

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08106

研究課題名(和文) 鶏の高病原性鳥インフルエンザウイルス抵抗性因子の解明に向けた研究

研究課題名(英文) Study about the chicken host factor associated with resistance to HPAIV

研究代表者

松鷲 彩 (Matsuu, Aya)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：40348595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：国産地鶏の一部がH5N8亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス(HPAIV)に対して耐性を有する可能性に着目し、ウイルス感染初期の生体におけるウイルス動態および宿主免疫応答を解析した。また鶏胎仔線維芽(CEF)細胞への感染後の発現変動遺伝子を明らかにするために、次世代シーケンス解析を行った。2種類の地鶏はH5N8亜型HPAIV感染後、72時間以内に明らかなウイルス増殖および組織反応を伴わず、またこれらの地鶏から作成したCEF細胞においてもウイルス増殖の抑制が認められた。CEF細胞における発現変動遺伝子リストを作成し、ウイルス耐性に関連すると考えられる複数の遺伝子候補が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高病原性鳥インフルエンザは畜産界において甚大な被害をもたらす重要疾病である。その制圧のために様々な研究が行われているが、宿主側の防御機構については不明な点が多い。鶏における感染制御陽性因子の特定やその機序の解明は新たな予防戦略や疾患の制圧につながるものである。地鶏におけるHPAI耐性はその研究のための有用なモデルとなる可能性がある。本研究で得られた候補遺伝子について今後さらなる研究へと発展させる予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the possibility that some of Japanese native chicken have different sensitivity to HPAIV from commercial broiler. The virus dissemination and host response in lung and brain were investigated from 4 breeds of chicken infected with H5N8 HPAIV in the early phase. Only little virus and low host response were detected from 2 breeds of Japanese native chicken. Lower virus multiplication in chicken embryo fibroblast (CEF) cells from one of the Japanese native chickens were also demonstrated. From the cells, we isolated some candidate genes by RNA-seq analysis.

研究分野：獣医学

キーワード：高病原性鳥インフルエンザ 地鶏

## 様式 C-19、F-19-1、Z-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 (HPAI) は、家禽に対して強力な病原性を有する H5 あるいは H7 亜型インフルエンザウイルスによって引き起こされる疾患である。国内では 2003 年に 79 年ぶりに発生が認められて以降、野鳥や養鶏場において流行が認められている。HPAI ウイルス (HPAIV) に感染した鶏は急激な臨床症状の悪化を示すこと、また鶏間で強い伝播性を示すことから、HPAI は畜産界において甚大な被害をもたらす重要疾病の一つである。ウイルス側の病原性決定因子については多くの研究が行われているが、宿主側の防御機構については不明な点が多い。鶏におけるウイルス感染抑制因子の特定やその機序の解明は新たな予防戦略や制圧につながるものであり、早期解明が必要である。

過去の研究において、イタリアの肉用コマーシャル鶏の一部の系統が HPAIV に対して抵抗性を示すこと<sup>1)</sup>、また 2003-2004 年の東南アジアにおける流行の際、タイ在来種鶏が高い生存率を示したこと<sup>2)</sup>が報告されている。このような抵抗性形質は鶏における HPAIV 抵抗性因子やこれを介した防御機構の解明に有用であると考えられる。申請者は以前の研究で 3 種類のタイ在来種鶏が H5N1 亜型 HPAIV に対して抵抗性を有することを感染実験によって確認した。さらにこれらの鶏の感染初期における宿主免疫応答を比較し、さらに免疫関連遺伝子多型について RT-PCR 法による解析を実施したが、HPAIV 感受性と明らかな関連性を有する遺伝子の特定には至らなかった<sup>3)</sup>。鶏における HPAIV 抑制因子特定のためには、より網羅的な解析が必要である。国内で鶏品種による HPAI 感受性を評価した研究は申請者が知る限り皆無である。申請者は複数の系統の国産肉用鶏 (コマーシャル鶏および地鶏) を用いて予備実験を行い、H5N8 亜型 HPAIV 接種後の生存性に品種間の差が存在することを確認した。このことから国産地鶏を用いてウイルス感染後の病態および感受性に関与する因子の解明に向けた研究に着手した。

### 2. 研究の目的

本研究では、HPAIV 耐性を示す鶏品種の宿主免疫応答を明らかにすることを目的として、3 種類の国産地鶏を用いて感染 72 時間以内の臓器におけるウイルスおよび宿主免疫応答を評価するとともに、鶏胎仔線維芽細胞を用いた網羅的な解析を実施した。

### 3. 研究の方法

まず 3 種類の国産地鶏 (地鶏 A、B、および C) と、コマーシャル肉用鶏に対して H5N8 亜型 HPAV (A/duck/Kagoshima/KU-70/2015) を鼻腔内接種し、24、48、72 時間後に各群 3 羽ずつ安楽殺を行った。鶏の解剖を行い、病理組織学的解析を行うとともに、臓器中ウイルス量を測定するとともに、インターフェロン (IFN) 遺伝子および IFN 誘導遺伝子 (ISG) の発現について real-time PCR 法を用いて比較した。

感染実験により特にウイルス増殖の抑制が確認された 1 品種 (地鶏 A) および SPF 白色レグホン (WL) 種由来の 10 日齢発育鶏卵から CEF 細胞を作成し、HPAIV を接種後 10 および 16 時間後に細胞を回収し、RNA を抽出した。ライブラリー作成後、次世代シーケンサーによる RNA シーケンス (RNA-seq) を行った (マクロジェン・ジャパン、東京)。150bp ペアエンドで 2,000 万リードを解析した。得られたリード配は鶏のリファレンスゲノム配列 (Gallus\_gallus-5.0、[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000002315.4/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002315.4/)) にマッピングし、転写物毎のマップされたリード数をカウントした。遺伝子長さにより TPM 法による正規化を行い、ウイルス感染前の細胞に比較した発現量 (fold-change) および Z-score を算出した。ウイルス接種前に比べて 2 倍以上に亢進あるいは減少した遺伝子群 (Z score が  $<-2$  あるいは  $>2$ ) を発現変動遺伝子 (differentially expressed genes: DEGs) として、リストを作成した。

### 4. 研究成果

感染実験によって得られた脳および肺におけるウイルス増殖を評価したところ、ブロイラーでは感染 24 時間後 ~ 72 時間後にかけて明らかなウイルスの増殖が確認された。これに対して地鶏、中 A および B においては、ウイルス遺伝子は一部の個体からわずかに検出されたのみであった (図 1)。続いて感染 72 時間後の検体を中心に組織学的な検索を実施した。4 品種計 12 羽は共通して、明らかな病変は乏しい傾向にあった。中でもブロイラーおよび地鶏 C の各 1 羽

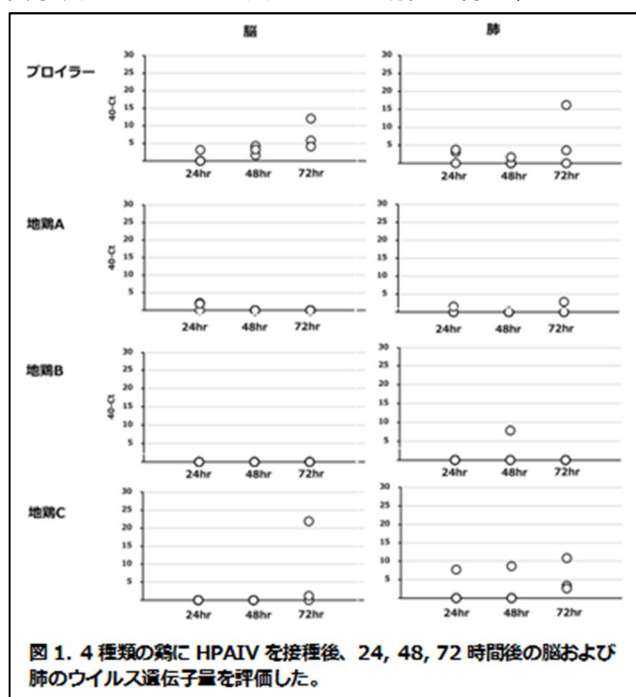
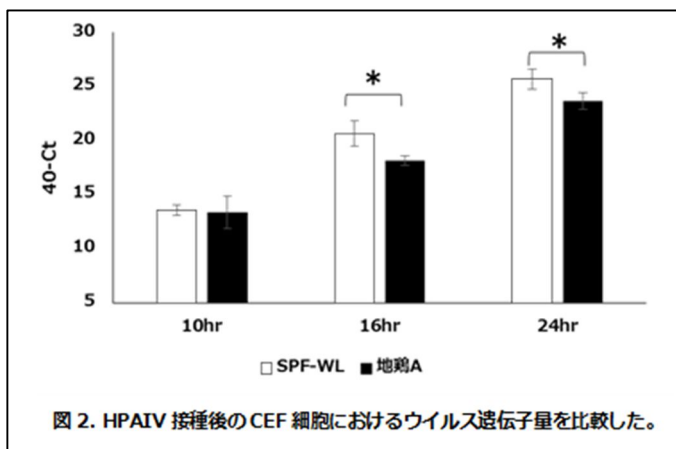


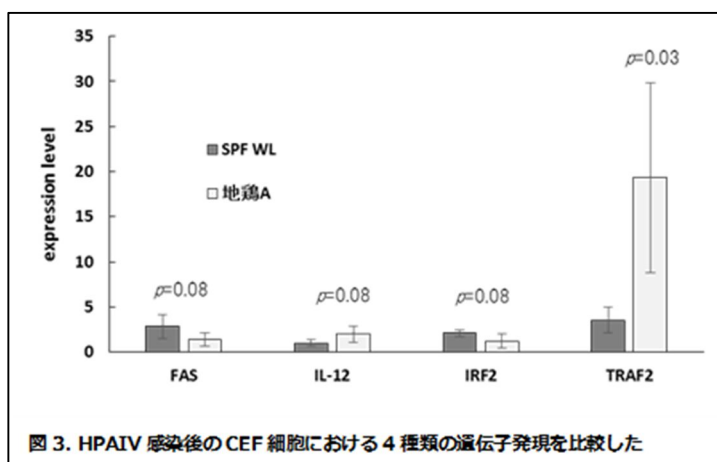
図 1. 4 種類の鶏に HPAIV を接種後、24、48、72 時間後の脳および肺のウイルス遺伝子量を評価した。

では、軽度の心筋炎および心外膜炎の所見が散見された。地鶏 A および B では、明らかな組織病変およびウイルス抗原陽性像は確認されなかった。感染 24、48、72 時間後の肺組織中の IFN $\gamma$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\alpha$ 、IFN $\lambda$ 、ISG(OAS、Mx) およびその他の IFN 関連遺伝子(IRF7、Myd88、TRIF)の発現を評価したところ、多くの項目において、プロイラーおよび地鶏 C に比べて地鶏 A および B における発現が低い傾向にあった。これらの結果から、特に地鶏 A および B は H5N8 亜型 HPAIV に対して感染が成立しにくい(抵抗性である)可能性が疑われた。



IFN や IFN 関連遺伝子の発現が低いことについては、72 時間以内の組織においてウイルス感染自体が成立していない可能性があり、感染後の宿主免疫応答を確実に評価するために in vitro 培養下でのウイルス接種を行った。

地鶏 A 由来 CEF 細胞および SPF 白色レグホン由来 CEF 細胞に対して H5N8 亜型ウイルスを接種し、6、12、24 時間後のウイルス増殖を解析した。地鶏 A 由来 CEF 細胞においてウイルス増殖は抑制傾向が認められた(図 2)。感染 24 時間後の CEF 細胞由来 RNA について実施した RNA-seq をもとに発現変動遺伝子リストを作成し、地鶏 A において発現のアップレギュレーションが 834 遺伝子、ダウンレギュレーションが 722 遺伝子で確認された。これら遺伝子群についてそれぞれ pathway 解析を行ったところ、ダウンレギュレーション群では Wnt シグナル経路、MAPK 経路における遺伝子群が含まれていた。



一方ダウンレギュレーション遺伝子群の pathway 解析では明らかな経路は得られなかったものの、IL-12 および IRF2 遺伝子発現の上昇が認められた。この結果から、新たに real-time PCR 法による鶏における IL-12、IRF2、IL1、FAS、TRAF2 遺伝子定量系を確立し、ウイルス感染 10 時間後の CEF 細胞における動態を確認したところ、RNA-seq 解析による結果とほぼ一致した傾向が認められ、特に TRAF2 遺伝子の明らかな発現上昇が確認された。

本研究では国産地鶏を用いて、HPAV 感染初期の鶏体内におけるウイルス動態および宿主免疫応答を評価するとともに、胎仔線維芽細胞へのウイルス接種後の発現変動遺伝子の評価を行った。明らかな変動を示す遺伝子候補が得られたことから、今後これらの遺伝子群の生体における発現動態について解析を勧めていく予定である。

#### 参考文献

- 1) Sironi L, Williams JL, Stella A, Minozzi G, Moreno A, Ramelli P, Han J, Weigend S, Wan J, Lombardi G, Cordioli P, Mariani P. Genomic study of the response of chicken to highly pathogenic avian influenza virus. BMC Proc. 5: Suppl 4S:25. 2011
- 2) Kalaya B, Sawat T, Neramit S, Voravit V, Voravit S, Tadayoshi M. Influence of MHC class II haplotypes on avian influenza traits in Thai indigenous chicken. J Poult Sci 43:120-125. 2006
- 3) Matsuu A, Kobayashi T, Patchimasiri T, Shiina T, Suzuki S, Chaichoune K, Ratanakorn P, Hiromoto Y, Abe H, Parchariyanon S, Saito T. Pathogenicity of Genetically Similar, H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains in Chicken and the Differences in Sensitivity among Different Chicken Breeds. PLoS One. 14;11(4):e0153649 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松鶴 彩
2. 発表標題 鹿児島県産地鶏の高病原性鳥インフルエンザウイルス感受性
3. 学会等名 平成29年度鶏病研究会鹿児島県支部技術検討会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松鶴 彩、寸田祐嗣
2. 発表標題 鹿児島県産地鶏の高病原性鳥インフルエンザウイルス感受性
3. 学会等名 平成29年度九州地区鶏病技術研修会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松鶴 彩
2. 発表標題 鹿児島県の野鳥で発生した高病原性鳥インフルエンザ と鶏の感受性
3. 学会等名 第一回鶏病研究会長崎県支部技術検討会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寸田 祐嗣  (Sunden Yuji)  (20451403)	鳥取大学・農学部・准教授    (15101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	桃井 康行  (Momoi Yasuyuki)  (40303515)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授     (17701)	