

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 9 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791015

研究課題名（和文） 高病原性インフルエンザの治療研究における新戦略と基礎的アプローチ

研究課題名（英文） Novel strategies and basic approaches for the study of the treatment against highly pathogenic influenza virus.

研究代表者

柏木 孝仁 (KASHIWAGI TAKAHITO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70320158

研究成果の概要（和文）：様々な宿主をもつインフルエンザウイルスはそれぞれの宿主の体温に適應せねばならない。インフルエンザウイルスの PB2 サブユニットが温度適應に関与していることが知られているが PA サブユニットについては知られていない。そこで細胞内レプリコン系を用いて、インフルエンザウイルスの vRNA、cRNA、mRNA の合成をそれぞれ、様々な温度環境の下で測定した。その結果、温度適應に対する PA サブユニットの重要性が示され、特に PA サブユニット上の 114 番目のアミノ酸の重要性が示唆された。これらの発見により、インフルエンザウイルスの温度適應には、PB2 や PA の遺伝子再集合が関与しており、遺伝子の入れ換えによって温度に適應していることが示唆された。この様にインフルエンザウイルスの特性を基礎的な視点から突き詰める事により、新しい薬剤開発、治療方法の正しい道筋を探ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Influenza A virus can infect a variety of different hosts and therefore has to adapt to different host temperatures for its efficient viral replication. It is well known that the PB2 subunit is involved in temperature sensitivity. On the other hand the role of the PA subunit in thermal sensitivity is still poorly understood. To test which polymerase subunit(s) were involved in thermal stress we reconstituted artificial hybrids of influenza RNA polymerase in ribonucleoprotein (RNP) complexes and measured steady-state levels of mRNA, cRNA and vRNA at different temperatures. The PA subunit was involved in modulating RNP activity under thermal stress. Residue 114 of the PA subunit was an important determinant of this activity. These findings suggested that influenza A virus may acquire an RNA polymerase adapted to different body temperatures of the host by reassortment of the RNA polymerase genes. Thus, we have introduced the new way to study novel drugs and treatments against influenza virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学

1. 研究開始当初の背景

高病原性トリ型インフルエンザウイルスの人への感染が香港で 1997 年に報告されて以来、度々人への感染が、特にアジアを中心に報告されていた。注目すべきは、その高い致死率(2008 年 7 月 15 日現在で 385 名が罹患し 243 名が死亡 WHO 発表)であり従来のヒト型インフルエンザウイルスとは明らかに異なっていた。それまでの研究でトリからヒトへの伝播様式が徐々に解明されつつあるのに対して、高い毒性の原因に関する報告は未だ乏しかった。

近い将来にパンデミック(大流行)が予想された中で、日本における対策としては医療従事者へのワクチンの接種、タミフルの備蓄などが行われていた。しかしながら特に小児におけるタミフルの安全性が疑問視され、またワクチンにおいても小児への適応や効果は考慮されていなかった。加えて、すでにタミフルを含むノイラミニダーゼ阻害薬への耐性株の出現が報告されていた(Antimicrob Agents Chemother 2008 Sep;52(9):3284-92)。すなわち、新たな視点からより安全性の高い治療薬の開発が必要であることを意味していた。特に小児領域においては高い安全性が求められた。この新規治療薬開発への糸口を探るためには基礎的知見からインフルエンザウイルスの性状をさらに深く追求する必要があった。

2. 研究の目的

様々な体温を示す宿主域を持つ人獣共通感染症であるがゆえに、インフルエンザウイルスは効率的な増幅を行うため、異なる宿主体温に適応する必要があると考えられる。インフルエンザウイルスは3つのサブユニットである PB1、PB2、PA を含む遺伝子複製酵素を独自に持っており(図1)、この酵素はウイルス複製のための中心酵素であると同時に、最適温度が存在する。すなわち、インフルエンザウイルスの温度への適応には、ウイルス遺伝子複製酵素の関係が示唆される。その中で、PB2 サブユニットは低温馴化を含め温度感受性に関わっていることが良く知られているが、温度感受性に関する他のサブユニットの役割についてはよく知られていない。

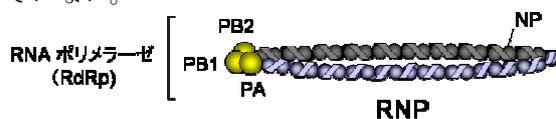


図1. インフルエンザの遺伝子複製酵素

3. 研究の方法

温度感受性に関する各サブユニットの役割を調べるために、様々な株由来(A/WSN/33(H1N1)、A/HK/156/97(H5N1)、A/NT/60/68(H3N2)、A/Vietnam/1194/2004(H5N1)、A/Kurume/K0910/2009(H1N1))の遺伝子複製酵素複合体を細胞内に再構築し、低温から高温に至る温度ストレスを加えながら遺伝子複製酵素の活性を、mRNA、vRNA、cRNA 別に解析した。

4. 研究成果

使用した株ごとに温度に対する遺伝子複製酵素の感受性が全く異なることが分かり、特に PA サブユニットが温度特性の変化に重要な役割を担っていることが判明した。また 2009 パンデミック株に由来する A/Kurume/K0910/2009(H1N1) は温度変化に対して寛容な遺伝子複製酵素を持ち、低温から高温に至るまで幅広い活性を得ることができた。一方で、A/WSN/33(H1N1) は明らかに低温に順応した活性を持ち、高温条件では直ちに遺伝子複製が低下し、A/Vietnam/1194/2004 では逆に顕著に高温に適応していた。

