

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08854

研究課題名（和文）H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的感染機構の解明

研究課題名（英文）Sialic acid-independent infection mechanism of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses

研究代表者

梶原 直樹（KAJIWARA, Naoki）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：70453917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、シアル酸を介さない新規感染経路を有する。しかしながら、その分子機構には不明な点が多く残されている。本研究において、我々は、シアル酸非依存的な感染がH5亜型のヘマグルチニンに対する抗体処置によって阻害できることを見出した。また、中和抗体の抗原決定基の解析や変異型の鳥インフルエンザウイルスを用いた感染実験を通じて、シアル酸非依存的な感染における重要なアミノ酸を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトに対しても非常に高い致死率を示す高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な感染におけるウイルス因子を特定した本研究成果は、ウイルスの宿主適応性の理解を深める点で学術的に大きな意義がある。また、本研究成果を基盤とした感染阻害薬の開発を通じて医療に貢献するとともに、感染対策を講ずることにより社会的混乱や経済的損失の防止といった社会的な意義が期待される。

研究成果の概要（英文）：H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses can infect the cells via a novel sialic acid-independent route. However, the details of the molecular mechanism remain unclear. In this study, we found that the treatments of antibodies against haemagglutinin of the H5-subtype inhibit the sialic acid-independent infection. In addition, through the epitope analyses of neutralizing antibodies and several experiments with mutant avian influenza viruses, we identified the critical amino acids in the sialic acid-independent infection of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses.

研究分野：感染症学

キーワード：インフルエンザウイルス H5 ヘマグルチニン シアル酸 中和抗体 高病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1997年に香港で初めてヒトへの感染が報告されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1 HPAIV)は世界60か国以上に伝播しており、感染者の半数以上が死亡している。2005年には、抗インフルエンザ薬のタミフルに対する耐性株が確認されており、新薬のアビガンやゾフルーザの臨床効果は未知数であるため、新しい感染阻害薬の開発が切望される。H5N1 HPAIVの世界的大流行によって深刻な健康被害や社会の混乱が危惧されるものの、鳥由来のウイルスがヒトへ感染する機序は未だ十分に解明されていない。

鳥を宿主とするH5N1 HPAIVがヒトに感染する機序は、「シアル酸への結合特異性」によって説明されてきた。インフルエンザウイルスは細胞表面のシアル酸を末端に持つ糖鎖を受容体とするが、鳥およびヒト由来のウイルスでは認識するシアル酸とガラクトースの結合様式が異なるため、通常、ヒトへの感染は成立しない。しかしながら、感染した鳥との濃厚接触などによりウイルスがヒトの下気道や肺胞に到達した場合には、それらの組織に発現する鳥型のシアル酸を介して感染が成立すると考えられてきた。一方で、H5N1 HPAIVは、シアル酸を除去したヒト気道上皮細胞や鳥型のシアル酸を発現していない鼻咽頭などのヒト上気道組織に感染可能であることが報告された。このことは、H5N1 HPAIVの感染性を「シアル酸への結合特異性」のみで論じることが困難であることを示している。

我々は、H5N1 HPAIVのヒトへの感染性獲得の分子機構について、「シアル酸への結合特異性」とは別の視点から研究するため、シアル酸合成の律速酵素であるCytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetaseを欠失したヒト培養細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いてH5N1亜型のインフルエンザウイルスの感染能を評価したところ、臨床分離株であるA/Vietnam/UT3040/2004はシアル酸欠損細胞にも感染可能であった。また、A/Vietnam/UT3040/2004のシアル酸非依存的な感染がH5亜型のヘマグルチニン(HA)に対する抗体処置によって阻害された。これら抗H5 HA抗体のエピトープ解析を進め、候補領域を見出している。本研究では、抗H5 HA抗体のエピトープ情報を手がかりとして、シアル酸非依存的な感染経路の分子機構を解明するための基礎的研究を集中的に遂行する。

2. 研究の目的

本研究は、H5N1 HPAIVのシアル酸非依存的な感染の分子機構を解明し、抗H5 HA抗体をH5亜型のインフルエンザの感染阻害薬として臨床応用するための基盤を確立することを目的とする。具体的には、抗H5 HA抗体、HAタンパク質発現系、組換えインフルエンザウイルスなどを駆使して、シアル酸を介さない新規感染経路におけるウイルス側の因子を明らかにし、H5N1 HPAIVの感染性の理解を深める。

3. 研究の方法

H5N1 HPAIVのシアル酸非依存的な感染におけるウイルス因子を特定するため、以下の2点を具体的な達成目標とする。

(1) HAタンパク質発現系による抗H5 HA抗体のエピトープの決定

HAタンパク質に対する抗体の反応性とHAのアミノ酸配列の比較解析結果をもとに、A/Vietnam/UT3040/2004のHAおよび各種変異体の発現ベクターを作製し、293T細胞にHAタンパク質を発現させる。フローサイトメトリーやWestern blotにより抗体の反応性を評価し、抗H5 HA抗体のエピトープを決定する。

(2) 組換えインフルエンザウイルスを用いたHAの機能ドメインの特定

決定した抗体のエピトープに着目し、A/Vietnam/UT3040/2004とシアル酸非依存的な感染経路を持たないA/duck/Hokkaido/Vac-3/2007間でHAのアミノ酸配列を比較する。その解析結果をもとに各種変異ベクターを構築し、リバースジェネティクス法により組換えインフルエンザウイルスを作出する。免疫染色などを用いて、シアル酸欠損細胞への感染能を評価することで、シアル酸非依存的な感染に重要なアミノ酸を特定する。

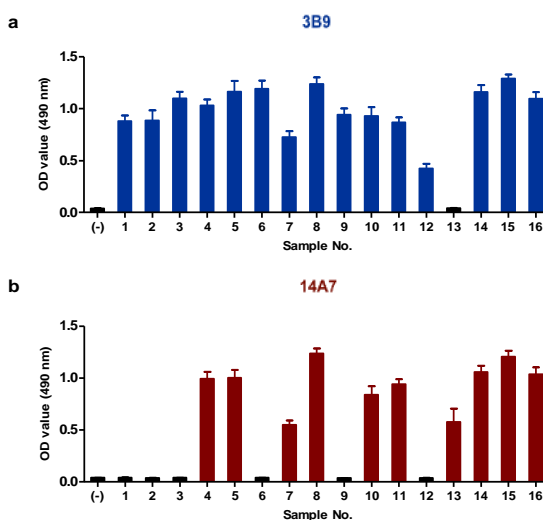
4. 研究成果

(1) HA タンパク質発現系による抗 H5 HA 抗体のエピトープの決定

3種類の抗 H5 HA 抗体(3B9、8C1、14A7)のエピトープを明らかにするため、化学合成ペプチドに対する反応性を ELISA にて検討したが、3B9 はいずれの HA ペプチドにも結合しなかった。また 8C1 および 14A7 も、3B9 と同様に、合成 HA ペプチドに対する反応性を示さなかった。これらのことから、3種類の抗 H5 HA 抗体は、HA の立体構造や修飾された糖鎖を認識している可能性が示唆された。

次に、組換え HA タンパク質に対する反応性を評価したところ、3B9 は H5 亜型の組換え HA タンパク質を幅広く認識したのに対して、8C1 と 14A7 はある種の組換え HA タンパク質と選択的に反応した(図1)。組換えタンパク質に対する抗体反応性とアミノ酸配列の比較解析によって、3種類の抗 H5 HA 抗体のエピトープ候補領域を抽出した。

A/Vietnam/UT3040/2004 由来の HA およびエピトープ候補部位に変異を導入した HA 発現ベクターを作製し、遺伝子導入により 293T 細胞に各種 HA タンパク質を発現させた。フローサイトメーターを用いて、抗 H5 HA 抗体の反応性を検討し、3種類の抗 H5 HA 抗体のエピトープを決定した。また、各種 HA タンパク質を発現した 293T 細胞のライセートを調製し、Western blot により抗 H5 HA 抗体の反応性を検討した結果、3B9 および 14A7 は HA タンパク質の立体構造や糖鎖修飾部位を認識していることが明らかになった。

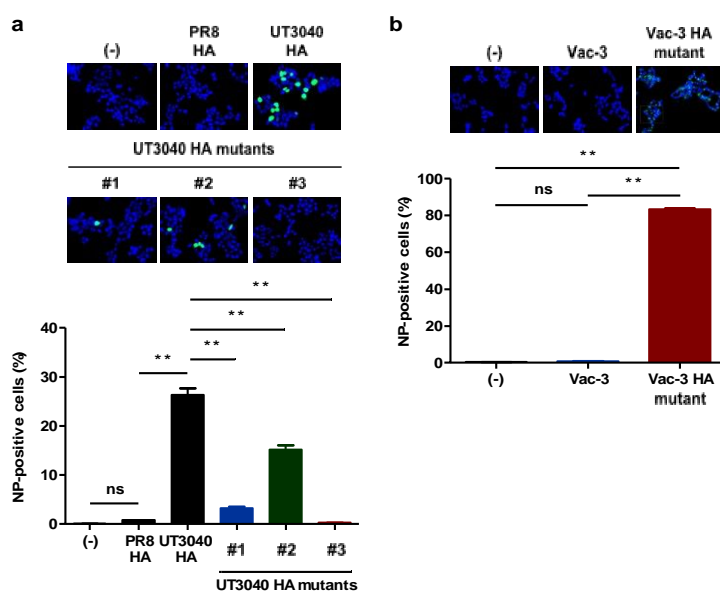


(2) 組換えインフルエンザウイルスを用いた HA の機能ドメインの特定

抗 H5 HA 抗体のエピトープの機能的な重要性を明らかにするため、各種ベクターを構築し、293T 細胞と MDCK 細胞を用いて、リバースジェネティクス法による組換えインフルエンザウイルスの作出を行った。培養上清中に産生されたウイルスを MDCK 細胞に再感染させた後に回収し、ウイルス力価をプラークアッセイにより定量した。

次に、免疫細胞染色とフローサイトメトリーを用いて、親株またはシアル酸欠損細胞株に対する組換えインフルエンザウイルスの感染能を評価した。その結果、抗 H5 HA 抗体(3B9 および 14A7)のエピトープにアミノ酸変異を導入した組換えインフルエンザウイルスでは、シアル酸欠損細胞への感染能が顕著に低下した。

3B9 および 14A7 処置下においても感染が可能な A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 のエスケープ変異株を MDCK 細胞で増やし、プラークアッセイにてウイルス力価を測定した。A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 の親株はシアル酸欠損細胞に感染できなかったが、エスケープ変異株ではシアル酸欠損細胞表面への吸着が確認できた。これらの研究結果は、シアル酸非依存的な感染における HA タンパク質の重要なアミノ酸を示唆している。



本研究成果は、H5N1 HPAIV のヒトへの感染性獲得機構の理解に貢献し、感染阻害薬開発のための基盤となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kajiwara Naoki, Nomura Namiko, Ukaji Masako, Yamamoto Naoki, Kohara Michinori, Yasui Fumihiko, Sakoda Yoshihiro, Kida Hiroshi, Shibasaki Futoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell-penetrating peptide-mediated cell entry of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74604-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原 直樹、山本 直樹、小原 道法、安井 文彦、迫田 義博、喜田 宏、芝崎 太
2. 発表標題 H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの膜透過性ペプチドを介した細胞侵入機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの新しい感染の仕組み https://www.igakuken.or.jp/topics/2020/1022_2.html

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	芝崎 太 (Shibasaki Futoshi) (90300954)	公益財団法人東京都医学総合研究所・病院等連携支援センター・研究員 (82609)	削除；令和3年2月16日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------