

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591166

研究課題名（和文） 重症呼吸器感染症原因ウイルスの複製機構および病原性解析

研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms involved in influenza virus replication and cytopathicity

研究代表者

中屋 隆明（NAKAYA TAKAAKI）

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：80271633

研究成果の概要：

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルス（H5N1-Flu）の感染・増殖と細胞傷害性との関係については今なお不明な点が多い。本研究では、ブタ呼吸器上皮由来の初代細胞による感染実験系を確立し、H5N1-Flu の感染試験を行った。その結果、H5N1-Flu による細胞傷害性は（カスパーゼ依存的な）アポトーシス誘導が主たるカスケードであることを見出した。さらに、ヒト呼吸器由来の初代細胞でも上記と同様な結果が確認され、同システムがヒトにおける H5N1 ウイルス（呼吸器）感染の病原性を反映する可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：(1)呼吸器感染症 (2)インフルエンザウイルス (3)H5N1 (4)アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

重症急性呼吸器症候群（SARS）の原因ウイルスである SARS コロナウイルス（SARS-CoV）

および高病原性トリインフルエンザウイルス（HPAI）は、その伝播力の強さ、致死率の高さから人類にとって最も脅威となる呼吸

器感染症である。SARS-CoV は 2003 年に起きたパンデミック（汎流行）以来これまでにヒトに対する大規模な感染は報告されていないが、ヒト以外の宿主動物における感染は現在もなお継続していることが示唆されている。HPAI は世界中で感染が拡大しており、東南アジアを中心にヒトへの致死的な感染が続いている。今後、ヒトからヒトへと高率に感染・伝播する変異型（新型）トリインフルエンザウイルスの出現が危惧されており、これらウイルスのパンデミックをより早期に発見し、制圧するためにはウイルスの感染様式・病原性に対する詳細な研究が求められている。

2. 研究の目的

本研究では重篤な呼吸器感染症を引き起こす高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスに対して、ウイルス側および宿主側因子を各々操作することにより、複雑なウイルス病原性（Pathogenesis）のメカニズムを明らかにすることが目的である。そのために、ウイルス遺伝子型の操作系としてウイルスの再構成（リバーシジェネティクス）システムを活用し、一方で標的となる呼吸器の初代上皮細胞を用い、より生体に近い *in vitro* 感染系を創出し、上気道から肺深部までの各組織におけるウイルス感染様式を再現・評価する。特にウイルスの病原因子として糖タンパク質の細胞質内輸送から子孫ウイルス粒子の産生に至る過程に焦点を当て、タンパク質の品質管理機構、糖鎖修飾およびウイルス粒子の細胞膜下での自己形成から細胞外放出を指標とする評価システムを確立する。これらの基礎研究を通してウイルス糖タンパク質の病原性への関与を明らかにし、新たな治療法開発への手がかりを作る。加えて、各ウイルス糖

タンパク質を、ヒトへの利用可能なニューカッスル病ウイルス由来のワクチンベクターに組み込み、より安全かつ効果的な高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するワクチン開発へと発展させる基盤作りをする。

3. 研究の方法

（1）呼吸器上皮初代細胞を用いた感染試験

初年度は各組織由来の細胞に H5N1 ウイルスおよび毒性の低い H5N2, H5N3（1978, 1980 年に香港の家禽で集団発生が見られた）などの近縁の H5 亜型トリインフルエンザを感染させ、その共通点・相違点を明らかにする。また”ヒト由来”高病原性 H5N1 の遺伝子をもつ組換え H5N1 ウイルスを作製し、その感染様式について比較検討する。次年度ではこれらの研究を継続、発展させ、上述した各組織での異なる感受性、あるいは細胞傷害性の分子機構を前項の「ウイルス糖タンパク質のメンブレントラフィック・粒子形成機構の解析」で得られた（得られる）知見を基に解析し、より生体内呼吸器の感染形態に近づけた研究を展開する予定である。

（2）ウイルス糖タンパク質のメンブレントラフィック・粒子形成機構の解析

本研究では糖タンパク質であるヘマグルチニン（HA）タンパク質の翻訳後修飾から粒子形成過程に焦点を絞り、細胞質内輸送機構と細胞に与える影響（傷害性）について検討する。具体的には以下のことを計画している。（平成 19 年度）

① H5N1 ウイルス感染における HA タンパク質の小胞体／トランスゴルジ体（ER/TGN）トラフィックの解析：申請者らは H5N1-HA タンパク質に対するモノクローナル抗体を既

に作製している。この抗体を用いて HA タンパク質の感染細胞における動態（膜輸送）を共焦点レーザー顕微鏡にて解析する。

② HA タンパク質の ER ストレス誘導機構：我々はこれまでにインフルエンザウイルス感染により ER ストレスマーカーである XBP1mRNA のスプライシングが誘導されることを見出している。ER 内での HA タンパク質のホールディング（折りたたみ）過程が ER ストレスの誘導となることから、HA タンパク質輸送と ER ストレス誘導との関連について検討する。