株ごとに遺伝子複製酵素の温度特性が異なり、サブユニットの入替えによって、温度特性が大きく変化する事から、宿主体温の違いに適応するために、一般にはインフルエンザウイルスの発生機序として知られている遺伝子再集合によって、遺伝子複製酵素の構成を変化させていることが示唆された。また、温度変化への適応に関して、遺伝子複製酵素複合体を構成する PA サブユニットの重要性が示された。

この様にインフルエンザウイルスの特性を基礎的な視点から突き詰める事により、新しい薬剤開発、治療方法の正しい道筋を探ることができた。

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4件)

- ① Nakazono Y, Hara K, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. The RNA polymerase PB2 subunit of influenza A/HongKong/156/1997(H5N1) restricts the replication of reassortant

ribonucleoprotein complexes. PLoS ONE 7(2) e32634: 1-9, 2012.

- ② Hara K, Yahara K, Gotoh K, Nakazono Y, Kashiwagi T, Imamura Y, Hamada N, Khositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Maneekarn N, Sirisanthana T, and Watanabe H. Clinical study concerning the relationship between community-acquired pneumonia and viral infection in northern Thailand. Intern Med, 50: 991-998, 2011.
- ③ Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Hamada N, and Watanabe H. Artificial hybrids of influenza A virus RNA polymerase reveal PA subunit modulates its thermal sensitivity. PLoS ONE 5(12) e15140: 1-11, 2010.
- ④ Kashiwagi T, Leung BW, Deng T, Chen H, and Brownlee GG. The N-terminal of the PA subunit of the RNA polymerase of influenza A/HongKong/156/97 influences promoter binding. PLoS ONE 4(5): e5473 1-11. 2009.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Kashiwagi T, Hara K, Hamada N and Watanabe H. The PA subunit of the influenza A virus RNA polymerase contributes its stable activity on thermal stress through the promoter binding. United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 15th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting. Wakayama, Japan, 2011. 11. 15.
- ② 中園陽子、原 好勇、柏木 孝仁、濱田 信之、渡邊 浩 「Mutational analysis of the PB2 subunit of H5N1 influenza virus RNA polymerase required for the assembly of the functional hybrid ribonucleoprotein」 第 15 回 国際ウイルス学会 (15th International Congress of Virology)、札幌、2011. 9. 13.
- ③ 柏木孝仁、原 好勇、今村 宜寛、濱田 信之、渡邊 浩 「A型インフルエンザウイルス遺伝子複製酵素から見た温度への適応について」 第 85 回日本感染症学会 学術総会、東京、2011. 4. 21.
- ④ 原好 勇、柏木 孝仁、渡邊 浩 「A 型

インフルエンザウイルス遺伝子複製酵素の亜型間親和性を決定するアミノ酸解析」 第 85 回日本感染症学会学術総会、東京、2011. 4. 21.

- ⑤ 原 好勇、中園 陽子、柏木 孝仁、今村 宜寛、濱田 信之、渡邊 浩 「A型インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼサブユニットの亜型間での親和性解析 -PA (H3N2) の親和性決定部位について-」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 8.
- ⑥ 中園 陽子、原 好勇、柏木 孝仁、今村 宜寛、濱田 信之、渡邊 浩 「A型インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼサブユニットの亜型間での親和性解析 -PB2 (H5N1) の親和性決定部位について-」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7.
- ⑦ 柏木 孝仁、原 好勇、中園 陽子、濱田 信之、岩橋 潤、今村 宜寛、渡邊 浩 「A型インフルエンザウイルス遺伝子複製酵素の温度変化への適応」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7.
- ⑧ Hara K, Nakazono Y, Kashiwagi T, and Watanabe H. The N-terminal region of the PA subunit of influenza virus RNA polymerase contributes to the functional RNA formation. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010. 9. 4.
- ⑨ Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Hamada N, and Watanabe H. PA subunit of Influenza A virus RNA polymerase is involved in the stable RNA replication at high temperature. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010. 9. 4.
- ⑩ Watanabe H, Kashiwagi T, Hara K, Masunaga K, Kawano S, Miura M, Iwahashi J, Qin L, Imamura Y, and Hamada N. Infection control for the pandemic (H1N1)2009 in Kurume university hospital. Meeting of the global outbreak alert and response network (GOARN) partners from the western pacific region. Siem Reap, Cambodia, 2010. 3. 23.
- ⑪ Nakazono Y, Hara K, Kashiwagi T, and Watanabe H. Analysis of the hybrid

trimeric complexes consisted of human and avian influenza virus RNA polymerase subunits. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009.12.9.

- ⑫ 柏木孝仁、原好勇、岩橋潤、中園陽子、今村宜寛、濱田信之 「インフルエンザウイルス遺伝子複製酵素の研究」 第57回日本ウイルス学会学術総会、東京、2009.10.26.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏木 孝仁 (KASHIWAGI TAKAHITO)
久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70320158

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：