

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09576

研究課題名(和文)細胞エンドソーム内pH制御機構に基づいた鳥インフルエンザ感染メカニズムの解明

研究課題名(英文) Infectious mechanism of avian influenza viruses based on cellular endosomal pH

研究代表者

大道寺 智 (Daidoji, Tomo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80432433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鳥インフルエンザウイルスがヒト呼吸器上皮細胞へ感染する機序について、ウイルス側・細胞側から解析を行った。特に近年問題となっている亜型の鳥インフルエンザウイルスについて、ヒト分離株・鳥分離株の感染性の違いを比較したところ、双方の間でヒト呼吸器上皮細胞株に対する感染性の違いが見られた。またそれら感染性の違いを規定する遺伝子配列が一部明らかになった。また宿主側からの解析として呼吸器上皮細胞株を分化させ、そのウイルス感受性について評価を行なったところ、分化後の細胞株によってその感受性は異なっていた。ウイルス感受性の違いは細胞分化の状態に関係している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the mechanism of avian influenza viruses to infect human airway epithelial cells, from aspects of both the virus genome and host cells. Viral infectivity in human airway epithelial cell clones was different between currently circulating avian influenza virus isolated from humans and the virus from birds. This distinct infectivity was determined by the specific amino acid sequences, located in individual genomes of the viruses from human and birds. Next, we assessed the infectivity of avian influenza viruses in differentiated human airway epithelial cell clones. The difference in viral infectivity in differentiated human airway epithelial cell clones may be associated with the difference in cell differentiation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：鳥インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

人獣共通感染症である鳥インフルエンザウイルスは公衆衛生学上世界規模の課題である。鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染し病気を起こすメカニズムは今までウイルスレセプターの観点から説明されてきた。

鳥インフルエンザウイルスは表面蛋白ヘマグルチニン(HA)を介して鳥の呼吸器並びに腸管に発現しているガラクトースに $\alpha 2,3$ 結合したシアル酸(SA $\alpha 2,3$ Gal)を認識する一方で、近年、ヒトの呼吸器の下部にもSA $\alpha 2,3$ Galが存在することが示され、H5N1鳥インフルエンザウイルスがヒトへ感染するのはそのためだと考えられている。しかしその一方でH5N1鳥インフルエンザウイルス同様にSA $\alpha 2,3$ Galを認識可能な近縁の鳥ウイルスであってもヒトに病原性を示さないものがあるため、鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染するにはレセプターへの結合だけでは不十分であることがわかる。現在までに鳥インフルエンザウイルスの感染メカニズムに関して、レセプター特異性以外のことはほとんどわかっておらず、その感染を規定する因子としてさらなる研究が求められている。インフルエンザウイルスはレセプター結合後、細胞侵入、脱殻、核移行、ゲノム複製といった流れで、感染・増殖するが、感染成立からゲノム複製に至る過程において、未だその詳細がわかっていない部分が多く存在する。

一方で近年ではH5N1ウイルス以外の亜型のウイルスがヒトに感染する事例が多数報告されており、ヒトに感染する株としない株の感染機構の違いについて、詳細な解析が求められる。

2. 研究の目的

本研究では申請者が以前に樹立した複数のヒト呼吸器上皮細胞株を用いて、H5N1やその他近年問題となっている亜型の鳥インフルエンザウイルスにおけるヒト呼吸器上皮への感染機構を宿主側・ウイルス側から解析していくことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 上記ヒト呼吸器上皮由来細胞株に対し、近年問題となっている亜型の鳥インフルエンザウイルス(鳥分離株・ヒト分離株)を感染させ、その感染性・増殖性について評価を行った。

(2) 上記のうち、ヒト分離株のヒト呼吸器上皮細胞株への感染性の違いについて、そのメカニズムについて、鳥分離株、ヒト分離株の遺伝子比較により感染性に関わる遺伝子を同定するため、リバースジェネティクス法により変異ウイルスを作成した。

(3) ウイルスのヒト呼吸器上皮に対する病原性について感染実験でより詳細に解析す

るため、上記ヒト呼吸器上皮細胞株を用いて、気相液相界面培養法により、呼吸器上皮様に分化誘導させた。

(4) 分化誘導させた呼吸器上皮細胞株の組織学的特徴を評価するため、細胞種特異的マーカー蛋白質の染色をそれぞれ行った。

(5) 分化誘導させた呼吸器上皮細胞について鳥インフルエンザウイルスの感染実験を行い、その感染性・増殖性について評価を行った。

4. 研究成果

(1) 当教室で以前に樹立した呼吸器上皮細胞株(SAEC-T)に対し、近年問題となっている亜型の鳥インフルエンザウイルスを感染させたところ、鳥分離株とヒト分離株とは、その感染性に違いがあることがわかった。SAEC-Tに対するこれらのウイルス感染性の違いは両ウイルス株のヒトにおける病原性の違いを反映している可能性があり意義深い。また今回使用したウイルス種においてはウイルスが分離された地域・年代と感染性の間には相関はなかった。

(2) 上記(1)で得られた鳥分離株とヒト分離株のヒト呼吸器上皮細胞株への感染性の違いを明らかにするため、双方の遺伝子比較を行い、それぞれに共通して保存されている遺伝子配列を確認した。またこれらの遺伝子を有する組換えウイルスを用いた解析を行なったところ、特徴的なアミノ酸変異を持つ組換えウイルスで上皮細胞株での増殖性について、親株と比較し、変化が見られた。これらの解析により、鳥インフルエンザウイルスがヒトの呼吸器上皮細胞において感染・増殖する上で重要な遺伝子の一部が明らかになった。

(3) ウイルス病原性についてウイルス遺伝子側から解析を進める一方で、細胞側からも解析を進めた。ここでは鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器に対する病原性について、より詳細に解析するためにヒト呼吸器樹立細胞株に対し、気相液相界面培養を実施し、分化誘導を行ったところ、細胞株によっては分化誘導後に示す形態が異なることがわかった。つまり分化の様子が細胞株ごとに異なっている可能性があると考えられた。

(4) 分化誘導させた呼吸器上皮細胞株における、鳥インフルエンザウイルスの感染性・増殖性は、ウイルス株によって異なっていた。また、分化後の細胞のウイルス感受性について、通常の液体培養の際の結果と異なる感受性を示した細胞株も存在した。現在は感染性を規定している詳しい因子について解析を行っている。

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 12 件)

- 1: 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, 92. pii: e02004-17. doi: 10.1128/JVI.02004-17.
2. Hirose R, Nakaya T, Naito Y, Daidoji T, Yasuda H, Konishi H, Itoh Y. Development of a new ex vivo model for evaluation of endoscopic submucosal injection materials performance. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018, 79:219-225. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.01.002.
- 3: 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, 7:13186. doi: 10.1038/s41598-017-13732-2.
- 4: 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*. 2017, 30:398-407. doi: 10.1089/vim.2017.0020.
- 5: 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, 216:105-109. doi: 10.1093/infdis/jix224.
- 6: Hirose R, Nakaya T, Daidoji T. Long term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine - Author's Reply. *Clin Microbiol Infect*. 2017, 23:273-274. doi: 10.1016/j.cmi.2016.09.020.
- 7: 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, 98:6-17. doi: 10.1099/jgv.0.000674.
- 8: 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, 52:867-871.
- 9: 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, 22:813.e1-813.e7. doi:10.1016/j.cmi.2016.06.015.
- 10: 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, 12:e1005583. doi:10.1371/journal.ppat.1005583.
- 11: Nakamura S, Horie M, Daidoji T, Honda T, Yasugi M, Kuno A, Komori T, Okuzaki D, Narimatsu H, Nakaya T, Tomonaga K. Influenza A Virus-Induced Expression of a GalNAc Transferase, GALNT3, via MicroRNAs Is Required for Enhanced Viral Replication. *J Virol*. 2015, 90:1788-801. doi: 10.1128/JVI.02246-15.
- 12: Watanabe Y, Daidoji T, Nakaya T. Host-adaptive mechanism of H5N1 avian influenza virus hemagglutinin. *Virus*. 2015, 65:187-198. Review. Japanese.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 大道寺 智、鳥インフルエンザウイルス感染の分子メカニズムについて、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業成果報告シンポジウム(招待講演) 2018年2月23日
2. 大道寺 智、分化条件下における鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器上皮由来細胞株への感染様式について、7th Negative Strand Virus-Japan Symposium、2018年1月16日
3. Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Norihito Kawashita, Tomo Daidoji, Emad M Elgendy, Madiha S Ibrahim, Junichi Kajikawa, Hiroaki Hiramatsu, Tatsuya Takagi, Kazuo Takahashi, Tatsuo Shioda, Yasuo Suzuki, Takaaki Nakaya. Characterization of H5N1 influenza virus with HA mutations

diversified in human airway epithelial cells as minor variants, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年 10 月 25 日

4. Yasuha Arai, Norihito Kawashita, Kozue Hotta, Mai Phuong Vu Hoang, Khanh Hang Le Nguyen, Thach Co Nguyen, Cuong Duc Vuong, Mai Quynh Le, Kosuke Soda, Junichi Kajikawa, Tomo Daidoji, Takaaki Nakaya, Tatsuya Takagi, Toshihiro Ito, Futoshi Hasebe, Tatsuo Shioda, Yohei Watanabe, Novel polymerase gene mutations for human adaptation in clinical isolates of Avian H5N1 influenza virus in Asia, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年 10 月 24 日

5. Tomo Daidoji, Masafumi Noguchi, Junichi Kajikawa, Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Ryohei Hirose, Mitsuru Morimoto, Takaaki Nakaya, Evaluation of avian influenza virus infection in differentiated airway epithelial cells, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年

6. Takaaki Nakaya, Ryohei Hirose, Tomo Daidoji, Yuji Naito, Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Kaho Kawada, Jun-ichi Kajikawa, Masanaga Yamawaki, Yoshito Ito, Mechanism of Seasonal Influenza Virus Persistence in Human Digestive Tract: Mucus Protects Virions From Acid and Digestive Juices, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年 10 月 24 日

7. Tomo Daidoji, Junichi Kajikawa, Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Ryohei Hirose, Takaaki Nakaya, Avian influenza virus infection in human airway epithelial cell model, JSPS Core-to-Core Program, 2nd Scientific Seminar, August 23th, 2017

8. Tomo Daidoji, Emad M. Elgendy, Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Madiha S. Ibrahim, Kazuyoshi Ikuta, Takaaki Nakaya, "Hemagglutinin acid stability and viral infection in H7 influenza virus" "H7 インフルエンザウイルス HA 蛋白質の pH 感受性と感染性について", 第 6 4 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日

9. Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Tomo Daidoji, Emad Elgendy, Madiha Ibrahim, Kazuo Takahashi, Tatsuo Shioda, Kazuyoshi Ikuta, Yasuo Suzuki, Takaaki Nakaya, "Characterization of H5N1 influenza virus variants with HA mutations selected during the viral replication in human airway epithelial cells" "H5N1 鳥インフルエンザウイルスがヒト呼吸器上皮細胞での複製過程で獲得する HA 変異の特性", 第 6 4 回日本

ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日

10. Yasuha Arai, Norihito Kawashita, Tomo Daidoji, Madiha Ibrahim, Kazuo Takahashi, Yasuo Suzuki, Takaaki Nakaya, Tatsuo Shioda, Kazuyoshi Ikuta, Yohei Watanabe, "Novel Polymerase Gene Mutations for Human Adaptation in Clinical Isolates of Avian H5N1 Influenza Viruses" "H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスポリメラーゼ遺伝子におけるヒト適応変異の同定", 第 6 4 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日

11. Emad Elgendy, Yasuha Arai, Madiha Ibrahim, Tomo Daidoji, Kazuyoshi Ikuta, Takaaki Nakaya, Yohei Watanabe, "Identification of unique mutations that influence the polymerase activity of H5N1 avian influenza virus isolated from pigeons" "ハト由来 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの特徴的なポリメラーゼ活性に影響する変異の同定", 第 6 4 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日

12. 大道寺 智、H7 鳥インフルエンザウイルスにおける HA 蛋白質の pH 感受性について、5th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2016 年 1 月 26 日

13. Yasuha Arai, Tomo Daidoji, Madiha Ibrahim, Kazuo Takahashi, Yasuo Suzuki, Takaaki Nakaya, Tatsuo Shioda, Kazuyoshi Ikuta, Yohei Watanabe, "Identification of human adaptive mutations in the polymerase complex of H5N1 avian influenza virus in Egypt" "H5N1 鳥インフルエンザウイルスポリメラーゼ複合体における新規ヒト適応性変異の同定", 第 6 3 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 23 日

14. Shoko Nakamura, Tomo Daidoji, Tomoyuki Honda, Takaaki Nakaya, Toshihisa Komori, Keizo Tomonaga, "Dynamics of influenza A virus infection in mucin-type glycosyltransferase Galnt3-knockout mice" "ムチン型糖転移酵素 Galnt3 ノックアウトマウスを用いた A 型インフルエンザウイルス感染動態の解析", 第 6 3 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 23 日

15. Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Tomo Daidoji, Ibrahim Madiha, Elgendy Emad, Kazuo Takahashi, Yasuo Suzuki, Tatsuo Shioda, Kazuyoshi Ikuta, Takaaki Nakaya, "Genetic diversification of H5N1 avian influenza virus variants during replication in human airway epithelial cells" "H5N1 鳥インフルエンザウイルスがヒト呼吸器上皮細胞での複製過程で獲得する

遺伝子多様性"、第63回日本ウイルス学会
学術集会、2015年11月23日

16. Tomo Daidoji , Elgendy Emad M , Yohei Watanabe ,Ibrahim Madiha S ,Kazuyoshi Ikuta ,
Takaaki Nakaya 、 "Hemagglutinin acid
stability in H7 influenza virus infection
of host cells" "H7鳥インフルエンザウイル
ス感染における HA 蛋白質の pH 安定性に
ついて"、第63回日本ウイルス学会学術集
会、2015年11月22日

17. Elgendy Emad ,Ibrahim Madiha S. ,Yasuha
Arai ,Tomo Daidoji ,Yohei Watanabe ,Takaaki
Nakaya、 Genetic characterization of H5N1
avian influenza virus from pigeon in Egypt
2009、第63回日本ウイルス学会学術集会、
2015年11月22日

6. 研究組織

(1)研究代表者

大道寺 智 (DAIDOJI TOMO)

京都府立医科大学・医学研究科・感染病態
学・講師

研究者番号：80432433

(2)研究分担者

渡邊 洋平 (WATANABE YOHEI)

京都府立医科大学・医学研究科・感染病態
学・講師

研究者番号：50452462