（平成 20 年度）

③ 翌年度は初年度の研究を継続、発展させる。特にヒトより分離された H5N1 ウイルスの HA 遺伝子をもつ組換えウイルスをリバースジェネティクス法にて作製し、これらヒト型 H5N1 とトリ由来 H5N1 のメンブレントラフィックおよび ER ストレス誘導能について比較する。

4. 研究成果

（1）哺乳動物における H5N1 ヘマグルチニンタンパク質（HA）による呼吸器上皮の細胞死誘導機構

これまでにヒトにおけるウイルス（呼吸器）感染の *in vitro* モデルとして、大量の細胞調製が可能なブタ気管上皮由来の初代細胞による有用性の高い感染実験系を確立し、そのシステムを用いて以下の知見を得た。

① 高病原性株 H5N1 ウイルスは細胞に強い傷害性を誘導するが、H5N2, H5N3 ウイルスでは感染細胞内で H5N1 ウイルスと同程度の増殖をするものの、細胞に与える傷害性は極めて低かった。

② H5N1 による細胞傷害性はカスパーゼ（3, 8, 9）依存的なアポトーシス誘導が主たるカスケードであることを見出した。

③ そのウイルス側要因として外被糖タンパク質の HA タンパク質が重要な働きをしていることを明らかにした。

④ ヒト呼吸器由来の初代細胞でも上記と同様な結果が確認され、我々の実験システムがヒトにおける病原性を反映する可能性が示唆された。

in vitro 感染試験で汎用されている不死化細胞では、上記のような H5N1 と H5N2/H5N2 間での細胞傷害性の差異は見られず、初代培養細胞を用いることが、*in vivo* におけるウイルス病原性をより正確に反映できることが示唆された。さらにこの感染系を用いて H5N1 ウイルスの細胞傷害機構について新たなウイルス側因子、および細胞側因子を明らかにしたことが本研究の特色であり、これらの結果をもとに、論文発表を行った (Daidoji T., Nakaya T. et al. *JVI*, 2008)。

（2）野鳥（カモ・アヒル）における H5N1-HA タンパク質による細胞死誘導機構

カモなどの野鳥ではニワトリなどの家禽とは異なり、H5 ウイルスであっても致死的な感染症を引き起こさないことが知られている。本研究ではカモのモデルとしてアヒル（家鴨）および対照としてニワトリ由来の胎児線維芽細胞を用いて H5 ウイルスに対する細胞傷害性について検討した。現在までに得られた結果を以下に示した。

① ニワトリ胎児由来線維芽細胞（CEF）では H5N1, H5N2 および H5N3 は同程度の強い細胞傷害性を示した。一方、アヒル胎児由来線維芽細胞（DEF）において、H5N1 ウイルスは

DEF に対し CEF と同程度の強い傷害性を誘導するが、H5N2, H5N3 ウイルスでは感染細胞内で H5N1 ウイルスと同程度の増殖をするものの、細胞に与える傷害性は低かった。

② H5N1 感染による細胞傷害はアポトーシスによるものであり、ウイルス側要因として HA が重要な働きをしていることを見出したが、アポトーシスはカスパーゼ非依存的なカスケードが主流であり、この点は哺乳動物由来呼吸器上皮細胞における細胞傷害性メカニズムとは異なっていることが示唆された。

③ アポトーシス誘導メカニズムとして、小胞体における H5N1-HA タンパク質の unfolding による小胞体ストレスの上昇および/あるいはミトコンドリアの膜電位の変化によるカルシウム流入が関与することが示唆され、インフルエンザウイルスの細胞傷害性 (アポトーシス誘導) の新たな分子メカニズムが示唆された。

致死的な感染を起こさないこれまでの H5 ウイルスと異なり、野鳥、哺乳動物において高病原性である現在の Asian-H5N1 はアヒルおよびブタ/ヒト由来の初代細胞に対してアポトーシスを誘導し、そのウイルス側因子として HA タンパク質が重要であることがこれらの研究を通して明らかとなった。

(3) 診断・治療法への応用

これまでに H5N1 ウイルスに対するマウスモノクローナル抗体 (MAb) を作製した。そのうち抗 HA 抗体 (4 種) は H5N1 ウイルスに対して感染阻害能 (中和抗体) を有しており、別の抗 HA 抗体 1 種は現在 (2008 年) 流行している Asian-H5N1 ウイルスの 97%以上 (データベース登録約 2000 株を対象) を検出することが示唆された (Du A., Nakaya T. et al. *BBRC*, 2009)。

そこで、これらの MAb を使い、診断法・治療法の開発を試み、本抗体を用いた簡易診断キットを開発 (企業との共同研究) に成功した。このキットを用いることにより、Asian-H5N1 ウイルスを選択的に検出する簡易診断に寄与することが期待できる。

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 9 件)

* : Corresponding Author、全て査読有

1. Nakamura S, Yang C-S, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, *Nakaya T (2009) *PLoS ONE*. 4(1):e4219. Epub 2009 Jan 19.
Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach.
2. Du A, Daidoji T, Koma T, Ibrahim M-S, Nakamura S, de Silva U-C, Ueda M, Yang C-S, Yasunaga T, *Ikuta K, Nakaya T (2009) *Biochem Biophys Res Commun*. 378(2):197-202. Epub 2008 Nov 14. [Epub ahead of print]
Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody.
3. Daidoji T, Koma T, Du A, Yang C-S, Ueda M, Ikuta K, *Nakaya T (2008) *J Virol*. 82(22): 11294-307.

- H5N1 avian influenza virus induces apoptotic cell death in mammalian airway epithelial cells.
4. Nakamura S, Maeda N, Miron I-M, Yoh M, Izutsu K, Kataoka C, Honda T, Yasunaga T, Nakaya T, Kawai J, Hayashizaki Y, Horii T, * Iida T. (2008) *Emerg Infect Dis.* 14(11): 1784-86.
Metagenomic diagnosis of bacterial infections.
 5. Ueda M, Yamate M, Du A, Daidoji T, Okuno Y, Ikuta K, * Nakaya T (2008) *Virus Res.* 136(1-2):91-7.
Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus.
 6. Mori S, Miyake S, Kobe T, Nakaya T, Fuller S-D, Kato N and * Kaihatsu K. (2008) *Bioorg Med Chem Lett.* 18(14):4249-52.
Enhanced anti-influenza A virus activity of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate fatty acid monoester derivatives: Effect of alkyl chain length.
 7. Li Y-G, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Rungrojcharoenkit K, Li G-M, Nakaya T, Auwanit W, * Ikuta K, Sawanpanyalert P. (2008) *Biochem Biophys Res Commun.* 371(3):484-9.
Higher in vitro susceptibility of human T cells to H5N1 than H1N1 influenza viruses.
 8. Li S-M, Li G-M, Nakamura S, Ikuta K, and * Nakaya T. (2008) *Jpn J Infect Dis.* 61(2):123-7.
Reduced incorporation of SARS-CoV spike protein into viral particles due to amino acid substitutions within the receptor binding domain.
 9. *Hagiwara K, Kadosawa T, and Nakaya T. (2008) *The Open Veterinary Science Journal.* 2: 11-5.
Tumoricidal effect of recombinant Newcastle disease virus.
- [学会発表] (計 10 件)
全て口頭発表
- 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会
2008 年 12 月 11 日
神戸国際会議場
1. 大道寺智、中屋隆明、他
高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 は哺乳動物呼吸器上皮細胞に対してアポトーシスを誘導する
- 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会
2008 年 10 月 26～28 日
岡山コンベンションセンター
2. 中屋隆明、他
次世代型シーケンサーを用いた臨床検体からの網羅的なウイルスゲノム検出
 3. 森修一、中屋隆明、他
茶成分エピガロカテキンガレートの化学修飾による抗インフルエンザウイルス活性の向上とその作用機序解明
 4. 上田真世、中屋隆明、他
鳥インフルエンザウイルス感染時のニワトリ・アヒル線維芽細胞における細胞死誘導機構の比較解析
 5. 大道寺智、中屋隆明、他
高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 の細胞傷害メカニズムの検討
 6. 第 4 回日中鳥インフルエンザウイルスシンポジウム
2008 年 4 月 28～30 日
中国 CDC、北京 (中国)
中屋隆明、他
Avian H5N1 influenza virus induces apoptotic cell death in mammalian airway epithelial cells
- 第 55 回 日本ウイルス学会学術集会
2007 年 10 月 21～23 日

札幌コンベンションセンター

7. 中屋隆明、他

454 システムを用いたウイルスゲノムの網羅的解析

8. 上田真世、中屋隆明、他

インフルエンザウイルス感染細胞の小胞体におけるウイルス膜タンパク質の折りたたみ・成熟速度がウイルス粒子産生量に影響を与える

9. 李樹明、中屋隆明、他

Genomic deletion and insertion of SARS-CoV by structure-dependent RNA recombination

10. 第3回日中鳥インフルエンザウイルスシンポジウム

2007年1月9～11日

ハルビン獣医研究所、ハルビン（中国）

中屋隆明

Influenza A virus infection in airway epithelial cells

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2件）

特願2009-59544号（出願日2009年3月12日）

名称：高病原性トリインフルエンザH5N1亜型ウイルスの検出キット

発明者：中屋隆明、ドウ アナリワ、芝井勇亮、伊藤大輔、岩本久彦

出願人：国立大学法人大阪大学、田中貴金属工業株式会社

特開2008-104450号（公開日2008年5月8日）

特願2007-174587号（特願2006-267962号に基づく優先権主張を伴う出願）

名称：高病原性トリインフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体

発明者：中屋隆明、ドウ アナリワ、生田和良

出願人：国立大学法人大阪大学、財団法人大阪産業振興機構

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA TAKAAKI)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：80271633

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者