

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670066

研究課題名(和文)高病原性トリインフルエンザウイルスの新規感染経路を標的とした重症肺炎治療の試み

研究課題名(英文) Trial of severe pneumonia treatment by unraveling novel infection route of highly pathogenic avian influenza virus

研究代表者

梶原 直樹 (KAJIWARA, Naoki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：70453917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性トリインフルエンザウイルスH5N1は、ヘマグルチニンの開裂部位に複数の塩基性アミノ酸を有する。膜透過性ペプチドであるTATペプチドやポリアルギニンとの配列類似性より、この特徴的な配列がH5N1の感染に関与することを見出した。また、開裂部位の塩基性アミノ酸に富む配列による細胞内移行は、ダイレクトな膜透過やシアル酸を介する機序ではなく、新規受容体の存在を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Outbreak of influenza virus poses serious threats to public health worldwide. In recent years, highly pathogenic avian influenza A virus H5N1 has caused fatal human infection in Asia and many other countries, increasing fears of human pandemic. However, it remains to be elucidated how avian viruses acquire the ability to infect humans. Hemagglutinin (HA) is responsible for the binding of virus to cell surface and the subsequent fusion event. In contrast to low pathogenic viruses, highly pathogenic ones contain multiple basic amino acids at cleavage site of HA protein. We found that this unique motif might contribute to human infection with highly pathogenic H5N1 virus because the cluster of basic amino acid such as TAT peptide and poly-arginine functions as cell penetrating peptide. Our findings suggest that the unique motif at HA cleavage site of highly pathogenic H5N1 virus has the potential to enter cells via binding to some protein on plasma membrane.

研究分野：免疫学、感染症学

キーワード：インフルエンザ H5N1 感染 高病原性 肺炎

1. 研究開始当初の背景

- (1) インフルエンザの世界的大流行は、重大な健康被害と社会的混乱を引き起こす。1997年に、高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 の最初のヒト感染例が報告され、世界的大流行が懸念され続けている。H5N1 感染者の多くは、劇症型の急性呼吸促拍症候群を呈し、呼吸不全で死亡する。その致死率は約 60% と非常に高く、H5N1 の感染性や高病原性の機序の解明が急務である。
- (2) トリのウイルスである H5N1 がヒトに感染する機序として、「受容体結合特異性」が提唱されてきた。つまり、トリとヒトでは H5N1 を認識する受容体 (シアル酸) が異なり、通常、ヒトへの感染は起こらない。しかし、何らかの原因で H5N1 がヒトの下気道や肺胞に達した場合、それら組織に発現するトリ型受容体を介して感染が成立するという考え方である。一方で、2007 年に H5N1 はトリ型受容体を欠失させたヒトの気道上皮細胞にも感染できることが報告された。このことは、「受容体結合特異性」のみで H5N1 の感染性を説明することが困難であることを示している。
- (3) 高病原性の H5N1 は、ウイルス外膜糖タンパク質であるヘマグルチニン (HA) の開裂部位に複数の塩基性アミノ酸を有する。この部位は、宿主のプロテアーゼによる切断を受けるため、構造上外界と接する位置にある。Cell penetrating peptide (CPP) として知られる HIV ウイルス由来の TAT ペプチドも複数のアルギニンによって構成されることから、「HA 開裂部位の塩基性アミノ酸に富む配列が CPP として作用し、H5N1 の感染に重要な役割を果たす」という仮説を立て、H5N1 の新規感染経路を発見した。

2. 研究の目的

- (1) 本研究は、研究代表者らが発見した H5N1 の新規感染経路において、未解明である分子機構の解明などの基礎的研究を遂行するとともに、H5N1 感染に対する予防・治療薬として臨床応用へ発展させるための基盤の確立を目的とする。
- (2) 本研究の具体的な達成目標は、下記の 5 点である。

- 新規経路により H5N1 が感染する細胞種の同定
- H5N1 新規感染経路の分子機構の解明
- 新規経路による H5N1 感染時の宿主細胞応答の解析
- 新規経路による H5N1 感染と重症肺炎病態との関連
- 新規感染経路を標的とした H5N1 による重症肺炎治療の可能性探索

3. 研究の方法

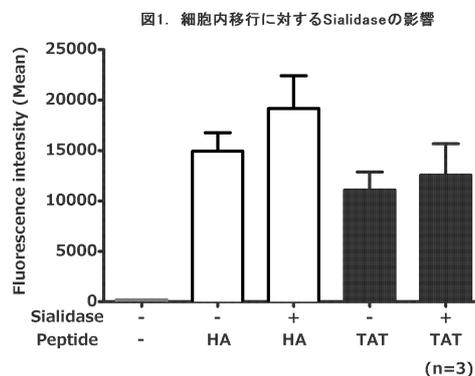
- (1) 研究材料としては、ヒトまたはマウス由来の cell line、マウスの primary cell を使用した。解析には、フローサイトメーターなど

の免疫学的手法、遺伝子導入などの分子生物学的手法、阻害薬などの薬理学的手法を用いた。

- (2) 新規経路により H5N1 が感染する細胞種を同定するため、免疫系細胞及び肺の間質細胞に焦点を当て、ヒトまたはマウス由来の各種細胞に蛍光標識ペプチドを処置した時の細胞内局在を検討した。定性的結果と定量的結果の両方を得るため、蛍光顕微鏡とフローサイトメーターを使用した。また、感染経路の特異性を証明するため、既知のインフルエンザウイルス受容体であるシアル酸除去の影響などについても調査した。
- (3) H5N1 の新規感染経路における受容体を同定するため、DNA マイクロアレイにより各細胞の遺伝子発現を調査し、蛍光標識ペプチドの細胞内移行能との相関について解析することで候補分子を抽出した。その後、各遺伝子に特異的な siRNA や過剰発現細胞の作製を通じて、候補分子の機能確認を行った。また、ビオチン標識ペプチドとアビジン固相化磁性ビーズを用いたプルダウンアッセイにより、ペプチドと候補分子の相互作用を解析した。

4. 研究成果

- (1) 蛍光標識ペプチドの様々な変異体を用いた検討の結果、細胞内移行に重要な HA 開裂部位のアミノ酸配列を同定することに成功した。
- (2) HA 開裂部位の蛍光標識ペプチドは、浮遊細胞と比較すると、接着細胞に効率良く取りこまれた。また、蛍光標識ペプチドの細胞内移行は、培養細胞だけでなくマウス脾細胞でも確認でき、培養細胞と同様の傾向を示した。
- (3) HA 開裂部位の蛍光標識ペプチドを C57BL/6 マウスに経鼻吸入させた場合、ペプチドは肺内に広く分布した。
- (4) HA 開裂部位の蛍光標識ペプチドは、シアリダーゼ前処置により細胞表面のシアル酸を除去した細胞に対しても、細胞内移行能を有していた。このことは、HA 開裂部位の塩基性アミノ酸配列による細胞内移行がシアル酸非依存的であることを示している (図 1)。



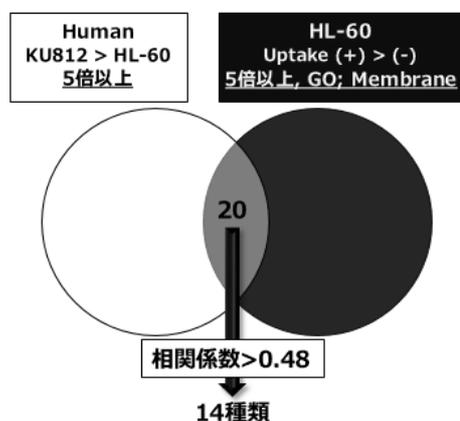
- (5) HA 開裂部位の塩基性アミノ酸配列による細胞内移行は、低温条件下、酸性条件下、

マクロピノサイトーシス阻害剤である EIPA の前処置によって有意に抑制された。これらの結果は、HA 開裂部位の塩基性アミノ酸配列による細胞内移行にマクロピノサイトーシスのような生理的取り込み機構が関与していることを示している。

(6) HA 開裂部位の塩基性アミノ酸配列による細胞内移行は、トリプシンの前処置によって有意に抑制されたことから、新規受容体の存在が示唆される。

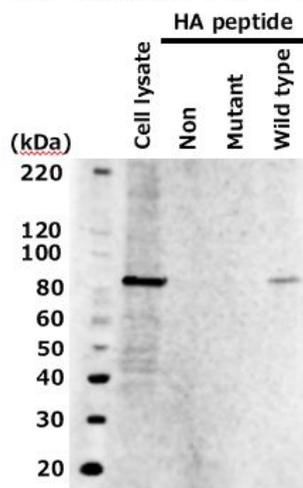
(7) HA 開裂部位の塩基性アミノ酸配列による細胞内移行は、細胞によって強弱がある。KU812 細胞に対しては強く、HL-60 細胞では弱い。また、HL-60 細胞内には、HA 開裂部位の蛍光標識ペプチドを取り込む群と、ほとんど取り込まない群が存在する。これらの結果に基づいて、各細胞における遺伝子発現を網羅的に調べ、20 種類の候補遺伝子を抽出した。20 種類の候補遺伝子のうち、細胞内移行能と遺伝子発現の相関が低い遺伝子を除外することにより、S1PR1 など 14 種類に候補遺伝子を絞り込むことができた (図 2)。

図2. DNAマイクロアレイによる候補遺伝子の抽出



(8) 受容体の同定には、候補分子がペプチドと相互作用することを実証する必要がある。まず、KU812 細胞に膜非透過性架橋剤を処置し、細胞膜表面タンパク質と反応させた。次にビオチン標識ペプチドを加え、候補分子とペプチド間に強力な結合を作らせた。その後、最適化した可溶化剤でタンパク質を抽出し、アビジン固相化磁性ビーズを用いたプルダウンアッセイを行った。約 80kDa のタンパク質が HA 開裂部位の塩基性アミノ酸配列によ

図3. プルダウンアッセイ



る細胞内移行に関与している可能性が示唆された (図 3)。

(9) 過剰発現細胞を作製し、候補分子の機能的検証を行った。HA 開裂部位の塩基性アミノ酸配列による細胞内移行を比較したけれども、過剰発現による影響は観察できなかった。候補分子を探索する新たな方法として、ジーントラップ法による genetic screening を行い、細胞内侵入能が抑制された細胞群の濃縮に成功している。

(10) ゲノム編集技術を利用して、シアル酸付加の律速酵素である cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase (CMAS) を欠失したヒト細胞株の作製に成功した。このシアル酸欠損細胞を用いて、H5N1 の感染能を免疫染色にて評価したところ、高病原性の H5N1 ウイルスはシアル酸欠損細胞にも感染できることを見出した。一方、低病原性の H5N1 ウイルスはシアル酸欠損細胞に感染できなかった。

(11) 本研究成果は、H5N1 感染に対する予防・治療法開発を通じて医療に貢献するばかりでなく、パンデミック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にもつながる可能性が十分に期待できる。

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 2 件)

(1) Sakurai A, Takayama K, Nomura N, Kajiwara N, Okamatsu M, Yamamoto N, Tamura T, Yamada J, Hashimoto M, Sakoda Y, Suda Y, Kobayashi Y, Kida H, Shibasaki F.

Fluorescent immunochromatography for rapid and sensitive typing of seasonal influenza viruses.

PLoS One. 査読有, 10(2), 2015, e0116715. doi: 10.1371/journal.pone.0116715.

(2) Kajiwara N, Shibasaki F.

Cell-penetrating peptide.

Nihon Yakurigaku Zasshi. 査読有, 141(4), 2013, 220-1.

<http://doi.org/10.1254/fpj.141.220>

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 梶原直樹、野村奈美子、宇梶麻紗子、貞任大地、小原道法、芝崎太 高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 のシアル酸非依存的感染機構 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(2) 梶原直樹、野村奈美子、宇梶麻紗子、貞任大地、小原道法、芝崎太 高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 の新規感染機構 Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 2016 2016 年 9 月 29 日 亀山亭ホテル (大分県・日田市)

(3) Naoki KAJIWARA, Namiko NOMURA, Akira SAKURAI, Masako HASHIMOTO, Michinori KOHARA, Yoshihiro SAKODA, Futoshi SHIBASAKI. Rapid Typing of Influenza Viruses Using Super High-Speed qRT-PCR. 14th IGAKUKEN International Symposium. 2016.6.30., IGAKUKEN (Tokyo, Japan)

(4) Namiko NOMURA, Akira SAKURAI, Naoki KAJIWARA, Masako HASHIMOTO, Yoshihiro SAKODA, Michinori KOHARA, Futoshi SHIBASAKI. Broad-Spectrum Detection of H5 Subtype Influenza A Viruses with A New Fluorescent Immunochromatography System. 14th IGAKUKEN International Symposium. 2016.6.30., IGAKUKEN (Tokyo, Japan)

(5) Kajiwaru N. High Performance Diagnostics for Influenza. Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 2015 2015年7月2日 グランドエクスィブ那須白河(福島県・西白河郡)

(6) Kajiwaru N., Shibasaki F. High Performance diagnostics for Influenza. 2015 TEPIK International Influenza Symposium. 2015.4.9., COEX (Seoul, Korea)

(7) 梶原直樹、櫻井陽、野村奈美子、橋本麻紗子、芝崎太 インフルエンザの迅速・高感度診断を可能にした蛍光イムノクロマトグラフ法の開発 Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 2014 2014年11月22日 ラフォーレ修善寺(静岡県・伊豆市)

(8) Kajiwaru N., Sakurai A, Nomura N., Nanba R, Sinkai T, Iwaki T, Obayashi T, Hashimoto K, Hasegawa M, Sakota Y, Naito A, Morizane Y, Hosaka M, Tsuboi K, Kida H, Kodama K, Kai A, Shibasaki F. Rapid typing of influenza viruses using high speed qRT-PCR. YONSEI BK21PLUS-CBSM International Joint Symposium. 2014.6.21., Gunja village (Andong, Korea)

〔その他〕

ホームページ等

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・分子医療プロジェクト・ホームページ

<http://www.molmed.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 直樹 (KAJIWARA Naoki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：70453917

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

芝崎 太 (SHIBASAKI Futoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号：90300954

野村 奈美子 (NOMURA Namiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任基盤技術研究職員
研究者番号：50599694

(4) 研究協力者

なし