

平成30年6月12日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05287

研究課題名(和文) H5N1鳥インフルエンザウイルス流行地におけるウイルス進化とヒト感染リスクの評価

研究課題名(英文) Characterizing avian influenza H5N1 viruses in Egypt

研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA, Takaaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80271633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：エジプト国ダマンフル大学と連携し、ハトから分離された高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルスに特有の遺伝子型が存在することを発表した。さらにH5N1エジプト分離株を用いてヒト呼吸器上皮細胞株に感染させた結果、種々のHAバリエーションが検出され、その一部はヒト細胞に多く発現しているレセプター結合性が上昇しているものの、ウイルス粒子の安定性および個体間伝播性は低下していることを見出し、発表した。

加えて、インフルエンザウイルスNA遺伝子を標的とした新規ヘアピン型ペプチド核酸をプローブとするクロマトキットが、H5N1・H7N1ウイルスを特異的に検出し、診断キットとしての有用性を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We reported that highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses, isolated from naturally infected pigeons in Egypt, have several unique mutations in viral polymerase genes. We also demonstrated that these mutations were responsible for changes in polymerase activity, providing new insights into the possible roles of pigeons in avian influenza virus transmission and evolution. We further determined hemagglutinin genetic diversification that occurred during H5N1 virus infection of primary human airway cells and characterized their phenotypes by recombinant variants. Our results revealed that a variety of minor HA variants emerged during a single infection in human airway cells, which altered their HA properties to more efficiently infect human cells. In addition, we prepared a novel hairpin-type peptide nucleic acid, which has a sequence complementary to the N1-NA gene of influenza A virus, and demonstrated the sequence-dependent detection of N1 subtype viruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ H5N1 エジプト ペプチド核酸

1. 研究開始当初の背景

感染者の半数以上が死亡することが報告されている高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルス流行地域の中で、エジプトは全世界の 25%以上のヒト感染症例(累積数)が集中している国であった(2014 年申請時)。また、同国で検出された H5N1 ウイルスは、ヒト感染性・伝播性に重要なウイルス複製酵素 PB2 の 627K 変異(ヒトへの馴化)を既に獲得している。そのため、さらなるトリ-トリ間およびトリ-ヒト間での感染拡大の中で、今後新たな変異ウイルスが出現し、ヒト-ヒト間で(気道感染する)パンデミックウイルスが出現する危険性が懸念された。

申請者らの研究グループは、申請者が大阪大学(2005-2011年)に所属していた時期より、先駆的研究として、科学研究費補助金 基盤研究B海外学術研究(代表:大阪大学・生田和良教授、2008-2010、2011-2015)の研究分担者として、エジプト国の研究機関と連携し、同国のH5N1ウイルスを対象とした研究を推進してきた。また、JSPS二国間交流事業(エジプトのH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの疫学調査とウイルス学的研究)において主に人的交流を目的とした共同研究を遂行してきた。その過程で共同研究を開始したMadiha S. Ibrahim博士(ダマンフル大学・獣医学部・ウイルス学・教授)を、平成27(2015)年度に半年間の予定で京府立医科大学の申請者らの教室に招聘した。また、それに先んじて、Ibrahim博士の教室の大学院生1名(Emad EL-GENDY氏)が平成26(2014)年度よりエジプト国の国費留学生として2年間の予定で申請者らの教室において、本申請課題を基盤とする同国分離株(野鳥・家禽由来)の疫学・ウイルス学研究を行った。

一方、研究分担者である開発 邦宏 特任准教授(大阪大学・産業科学研究所)とは平成18(2006)年より、ペプチド核酸(PNA)を用いたウイルス検出システムの開発で共同

研究を開始しており、申請者が研究代表者であった基盤B研究(呼吸器ウイルス検出用オンチップデバイスの開発と診断への応用:平成24-26年度)において研究分担者として、PNAをプローブとしてインフルエンザウイルスの検出デバイスの開発を進めてきた。

そこで本研究では、上記研究を発展させ、特にH5N1ウイルスの選択的検出と抗ウイルス薬抵抗性株の特異的検出を目標として、上述したモノクローナル抗体を基盤とした検出デバイスに新規PNAプローブを加えた診断キットを開発し、評価試験を行うことを計画した。

2. 研究の目的

これまでの先行研究において協力関係を構築したエジプト国ダマンフル大学(Madiha S. Ibrahim教授)と連携し、同国野鳥および家禽(ニワトリ等)におけるH5N1鳥インフルエンザウイルスのウイルス進化およびヒトにおけるパンデミック流行(ヒト-ヒト感染)のリスク評価を行うことを研究目的とする。加えて、上述した新規プローブ等を用いたH5N1迅速診断キットの開発及び評価を行う。

3. 研究の方法

研究期間の3年間に以下の研究項目を計画・遂行した。

H5N1 臨床株・分離株の遺伝型多様性解析:エジプトで流行しているH5N1のQuasi-species研究、特に薬剤耐性変異の検出と、ヒト適応型変異の検出を重点的に行う。

組換えH5N1ウイルスを用いたヒト上皮細胞への感染試験:重要だと考えられるアミノ酸変異を検出した場合には、研究室で表現型を解析済みのH5N1に当該変異を導入し、ヒト上皮細胞へ感染試験を行い、ウイルス学的特徴を解明する。

新規ペプチド核酸をプローブとする検出系の評価:PNAプローブを用いた新規デバイス作製および評価試験を行う。

4. 研究成果

H5N1 臨床株・分離株の遺伝型多様性解析
エジプト国のハトより分離された H5N1 鳥インフルエンザウイルス 2 株のゲノム解析を行い、さらにウイルス増殖に影響を与えるウイルスポリメラーゼの機能解析を行った。その結果、これまでのエジプト H5N1 分離株には見られないアミノ酸配列を有することを明らかにした。さらに遺伝子組み換えウイルスを作製してウイルス増殖に影響を与えるウイルスポリメラーゼの機能解析を行った結果、複製機能を低下させるアミノ酸変異 (PB1-V3D) を同定した。

以上の成果を 2 報 (論文、) の国際学術誌に発表した。両論文の筆頭著者はダマンフル大学獣医学部の Lecturer である Emad El-Din Mohamed Fouad El-Gendy 氏であり、招聘研究者として 2014-2016 年 (12 月) の 2 年間、京都府立医科大学にて研究を行った成果をまとめたものである。

組換え H5N1 ウイルスを用いたヒト上皮細胞への感染試験

H5N1 ウイルスのヒトへの感染宿主域拡大における重要な HA 遺伝子の遺伝子変異をシミュレートするために、エジプト分離株を用いてヒト呼吸器上皮細胞株に感染させた。その結果、種々の HA バリエーションが検出され、その一部はヒト細胞に多く発現しているアルファ 2-6 シアル酸レセプターへの結合性が上昇しているものの、ウイルス粒子の安定性および (個体間) 伝播性は低下していることを見出し、成果を国際学術誌 (論文) に発表した。

さらに上記成果を含むこれまでの研究成果を 1 報の Review として国際学術誌 (論文) に発表した。

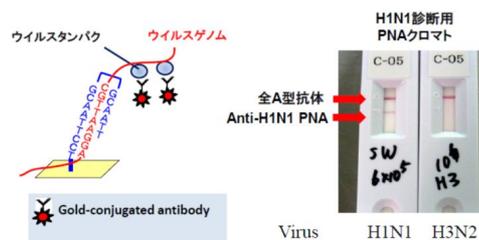
これらの共同研究体制を基に、上述した Emad EL-GENDY 氏 (ダマンフル大学・大学院生および京都府立医大・研修員 [平成 26

年 12 月 ~ 平成 28 年 12 月] および論文、 の筆頭著者) の学位審査会 (2016 年 12 月) がダマンフル大学において行われ、研究代表者が日本側 supervisor として審査に臨み、同氏の学位 (Doctoral Philosophy in Veterinary Medical Sciences) 取得を認めた。

