

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 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790953

研究課題名（和文）高病原性鳥インフルエンザ H5N1 のヘマグルチニン蛋白質による病原性発現機構の解明

研究課題名（英文）The pathogenesis induced by highly pathogenic avian influenza virus H5N1 hemagglutinin

研究代表者

大道寺 智 (DAIDOJI TOMO)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：80432433

研究成果の概要（和文）：

マウスに対し A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) およびヒトに病原性を示さない A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)、さらに A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) をもとにした様々な H5N1 株の HA 遺伝子をもつ組み換えウイルス (rH5N3H5N1HA) を感染させ病原性を評価した結果、A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) および上記 rH5N3H5N1HA では体重減少が著しく、高い死亡率を示したが A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) では体重減少が認められず、死亡率も低かった。また一方で、感染後マウス肺内部でのウイルス増殖量を評価した結果、死亡率の高かった A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) および rH5N3H5N1HA を感染させたマウス肺内では高率にウイルスが増殖し、強い細胞傷害と炎症細胞の浸潤、出血が認められたが A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) では軽度であった。一方、ウイルス感染後の血中炎症性サイトカイン濃度は rH5N3H5N1HA 感染マウスにおいて A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) 感染マウスの値と比較して高かったものの A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) 感染マウスの値は必ずしも高いとは言えなかった。

研究成果の概要（英文）：

In recent years, the highly pathogenic avian influenza virus H5N1 has raised serious worldwide concern about an influenza pandemic; however, the mechanism of H5N1 pathogenesis is largely unknown. A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) [Cr/Ky (H5N1)] showed high mortality and weight loss toward mice, while A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) did not. In addition, recombinant H5N3 viruses carrying the H5N1 HA gene (rH5N3H5N1HA) showed the similar result with that of Cr/Ky (H5N1). In addition, Cr/Ky (H5N1) and rH5N3H5N1HA also indicated efficient viral replication and lung hemorrhage including inflammatory cell infiltration. The levels of proinflammatory cytokine in mice infected with rH5N3H5N1HA was higher than mice infected with Dk/Hk (H5N3). Taken together, these data suggest that H5N1HA broaden the viral pathogenesis in mice and this pathogenesis is based on viral replication and proinflammatory cytokine balance in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：高病原性鳥インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

H5N1-Flu が今後世界規模での大流行を起こす可能性が懸念されている中、H5N1-Flu に関する知見は蓄積しつつあるが H5N1-Flu が病気を起こす詳細なメカニズムについては未だなお不明な点が多い。申請者はこれまでにヒトの呼吸器のモデルとしてブタおよびヒトの呼吸器上皮細胞（初代培養細胞）を用いて現在アジアで流行しているタイプの H5N1-Flu である A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) はヒトに病原性を示さない弱毒株の A/Duck/Hong Kong/342/78 (H5N2)、A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) に比べて著しい細胞傷害を起こすことを確認している。またその原因がアポトーシス誘導であることを明らかにした (Daidoji et al., 2008)。さらにリバースジェネティクス法により本来アポトーシスを誘導しない H5N3-Flu に H5N1-Flu の HA 遺伝子を導入した rH5N3KyotoHA-Flu、rH5N3ThaiHA-Flu を作成し同様の実験を行うと、H5N1-Flu 同様にアポトーシスを誘導するようになることから (図 1、2)、H5N1-Flu の HA 遺伝子がアポトーシス誘導に必須であることを突き止めた (Daidoji et al., 2008)。本来レセプターとの結合が主たる機能と考えられる Flu の HA 蛋白質がアポトーシス誘導に関与しているという報告はかつてなく新たな知見である。また近縁の弱毒ウイルスである H5N3-Flu の HA に対し H5N1-Flu の HA を導入するだけでアポトーシスを誘導することから H5N1-Flu の HA 蛋白質がどのようにして宿主の恒常性を狂わせアポトーシスへと導いていくのかは興味深い。近年 H5N1-Flu 感染患者の肺で実際にアポトーシスを起こした細胞が確認されていることや (Uprasertkul et al., 2007)、肺に広範囲に認められる激しい組織傷害からも H5N1-Flu により誘導されるアポトーシスが病態に深く関与していることは想像に難くないが、今までに動物モデルを使ってアポトーシス誘導という視点で H5N1-Flu の病原性は評価されてこなかった。そこで本研究においては H5N1-Flu の病原性の一端を明らかにするため、HA 蛋白質が誘導するアポトーシスが生体において病態にどのように反映しているのかをマウスを用いた実験で明らかにしていくことを目的としている。具体的にはマウスに本来弱毒の H5N3-Flu に H5N1-Flu の HA 遺伝子を導入した rH5N3-H5N1HA-Flu を感染させ、その病態を親株の病態と比較検討していくことを計

画している。

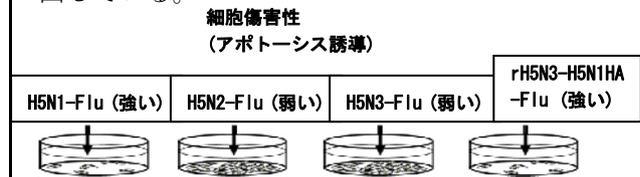


図 1 ブタおよびヒト呼吸器上皮細胞（初代培養細胞）における H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu および rH5N3-H5N1HA-Flu 感染時の細胞傷害性の違い

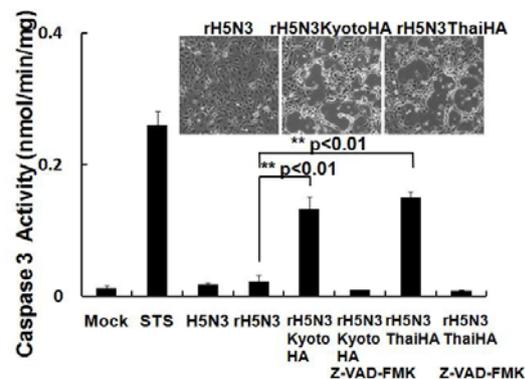


図 2 H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu および rH5N3KyotoHA-Flu、rH5N3ThaiHA-Flu を感染させ 16 時間後のブタ肺胞上皮細胞におけるアポトーシス誘導 (Caspase3 活性を指標) の違い

Staurosporin (STS): アポトーシス誘導剤

Z-VAD-FMK: アポトーシス阻害剤

結果

H5N1-Flu の HA 蛋白質は哺乳動物呼吸器上皮細胞（初代培養細胞）にアポトーシスを誘導する

2. 研究の目的

本研究では呼吸器上皮細胞に対してアポトーシスを誘導する高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 (H5N1-Flu) の HA 蛋白質が生体ではどのような病態を示すのかを動物モデルとしてマウスを使った実験で明らかにしていくことを主たる目的としている。

3. 研究の方法

本研究計画は H5N1-Flu HA を弱毒の H5N3-Flu に導入した組み換えウイルスの rH5N3-H5N1HA-Flu をマウスに感染させ、その病態を多角的に解析することで実際に H5N1-Flu HA がどのように生体内で病気を引

き起こすのかそのメカニズムを評価した。解析していくことを計画している（下記参照）。感染後の体重変化や死亡率の評価に加えて病理組織の観察、感染部位でのウイルス増殖量、炎症反応誘導の評価を行うことにより、rH5N3-H5N1HA-Flu が起こす病態解析を試みた。

(1) 体重測定と死亡率の評価

・以下ウイルス感染後の体重変化と死亡率の評価

- A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1)
- A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)
- rH5N3KyotoHA
- rH5N3ThaiHA
- rH5N3IndonesiaHA
- rH5N3ShanghaiHA
- rH5N3EgyptHA

(2) H. E. 染色による組織傷害の評価

・(1) に示したウイルスに感染したマウス肺の病理切片を作成し(H. E. 染色)組織の損傷程度と炎症を評価

(3) リアルタイム PCR による感染後マウス肺内部でのウイルス増殖量の評価

・(1) に示したウイルスに感染したマウス肺におけるウイルス増殖量を定量

(4) ウイルス感染マウス内での炎症性サイトカインの変動評価 (ELISA による測定)

・(1) に示したウイルスに感染したマウスでの血清中サイトカイン濃度 (TNF- α 、IL-6)を測定

4. 研究成果

(1) 体重測定と死亡率の評価

・マウスに対し A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) およびヒトに病原性を示さない A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)、さらに 2004 年から 2007 年までにトリやヒトから分離された様々な H5N1 株の HA 遺伝子をもつ recombinant H5N3KyotoHA (rH5N3KyotoHA)、rH5N3ThaiHA、rH5N3IndonesiaHA、rH5N3ShanghaiHA、rH5N3EgyptHA を感染させ体重変化と死亡率から病原性を評価した結果、A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) および上記 rH5N3H5N1HA では体重減少が著しく、高い死亡率を示したが A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) では体重減少が認められず、死亡率も低かった (図 3)。

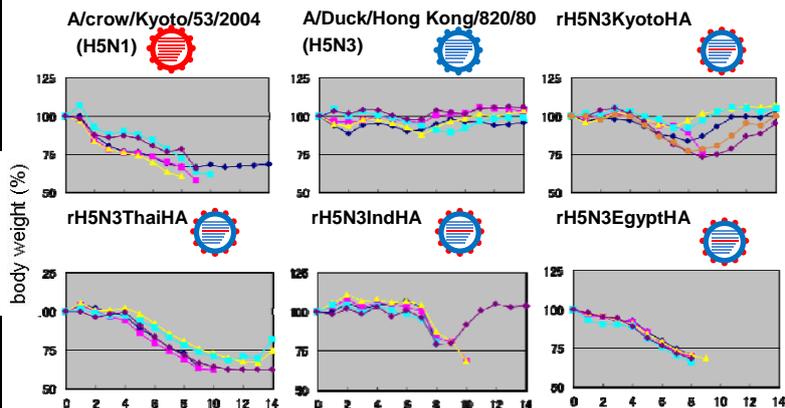


図 3 各種ウイルス感染後 (10^4 TCID₅₀/mouse) のマウス体重変化と死亡率

(2) H. E. 染色による組織傷害の評価

・(1) に示したウイルスに感染したマウス肺の病理切片を作成し(H. E. 染色)し組織の損傷程度と炎症を評価した結果、A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) および rH5N3H5N1HA を感染させたマウスでは強い細胞傷害と炎症細胞の浸潤、出血が認められた一方で A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) では軽度であった (図 4)。

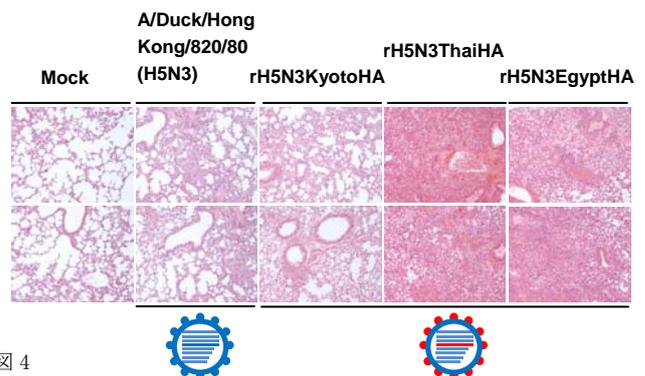


図 4 各種ウイルス感染 (10^4 TCID₅₀/mouse) 6日後 のマウス肺病変

(3) リアルタイム PCR による感染後マウス肺内部でのウイルス増殖量の評価

・感染後マウス肺内部でのウイルス増殖量を評価した結果、死亡率の高かった A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) および rH5N3H5N1HA を感染させたマウス肺内では高率にウイルスが増殖していた (図 5)。

