajima N, Yamada S, Imai M, Kawakami E, Tomita Y, Fukuyama S, Itoh Y, Ogasawara K, Lopes TJS, Watanabe T, Moncla LH, Hasegawa H, Friedrich TC, Neumann G, Kawaoka Y. Emergence of Oseltamivir-Resistant H7N9 Influenza Viruses in Immunosuppressed Cynomolgus Macaques. *J Infect Dis*, 査読有、216:582-593, 2017. doi: 10.1093/infdis/jix296.
 10. Sekiya T, Mifsud EJ, Ohno M, Nomura N, Sasada M, Fujikura D, Daito T, Shingai M, Ohara Y, Nishimura T, Endo M, Mitsumata R, Ikeda T, Hatanaka H, Kitayama K, Motokawa K, Sobue T, Suzuki S, Itoh Y, Brown LE, Ogasawara K, Kino Y, Kida H. Inactivated whole virus particle vaccine with potent immunogenicity and limited IL-6 production is ideal for influenza. *Vaccine*, 査読有、37: 2158-2166, 2019. doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.057

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 伊藤靖、七戸新太郎、仲山美沙子、石垣宏仁、小笠原一誠、カニクイザルを用いた H7 亜型インフルエンザウイルスの病原性の比較、第 104 回日本病理学会総会、2015
2. 伊藤靖、七戸新太郎、仲山美沙子、石垣宏仁、岡松正敏、迫田義博、喜田宏、小笠原一誠、カニクイザルを用いた H7N9 亜型インフルエンザウイルスに対するウイルスライブラリー由来全粒子不活化ワクチンの有効性評価、第 19 回日本ワクチン学会学術集会、2015
3. Itoh Y, Nakayama M, Ishigaki H, Ogasawara K. Immunological memory restores antibody responses against H7N9 influenza virus after immunosuppression with cyclophosphamide and cyclosporine A in vaccinated macaques, 第 44 回日本免疫学会学術集会、2015

4. 伊藤靖、石垣宏仁、仲山美沙子、小笠原一誠、カニクイザルを用いたインフルエンザワクチンによる免疫記憶に及ぼす免疫抑制剤の影響の解析、第 105 回日本病理学会総会、2016
5. Itoh Y, Nakayama M, Ishigaki H, Kawaoka Y, Ogasawara K, Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza virus in a macaque model under an immunosuppressed condition, 第45回日本免疫学会学術集会、2016
6. Itoh Y, Investigation of effects of the vaccine and antiviral drugs for influenza virus in cynomolgus macaques, The 2nd J-GRID International Symposium, 2017
7. Itoh Y, Nakayama M, Ishigaki H, Ogasawara K.免疫低下霊長類モデルにおける高病原性鳥インフルエンザウイルスによる肺炎、第106回日本病理学会総会、2018
8. Itoh Y, Investigation of effects of the vaccine and antiviral drugs for influenza virus in cynomolgus macaques, The 3rd J-GRID International Symposium, 2018
9. 伊藤靖、石垣宏仁、仲山美沙子、小笠原一誠、免疫病理学の新展開「霊長類を用いた疾患モデルにおける炎症反応の解析」、第107回日本病理学会総会、2018
10. 伊藤靖、鈴木沙織、石垣宏仁、仲山美沙子、新開大史、大東卓史、野村直樹、喜田宏、小笠原一誠、サルモデルを用いた季節性インフルエンザに対する不活化全粒子ワクチンの有効性評価、第 22 回日本ワクチン学会学術集会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

1.名称：インフルエンザに対する医薬

発明者：小原道法、安井文彦、伊藤靖、小笠原一誠、石井孝司

権利者：

種類：

番号：特願 2017-193452 号

出願年：2017

国内外の別：国内

2. 名称:新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有する DI_s 株由来組換えワクシニアウイルス

発明者：安井文彦、小原道法、山地賢三郎、伊藤靖、小笠原一誠、石井孝司

権利者：

種類：

番号：特願 2018-213990

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqpatho2/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：椎名 隆

ローマ字氏名：Takashi Shiina

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00317744

研究分担者氏名：仲山 美沙子

ローマ字氏名：Misako Nakayama

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 00510306

研究分担者氏名：小笠原 一誠

ローマ字氏名：Kazumasa Ogasawara

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20169163

研究分担者氏名：七戸 新太郎

ローマ字氏名：Shintaro Shichinohe

所属研究機関名：帯広畜産大学

部局名：畜産学部

職名：特任助教

研究者番号(8桁): 80737148

研究分担者氏名：石垣 宏仁

ローマ字氏名：Hirohito Ishigaki

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 90432301

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。