併せて、研究代表者・連携研究者らが (引き続き開催された) ダマンフル大学・エジプト-日本 第 1 回サイエンスセミナー」に参加し、招待講演を行った。

新規ペプチド核酸をプローブとする検出系の評価

研究分担者の開発からはアゾベンゼンを搭載した新規ヘアピン型ペプチド核酸 (bisPNA-AZO) を開発した。この bisPNA-AZO をクロマトグラム上に固定化し、ヒトインフルエンザウイルスゲノムを含むライゼートを毛細管現象によって流路上に流すことで、(H1N1) ウイルスゲノムを洗浄することなく特異的に捕獲し、金コロイド修飾抗体にて迅速に可視化できることを見出した (下図)。



新規ヘアピン型ペプチド核酸 (bisPNA-AZO) を用いたヒト型 H1N1 インフルエンザウイルス検出キット (クロマトデバイス)

本研究では、新規ヘアピン型ペプチド核酸 (PNA) をプローブとしたクロマトキットを作製し、インフルエンザウイルス NA 遺伝子を標的として N1 亜型を特異的に検出する系の開発および評価を行なった。

その結果、種々の鳥インフルエンザウイルスおよびヒトインフルエンザウイルス (配列が完全一致、1 塩基または 3 塩基ミスマッチの N1 ウイルス) において、H5N1 ウイルスおよび H7N1 ウイルスが特異的に検出され、本システムの診断系としての有用性を示唆する結果となった。

一方、本研究期間中に慶應義塾大学理工学部・佐藤智典教授らとペプチド/糖鎖ライブラリーとインフルエンザウイルスとの親和性評価に関する共同研究を開始し、共同で特許出願（特願 2016-010162）を行った。

これらの成果を基に、当該共同研究は、日本医療研究開発機構（AMED）「先端計測分析技術・機器開発プログラム：研究課題名 { 中分子を活用する次世代ウイルス検出システム } 平成29年度開始」へと発展した。

5 . 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 10 件)

(を除き、全て査読有)

Watanabe Y**, Arai Y, Kawashita N, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, Kajikawa J, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Ono T, Takagi T, Takahashi K, Shioda T, Matsumoto K, Suzuki Y, Nakaya T. Characterization of H5N1 influenza virus quasispecies with adaptive hemagglutinin mutations from single-virus infections of human airway cells. *J Virol*. 2018 Mar 21. pii: JVI.02004-17. doi: 10.1128/JVI.02004-17.

Hirose R, Nakaya T**, Naito Y, Daidoji T, Watanabe Y, Yasuda H, Konishi H, Itoh Y. Viscosity is an important factor of resistance to alcohol-based disinfectants by pathogens present in mucus. *Sci Rep*. 2017 Oct 13;7(1):13186. doi: 10.1038/s41598-017-13732-2.

Daidoji T**, Watanabe Y, Arai Y, Kajikawa J, Hirose R, Nakaya T. Unique Infectious Strategy of H5N1 Avian Influenza Virus Is Governed by the Acid-Destabilized Property of Hemagglutinin. *Viral Immunol*. (Review) 2017 Jul/Aug;30(6):398-407. doi: 10.1089/vim.2017.0020.

Hirose R, Nakaya T**, Naito Y, Daidoji T, Watanabe Y, Yasuda H, Konishi H, Itoh Y. Mechanism of Human Influenza Virus RNA Persistence and Virion Survival in Feces: Mucus Protects Virions From Acid and Digestive Juices.

J Infect Dis. 2017 Jul 1;216(1):105-109.

doi: 10.1093/infdis/jix224.

Hirose R, Nakaya T, Daidoji T**. Long term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine - Author's Reply.

Clin Microbiol Infect. 2017

Apr;23(4):273-274.

doi: 10.1016/j.cmi.2016.09.020.

Elgendy EM, Arai Y, Kawashita N, Daidoji T, Takagi T, Ibrahim MS, Nakaya T**, Watanabe Y**. Identification of polymerase gene mutations that affect viral replication in H5N1 influenza viruses isolated from pigeons.

J Gen Virol. 2017 Jan;98(1):6-17.

doi: 10.1099/jgv.0.000674.

Elgendy EM, Watanabe Y**, Daidoji T, Arai Y, Ikuta K, Ibrahim MS, Nakaya T**.

Genetic characterization of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses isolated from naturally infected pigeons in Egypt.

Virus Genes. 2016 Dec;52(6):867-871.

Hirose R, Daidoji T**, Naito Y, Watanabe Y, Arai Y, Oda T, Konishi H, Yamawaki M, Itoh Y, Nakaya T. Long term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine.

Clin Microbiol Infect. 2016

Sep;22(9):813.e1-813.e7.

doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.015.

Arai Y, Kawashita N, Daidoji T, Ibrahim MS, El-Gendy EM, Takagi T, Takahashi K, Suzuki Y, Ikuta K, Nakaya T, Shioda T, Watanabe Y**. Novel Polymerase Gene Mutations for Human Adaptation in Clinical Isolates of Avian H5N1 Influenza Viruses.

PLoS Pathog. 2016 Apr 20;12(4):e1005583.

doi: 10.1371/journal.ppat.1005583

Watanabe Y, Daidoji T, Nakaya T.

Host-adaptive mechanism of H5N1 avian influenza virus hemagglutinin.

Uirusu. 2015;65(2):187-198. (Review).

Japanese.

〔学会発表〕(計 6 件)

中屋 隆明 平成 29 年度 4 大学連携研究フォーラム基調講演 演題：ウイルス感染症に対する治療・予防戦略 -インフルエンザウイルス対策を中心に- 2017 年 11 月 14 日 京都府立医科大学（京都市）

Takaaki Nakaya, Ryohei Hirose, Tomo Daidoji, Yuji Naito, Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Kaho Kawada, Jun-ichi Kajikawa, Masanaga Yamawaki, Yoshito Itoh
Mechanism of Seasonal Influenza Virus Persistence in Human Digestive Tract:

Mucus Protects Virions From Acid and Digestive Juices (口頭発表) 第 65 回日本ウイルス学会学術集会: 2017 年 10 月 24 日 ~ 26 日 (大阪市)

中屋 隆明 第 31 回インフルエンザ研究者交流の会 シンポジウム II 「鳥インフルエンザ」演題: H5N1 鳥インフルエンザウイルスの宿主適応機構 2017 年 6 月 8 日 ~ 10 日 (静岡市)

Takaaki Nakaya Egypt-Japan First Scientific Forum 招待講演: 「Metagenomics for Microbiology」2016 年 12 月 25 日 エジプト国ダマンフル大学 (エジプト国・ダマンフル市)

中屋 隆明 第 31 回中国四国ウイルス研究会: 特別講演「次世代シーケンサーを用いたウイルス学研究の発展」2016 年 7 月 9 日 ~ 7 月 10 日 鳥取大学湖山キャンパス (鳥取市)

中屋 隆明 第 64 回日本輸血細胞治療学会総会: 教育講演「高速シーケンス技術と輸血感染症検査」2016 年 4 月 28 日 ~ 4 月 30 日 京都国際会館 (京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: インフルエンザウイルス感染阻害剤、リポソーム、インフルエンザ予防・治療剤

発明者: 佐藤智典、中屋隆明

権利者: 学校法人慶應義塾・京都府公立大学法人

種類: 特許

番号: 特願 2016-010162

出願年月日: 2016 年 1 月 21 日

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.f.kpu-m.ac.jp/k/did/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA, Takaaki)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80271633

(2) 研究分担者

開発 邦宏 (KAIHATSU, Kunihiro)
大阪大学・産業科学研究所・特任准教授(常勤)
研究者番号: 70419464

(3) 連携研究者

大道寺 智 (DAIDOJI, Tomo)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 80432433

(4) 研究協力者

Madiha S. Ibrahim
エジプト・ダマンフル大学・獣医学部・教授