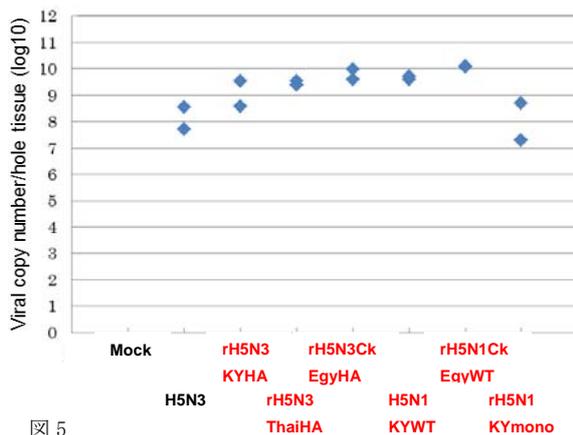


図5 各種ウイルス感染 (10^4 TCID₅₀/mouse) 6日後の肺内ウイルス増殖量

(4) ウイルス感染マウス内での炎症性サイトカインの変動評価 (ELISA による測定)
 ・血中の炎症性サイトカインを測定した結果、TNF- α 濃度はそれぞれのウイルス間で大きな差はなかった。IL-6 に関しては rH5N3H5N1HA 感染マウスにおいて A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)感染マウスの値と比較して高かったものの A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1)感染マウスの値は必ずしも高いとは言えなかった (図6)。

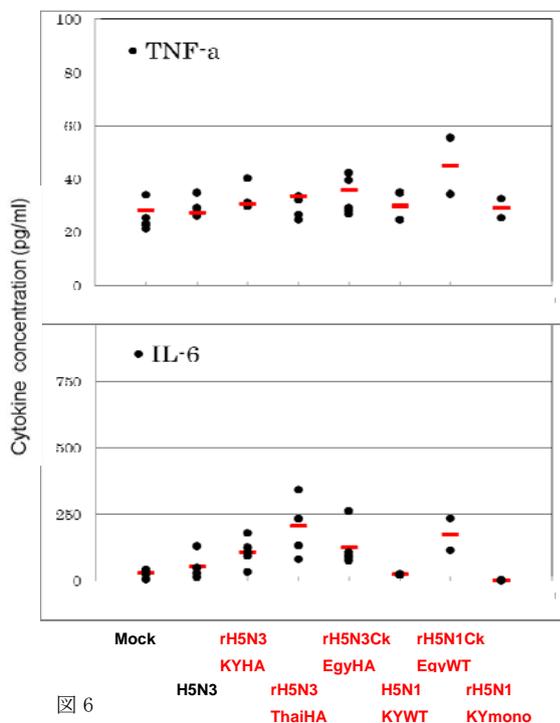


図6 各種ウイルス感染 (10^4 TCID₅₀/mouse) 6日後の血中サイトカイン濃度

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3件)

1. Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Kawashita N, Ramadhany R, Yang CS, Yasunaga T, Iida T, Horii T, Ikuta K, Takahashi K, Nakaya T (2012) Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009 and 2010. PLoS One, 7, e30946. 査読あり

2. Okumura Y, Takahashi E, Yano M, Ohuchi M, Daidoji T, Nakaya T, Böttcher E, Garten W, Klenk HD, Kido H (2010) Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. Jvirol., 84, 5089-5096. 査読あり

3. Daidoji T, Kaihatsu K, Nakaya T (2010) The Role of Apoptosis in Influenza Virus Pathogenesis and the Mechanisms Involved in Anti-Influenza Therapies. Curr Chem Biol., 4, 208-218. 査読あり

[学会発表] (計3件)

1. IUMS 2011 Sapporo (October, 15, 2011, Sapporo Convention Center) Tomo Daidoji, Madiha S Ibrahim, Yohei Watanabe, Mayo Yasugi, Cheng-Song Yang, Kazuyoshi Ikuta, Takaaki Nakaya WIDE-RANGED CELL TROPISM OF ASIAN-H5N1 VIRUSES IN HUMAN AIRWAY EPITHELIAL CELLS

2. 第58回ウイルス学会学術集会 (平成22年11月8日、あわぎんホール) 大道寺 智, Ibrahim Madiha S, 渡邊 洋平、上田 真世、楊 成松、生田 和良、高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 はヒト呼吸器上皮細胞に対して広いトロピズムを示す

3. Cell Symposia: Influenza Conference (December 3, 2010, Washington Marriot Hotel, Washington DC, USA) Tomo Daidoji, Madiha S Ibrahim, Yohei Watanabe, Mayo Ueda, Kazuyoshi Ikuta, Takaaki Nakaya, Wide-ranged cell tropism of Asian-H5N1 viruses in human airway epithelial cells

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大道寺 智 (DAIDOJI TOMO)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：80432433

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし