

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 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790426

研究課題名（和文）：

高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒト間で伝播するための重要な変異と病原性の解析

研究課題名（英文）：

Identification of influenza virus mutations responsible for the efficient replication in humans and analysis of the effect of the mutations on pathogenicity in animal models

研究代表者 山田 晋弥 (YAMADA SHINYA)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：90466839

研究成果の概要（和文）：

近年、高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスには、ヒトに感染するものの、ヒト間では効率よく伝播していない。つまり、ヒト間の伝播には更なる適応が必要と考えられ、それに関わる変異の同定は重要である。本研究では、ウイルスの PB2 タンパク質の 591 番目のアミノ酸変異が、H5N1 ウイルスで起きるとヒト気管支上皮細胞でよく増えるようになり、マウスにおいて高い病原性を示すようになることを明らかにした。同時に、591 番目のアミノ酸変異は、パンデミック(2009)H1N1 ウイルスにおいても哺乳動物における効率のよい増殖に関与することを明らかにした。一方、ヒト分離 H5N1 ウイルスを正常ヒト気管支細胞に適応させたと、哺乳動物における飛沫感染は観察されなかったが、様々な変異を獲得し、主に HA の変異により、ヒト細胞での高い増殖能を獲得していた。本研究で見出した変異(とりわけ PB2 の 591 番目のアミノ酸変異)は、今後、分離されるインフルエンザウイルスのリスク評価をする際の分子マーカーとして重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The efficient transmission of H5N1 viruses among humans has never occurred, suggesting that the further adaptation to humans is required. At the moment, little is known about mutations responsible for the efficient transmission of H5N1 viruses in humans. Two amino acids (lysine at position 627 or asparagine at position 701) in the polymerase subunit PB2 protein are considered critical for the adaptation of avian influenza A viruses to mammals. However, the recently emerged pandemic H1N1 viruses lack these amino acids. Here, we report that a basic amino acid at position 591 of PB2 can compensate for the lack of lysine at position 627 and confers efficient viral replication to pandemic H1N1 viruses in mammals. Moreover, a basic amino acid at position 591 of PB2 substantially increased the lethality of an avian H5N1 virus in mice.

We also report that H5N1 viruses isolated from human in Vietnam in 2004 became to grow higher through the passages in normal human bronchus epithelial (NHBE) cells by acquiring several mutations. Mainly mutations in hemagglutinin(HA) genes were responsible for their high growth. However, no transmission of the mutant viruses via respiratory droplets in ferret model was observed.

In this study, we identified some new molecular markers responsible for the efficient replication of influenza viruses in human cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：インフルエンザ、伝播、変異

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスの感染は飛沫感染であり、ヒトからヒトに効率よく伝播するには、くしゃみや咳などにより拡散される必要があり、鼻などの上部気道で効率よく増殖することが重要である。そのためには、(1)ウイルスの膜表面タンパク質の1つであるヘマグルチニン(HA)がヒトの上部気道に多く発現しているヒト型レセプターと結合すること、(2)上部気道は肺の深部に比べて低温であるため、低温でもよく増殖することが重要であると考えられている。(2)には、ウイルスのポリメラーゼ PB2 の627、701 番目のアミノ酸がヒト型であることが大きく関与することが知られている。)

それをふまえて、主にヒトに直接感染のみする H5N1 ウイルスとヒト間で効率よく伝播する新型 H1N1 ウイルスを比較すると、多くの H5N1 ウイルスは、鳥型レセプターも存在する呼吸器深部に感染し、その部位で主に増殖するため、ヒト間での伝播が起こりにくく、また、重度の下部呼吸器症状を引き起こす。一方、新型 H1N1 ウイルスは、主にヒト型とレセプターとよく結合し、上部気道で増殖するためヒト間で伝播するが、鳥型レセプターとも結合するため、肺深部でも増殖し、重度の下部呼吸器症状を示すことがあると考えられる。

しかしながら、ヒト分離 H5N1 ウイルスの中には、ヒト型レセプターを認識するような変異を獲得した株が多数分離されているが、これらの株はヒト間で伝播しておらず、一方、新型 H1N1 ウイルスは、PB2 が鳥型であるがよく伝播する。つまり、ヒト間の伝播には、ヒト型レセプターの認識や PB2 の627、701 番目などの変異以外の重要な因子があると考えられる。H5N1 ウイルスがヒトの間で流行を起こすには、更にヒトに適応し変異を獲得する必要がある。つまり、更にどのように変化した場合、ヒト間で伝播

するようになるのか解明し、またその変化に伴い病原性がどのように変化するか解析することは、今後、新たなパンデミックを起こしうる新型 H5N1 ウイルスの出現を監視し事前策を講ずる上で重要である。

2. 研究の目的

H5N1 インフルエンザウイルスと新型 H1N1 ウイルスの比較解析等を行い、インフルエンザウイルスがヒトからヒトに効率よく伝播するための重要な因子について解析することで、今後、H5N1 ウイルスは、どのような変化を獲得した場合、世界的大流行(パンデミック)を起こるかについて調べる。更にヒトに適応し、ヒトで効率よく伝播することによって病原性はどうか変化するかについて調べる。

1) 研究の方法

- (1) 様々な H5N1 ウイルスの正常ヒト気管支上皮(NHBE)細胞における増殖性を比較し、よく増殖することに関与する、既知の変異(PB2-627K、701N など)以外の変異を同定する。
- (2) NHBE 細胞で H5N1 ウイルスを継代し、起きた様々な変異の中で、高い増殖性に関与する変異を同定する。さらに、NHBE 細胞に馴化したことで、ウイルスの性状(レセプター特異性、ポリメラーゼ活性、病原性)が変化したか解析する。
- (3) NHBE 細胞馴化ウイルスがヒト間で伝播するように変化したかを調べるために、実験動物を用いて伝播実験を行う。
- (4) 新型 H1N1 ウイルスと H5N1 ウイルスの遺伝子交雑ウイルスを作成し、伝播に重要なウイルス因子を同定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) NHBE 細胞における H5N1 ウイルス増殖性比較および鳥分離株の NHBE 細胞での継代

鳥分離 H5N1 ウイルス 10 株およびヒト分離株 20 株の培養細胞における増殖性を比較したところ、鶏由来細胞や他の哺乳動物由来細胞を用いた場合は、株間で大きな差はなかったが、正常ヒト気管支上皮(NHBE)細胞では、鳥分離株はよく増えず、ヒト分離株は高い増殖性を示した。更に、鳥分離株を NHBE 細胞で継代すると多くの株は継代途中で途絶えてしまった。唯一、途絶えずによく増えるようになった鳥分離株では、複数の変異が起きていた。リバースジェネティクス法により様々な組み合わせでそれらの変異を有するウイルスを合成したところ、PB2-627K、701N が、主に関与していることが明らかになった。

##### (2) PB2-627K または 701N を有さずに NHBE 細胞でよく増えるヒト分離株での高い増殖性に関する変異の同定。

インドネシアでヒトから分離された株は、PB2-627K または 701N を有さずに NHBE 細胞でよく増え、その株では、PB2 の 591 番目が塩基性アミノ酸の 1 つであるリシン(K)であることが NHBE 細胞での高い増殖性に関与していることが明らかになった(図 1)。

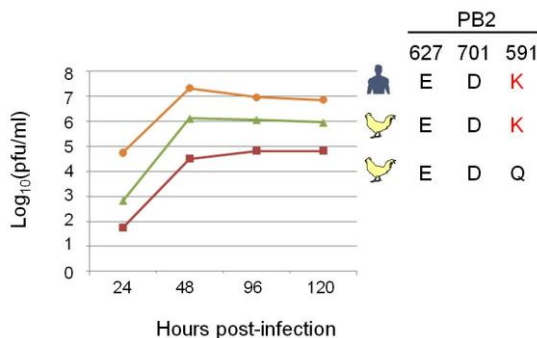


図 1. NHBE 細胞における増殖性比較

更に、X 線結晶構造解析より、591 番目のアミノ酸は 627 番目のアミノ酸のすぐ隣に位置していることが分かり、627 番目のアミノ酸変異と同様なメカニズムで哺乳動物への適応に関与している可能性が示唆された(図 2)。

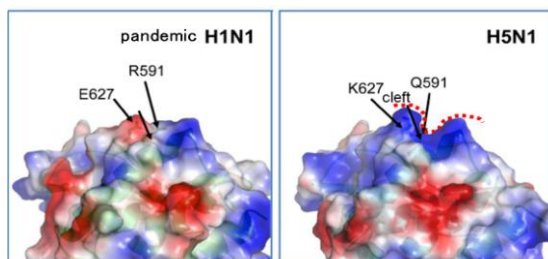


図 2. PB2 タンパク質の X 線結晶構造解析

更に、PB2-591K の変異の病原性への影響を調べたところ、PB2-591K により、鳥の H5N1 ウイルスのマウスでの病原性が顕著に高くなることが明らかになった(図 3)。

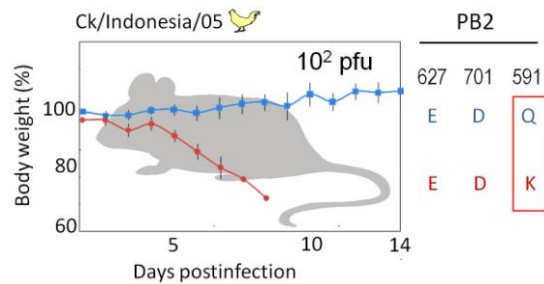


図 3. マウスにおける病原性解析

更に、パンデミック(2009)H1N1 ウイルスは、PB2-627K や PB2-701N などのアミノ酸を有していないが、パンデミック(2009)H1N1 ウイルスにおいても、591 番目のアミノ酸が塩基性アミノ酸であるアルギニン(R)であることが、哺乳動物における効率のよい増殖に関与していることを明らかにした。

この成果の位置づけとして、PB2 タンパク質の 591 番目のアミノ酸変異が哺乳動物での効率よい増殖に関わることを明らかにしたことで、今後、分離される H5N1 ウイルスなどのリスク評価をする際の分子マーカーになりうる知見を世界に提供できたと考える。

##### (3) NHBE 細胞で継代し、NHBE 細胞でより効率よく増えるようになったヒト分離 H5N1 ウイルスの解析

ヒト分離 H5N1 ウイルスは、鳥分離株に比べて NHBE 細胞で顕著に高い増殖性を示すものの、ヒト間での効率よい伝播は起こっておらず、ヒト間での伝播には、更なる適応が必要と考えられる。

そこで、ヒト分離 H5N1 ウイルス 3 株 a:Vietnam/3028/04、b:Indonesia/UT3006/05、c:Vietnam/3028II/04clone3 を NHBE 細胞で 10 回ほど継代したところ、インドネシア株の増殖性は顕著には変化しなかったが、ベトナム株 a および c は、様々な変異を獲得し、継代前に比べて、10 倍以上高い増殖性を示すようになった。そこで、どの変異が主に関与しているのか特定したところ、それぞれ、HA 遺伝子の変異が主に関与していることが明らかになった(図 4)。

それらの HA 遺伝子での変異のレセプター特異性への影響を調べたところ、顕著な差は検出されなかったことから、ヒト型レセプターを認識できるようになること以外のメカニ

ズムで、ヒトの上皮細胞でよく増えるようになってきている可能性が示唆された。

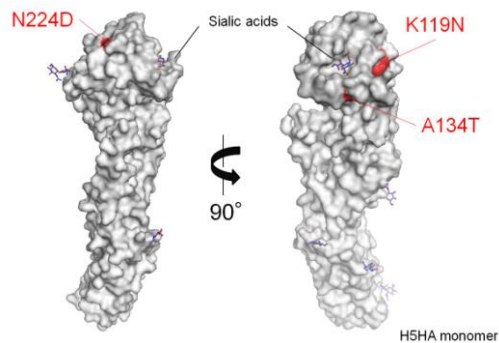


図4. NHBE 継代過程で HA に起きた変異

#### (4)NHBE 継代ウイルスのフェレットにおける伝播性

NHBE 細胞で継代し、馴化させた株が、フェレットで飛沫を介した伝播を行うか否か解析したところ、いずれの継代ウイルスもフェレットにおける伝播が確認されなかった。

哺乳動物で効率のよい伝播を起こすには、更なる適応が必要であると考えられる。

#### 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 10 件)

1. Yamada S, Shinya K, Takada A, Ito T, Suzuki T, Suzuki Y, Le QM, Ebina M, Kasai N, Kida H, Horimoto T, Rivaller P, Chen LM, Donis RO, Kawaoka Y. Adaptation of a duck influenza A virus in quail. **J Virol**. 2012 Feb;86(3):1411-20. 査読有 <http://jvi.asm.org/content/86/3/1411.long>
2. Watanabe T, Shinya K, Watanabe S, Imai M, Hatta M, Li C, Wolter BF, Neumann G, Hanson A, Ozawa M, Yamada S, Imai H, et al. Avian-type receptor-binding ability can increase influenza virus pathogenicity in macaques. **J Virol** .2011 Sep 21. 査読有 <http://jvi.asm.org/content/85/24/13195.long>
3. Ozawa M, Victor ST, Taft AS, Yamada S, Li C, Hatta M, Das SC, Takashita E, Kakugawa S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene. **J Gen Virol**. 2011 Aug 31. 査読有 <http://vir.sgmjournals.org/content/92/12/2879.long>
4. Shimizu K, Li C, Muramoto Y, Yamada S, Arikawa J, Chen H, Kawaoka Y. The nucleoprotein and matrix protein segments of H5N1 influenza viruses are responsible for dominance in embryonated eggs. **J Gen Virol**. 2011 Jul;92(Pt7):1645-9. 査読有 <http://vir.sgmjournals.org/content/92/7/1645.long>
5. Yamada S, Hatta M, Staker BL, et al. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. **PLoS Pathog**. 2010 Aug 5;6(8):e1001034. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916879/?tool=pubmed>
6. Nidom CA, Takano R, Yamada S, et al. Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. **Emerg Infect Dis**. 2010 Oct;16(10):1515-23. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294999/?tool=pubmed>
7. Octaviani CP, Ozawa M, Yamada S, Goto H, Kawaoka Y. High level of genetic compatibility between swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. **J Virol**. 2010 Oct;84(20):10918-22. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

[PMC2950597/?tool=pubmed](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2950597/)

8. Imai H, Shinya K, Takano R, Kiso M, Muramoto Y, Sakabe S, Murakami S, Ito M, Yamada S, Le MT, Nidom CA, et al. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. **PLoS Pathog.** 2010 Sep 16;6(9):e1001106. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2940759/?tool=pubmed>
9. Horimoto T, Yamada S, Kawaoka Y. Virological characteristics of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. **Uirusu.** 2010 Jun;60(1):3-8. Review. 査読なし. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsv/60/1/60\\_1\\_3/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsv/60/1/60_1_3/article)
10. Horimoto T, Yamada S, Kawaoka Y. Transmissibility and pathogenicity of influenza viruses. **Nihon Rinsho.** 2010 Sep;68(9):1616-23. Review. 査読なし. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20845737>

[学会発表] (計4件)

- (1) 山田晋弥、文部科学省「新興・再興感染症研究拠点形成プログラム」新興・再興感染症に関するアジアリサーチフォーラム-2012 平成24年1月10日(水)～12日(木)、神戸(兵庫)、口頭およびポスター発表
- (2) 山田晋弥、第8回 日中連携研究室ワークショップ 平成23年11月20日(日)～22日(火)、北京(中華人民共和国)、口頭発表
- (3) 山田晋弥、文部科学省「新興・再興感染症研究拠点形成プログラム」新興・再興感染症に関するアジアリサーチフォーラム-2011、ハノイ(ベトナム)、平成

22年11月11日(木)～13日(土)、ポスター発表

- (4) 山田晋弥、第7回 日中連携研究室ワークショップ -感染症の病因病態、遺伝子制御、シグナル伝達- 北京(中華人民共和国) 平成22年、10月24日(日)～26日(火)、口頭発表

[図書] (計2件)

- (1) 山田晋弥、河岡義裕 薬局(南山堂) 2011年、62(12)、11月号掲載(6頁)「インフルエンザウイルスの病原性と伝播性に関与する因子」
- (2) 山田晋弥、河岡義裕 呼吸(レスピレーション リサーチ ファンデーション) 2010年29(10)掲載(7頁)「インフルエンザウイルスの変異機構」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 晋弥 (YAMADA SHINYA)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：90466839

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし