

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890006

研究課題名（和文） 鳥インフルエンザウイルスのヒトへの伝播能獲得のメカニズムの解明

研究課題名（英文） Study on the mechanism of the ability of interspecies transmission of avian influenza virus to humans

研究代表者

岡松 正敏 (OKAMATSU MASATOSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：00507163

研究成果の概要（和文）：

糖鎖レセプターを認識するレクチンSNAおよびMAAを用いて、鳥インフルエンザウイルスの宿主であるニワトリおよびアイガモのレセプター分布を調べた。その結果、鳥類でもヒト型および鳥型のレセプターが混在していることが明らかとなった。ヒトのサンプルを用いたレクチン染色は、ヒト型のみが確認された。ヒトのシアル酸転移酵素（ST）の遺伝子解析から、調べた6種の鳥型のST3分子が発現しており、呼吸器上皮細胞での発現調節が行われていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We studied the distribution of sialic acid receptors of influenza virus in chicken and duck organs by means of lectin histochemistry. Human (Sia alpha2-6Gal) and avian virus receptors (Sia alpha2-3Gal) were identified with Sambucus Nigra (SNA) and Maackia amurensis (MAA) lectins respectively. By lectin histochemistry we found moderate to abundant expression of the human-like virus receptors in the organs as well as binding of the lectins that identify avian-like receptors. In human cells, alpha2-3 sialyltransferase (ST3) was expressed but not the avian virus receptor was existed. It is suggested that enzyme activity of ST3 was regulated in human respiratory epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：鳥インフルエンザウイルス、レセプター特異性、宿主、伝播、シアル酸

1. 研究開始当初の背景

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) の感染は、2003 年以降アジアからロシア、中近東、ヨーロッパ、さらにはアフリカの 61 カ国に拡大している。本ウイルスは 4 年間で 380 人に感染し、約 6 割を死亡させていることから、ヒトでの伝播能を獲得して、パンデミックを起こすことが危惧されている。ヒト間の伝播が 4 カ国で確認されたが、すべて親子や兄弟等の血縁者間での感染であり、夫婦間の感染は認められていない。さらに、HPAIV に感染した患者から分離されたウイルスヘマグルチニン (HA) のレセプター結合部位のアミノ酸配列はすべて鳥型レセプターを認識する Gln-Ser-Gly であった。(Matrosovich ら、1999、Yamada ら、2006)。以上の事実はヒトにおける本ウイルスの感染には遺伝的背景があることを示唆している。

インフルエンザウイルスは、その HA が宿主細胞表面のシアル酸を末端に持つ糖鎖をレセプターとして認識し、吸着して感染を開始する (Rogers and Paulson, 1983)。HA のレセプター認識はウイルスが分離された宿主動物によって異なり、ヒトのインフルエンザウイルスはシアル酸がガラクトースに α 2,6 結合した SA α 2,6Gal (以下 α 2,6) を認識する。一方、鳥のウイルスは α 2,3 結合の SA α 2,3Gal (以下 α 2,3) を認識する。これらのレセプター特異性は HA 分子頭部のレセプター結合部位のアミノ酸 (H3HA では 226-228 番目、H5HA では 222-224 番目) 配列が、Gln-Ser-Gly か Leu-Ser-Ser かによって決定される。

ヒトの上部気道粘膜上皮細胞には α 2,6 レセプターが優勢に存在し、 α 2,3 レセプターは検出されない (Couceiro ら、1993)。また、カモの腸管粘膜上皮細胞には α 2,3 レセプターのみが検出される (Ito ら、1998)。

2. 研究の目的

本研究は、H5N1HPAIV に感染したヒトの上部呼吸器上皮細胞に鳥型のシアル酸レセプターが存在するか否かを明らかにすることを目的とする。H5N1HPAIV に対する結合能を有する α 2,3 レセプターが、ヒトの呼吸器上皮細胞に発現しているか否かを明らかにするため、

(1) ヒトの呼吸器上皮細胞に、 α 2,3 レセプターが発現しているか否かを明らかにする。

(2) ヒトの呼吸器上皮細胞の糖鎖レセプター発現を担うシアル酸転移酵素 (ST) 遺伝子を同定し、感染耐過したヒトと健常者のそれを

比較解析する。

3. 研究の方法

(1) レクチンである SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) は α 2,6 を認識し、MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) は α 2,3 を認識する。ヒトの咽頭スワブ (拭い液) 材料を、蛍光標識したレクチンでスワブ中の細胞を染色し、呼吸器上皮細胞に発現するウイルスレセプターが α 2,3 か α 2,6 か、判定する手法を確立する。

(2) 糖鎖の修飾は生理的状況に応じて、組織特異的に変化していると考えられる。糖鎖にシアル酸を付加するシアル酸転移酵素 (ST) はその基質特異性から少なくとも 20 種以上の異なったシアル酸転移酵素が存在するとされている。呼吸器上皮細胞から mRNA を抽出し、シーケンス解析により糖鎖レセプターの発現にかかわる分子種を明らかにする。さらに、同定された mRNA をリアルタイム PCR を用いて定量的に解析し、糖鎖レセプターの発現量との相関を解析する。さらに、ヒトゲノム情報のデータベースを利用するとともに、国内のヒトのサンプルを用いて、ST 遺伝子に変異があるか、多形は存在するか否か解析し、遺伝子学的な糖鎖レセプターの型別法を確立する。

4. 研究成果

(1) 鳥インフルエンザウイルスの宿主である鳥類、つまりニワトリおよびアイガモの呼吸器および腸管に発現する糖鎖レセプターを SNA および MAA レクチンにより染色した。その結果、鳥類でもヒト型および鳥型のレセプターが混在していることが明らかとなった。さらに、動物の週齢、系統によっても若干の分布の差異が認められたため、これら鳥類におけるウイルス増殖と、レセプター分布の相関を調べる必要があることがわかった (図 1)。同様に、ヒトのサンプルを用いたレクチン染色を試みたが、部分的に確認され、

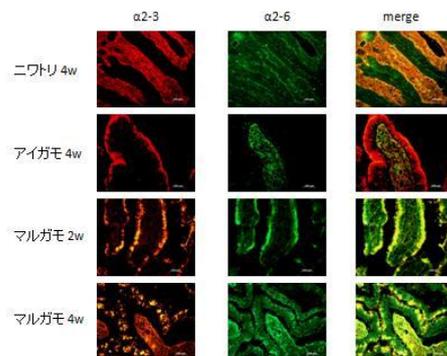


図1 鳥類の腸管におけるレセプター分布

α 2-6 のヒト型が確認された。しかしながら、検出感度が悪く、生体からのサンプリングはバイオプシーなどある程度の細胞量が必要であることがわかった。

(2) ヒトでの糖鎖レセプター発現を担うシアル酸転移酵素 (ST) の遺伝子の分子種の同定およびシークエンス解析を実施した。鳥インフルエンザウイルスの結合する糖鎖レセプターに関わる分子である ST3 には複数の分子種があることが知られているが、ヒト由来細胞から mRNA を抽出し、解析を行ったところ、調べた 6 種の ST3 分子すべてが発現していることが明らかとなった。

以上の成績から、鳥型レセプターを発現する ST3 はヒトで発現しているものの、呼吸器上皮細胞での発現はほとんどしていないことが明らかとなった。HPAIV に感染した人の呼吸上皮細胞ではこの発現調節機構が異なり、鳥型レセプターが発現している可能性が考えられた。

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 13 件)

(1) Feng F, Miura N et al., 7 名中 5 番目. Novel trivalent anti-influenza reagent. *Bioorg Med Chem Lett*, 査読有, *in press*, 2010

(2) Itoh Y, Shinya K et al., 50 名中 30 番目. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*, 査読有, 460. 1021-1025. 2009

(3) Kashima Y, Ikeda M et al., 17 名中 11 番目. Intranasal administration of a live non-pathogenic avian H5N1 influenza virus from a virus library confers protective immunity against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in mice: comparison of formulations and administration routes of vaccines. *Vaccine*, 査読有, 27. 7402-7408. 2009

(4) Manzoor R, Sakoda Y et al., 7 名中 6 番目. PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs. *J Virol*, 査読有, 83. 1572-1578. 2009

(5) Saito T, Watanabe C et al., 12 名中 8

番目. Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza viruses of H5N1 subtype isolated in Thailand for different poultry species. *Vet Microbiol*, 査読有, 133. 65-74. 2009

(6) Sasaki T, Kokumai N et al., 9 名中 7 番目. Long lasting immunity in chickens induced by a single shot of influenza vaccine prepared from inactivated non-pathogenic H5N1 virus particles against challenge with a highly pathogenic avian influenza virus. *Vaccine*, 査読有, 27. 5174-5177. 2009

(7) Tsukamoto K, Ashizawa T et al., 8 名中 7 番目. Use of reverse transcriptase PCR to subtype N1 to N9 neuraminidase genes of avian influenza viruses. *J Clin Microbiol*, 査読有, 47. 2301-2303. 2009

(8) Okamoto M, Sakoda Y, Kishida N, Isoda N, Kida H. Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses. *Arch Virol*, 査読有, 153. 2189-2195. 2008

(9) Saito T, Uchida Y et al., 13 名中 8 番目. Characterisation of highly pathogenic avian influenza viruses in Myanmar. *Vet Rec*, 査読有, 163. 722-723. 2008

(10) Tsukamoto K, Ashizawa H et al., 8 名中 6 番目. Subtyping of avian influenza viruses H1 to H15 on the basis of hemagglutinin genes by PCR assay and molecular determination of pathogenic potential. *J Clin Microbiol*, 査読有, 46. 3048-3055. 2008

(11) Uchida Y, Chaichoune K et al., 14 名中 9 番目. Molecular epidemiological analysis of highly pathogenic avian influenza H5N1 subtype isolated from poultry and wild bird in Thailand. *Virus Res*, 査読有, 138. 70-80. 2008

(12) Yamamoto Y, Nakamura K et al., 6 名中 3 番目. Detecting avian influenza virus (H5N1) in domestic duck feathers. *Emerg Infect Dis*, 査読有, 14. 1671-1672. 2008

(13) Yamamoto Y, Nakamura K et al., 6 名中 3 番目. Avian influenza virus (H5N1) replication in feathers of domestic waterfowl. *Emerg Infect Dis*, 査読有, 14. 149-151. 2008

〔学会発表〕(計7件)

(1) 岡松正敏ら、豚由来 H1N1 パンデミックインフルエンザウイルスワクチン候補株の選抜、第149回日本獣医学会学術集会、2010年3月26日、日本獣医生命科学大学、東京

(2) 岡松正敏、A/2009 (H1N1) インフルエンザウイルスに対するワクチン候補株の選抜、2009年10月27日、都市センターホテル、東京

(3) 岡松正敏、高病原性鳥インフルエンザワクチンの開発、第13回日本ワクチン学会学術集会、2009年9月27日、ロイトン札幌、札幌

(4) 岡松正敏ら、2008年北海道で発見された斃死オオハクチョウから分離した H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状、第146回日本獣医学会学術集会、2008年9月25日、ワールドコンベンションセンター・サミット、宮崎

(5) 曾田公輔ら、鳥インフルエンザウイルスの病原性獲得メカニズムの解析、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月27日、岡山コンベンションセンター、岡山

(6) 梶原将大ら、インフルエンザウイルスのカモに対する病原性の分子基盤の解析、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月27日、岡山コンベンションセンター、岡山

(7) 岡松正敏ら、2008年北海道で分離された斃死オオハクチョウから分離した H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月27日、岡山コンベンションセンター、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡松 正敏 (OKAMATSU MASATOSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：00507163

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし