

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670226

研究課題名(和文)高病原性鳥インフルエンザウイルス感染感受性の解析

研究課題名(英文)Genetic analysis in patients infected with H5N1 avian influenza virus

## 研究代表者

中山 英美(Nakayama, Emi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：70324845

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)：高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1は致死性は高いがヒト感染者の数は少なく、なぜ感染者がH5N1ウイルスに感染し得たかは明らかではない。4名のH5N1ウイルス感染者および10名の非感染者のシアル酸転移酵素遺伝子(ST3GAL1-6とST6GAL1,2)の全長領域を、次世代シーケンサーを用いて決定した。統計学的に有意に感染者に多い塩基多型(SNP)は32カ所あったが、一般集団において稀なSNPを持つヒトだけが感受性を持つとの仮説に立つ場合の候補SNPは、ST3GAL1、ST3GAL3、ST6GAL1にそれぞれ2カ所ずつの合計6カ所に絞られた。

研究成果の概要(英文)：Despite its high pathogenicity in infected human cases, the numbers of patients infected with H5N1 were still small. Most of H5N1 viruses isolated from infected patients display the same binding affinity to avian-type receptors as avian H5N1. These facts prompted us to raise one hypothesis that patients infected with H5N1 virus had elevated susceptibility to H5N1 compared with other individuals. The genomic DNA was extracted from 4 H5N1-infected but recovered patients and from 10 donors and the genetic analysis was performed at 6 genes of ST3GAL and 2 genes of ST6GAL by next generation sequencer. There are 32 SNPs over-represented in infected cases in ST3GAL1, 3, 6 and ST6GAL1 genes. If we hypothesize that the individuals with rare SNPs bear susceptibility to H5N1, SNPs in ST6GAL1, 3 and 6 genes were supposed to be candidate SNPs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：H5N1 感受性 シアル酸転移酵素 SNP

1. 研究開始当初の背景

近年、高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 のヒトへの感染が、中国、エジプト、インドネシア、ベトナムの4カ国を中心に報告されている。タイ王国においても2004年に小規模な流行が起こり、25名が感染し、うち17名が死亡した。鳥インフルエンザウイルスが細胞に侵入する際に使用するレセプターは、シアル酸 $\alpha$ 2-3ガラクトース糖鎖(SA $\alpha$ 2,3Gal: 鳥型レセプター)であるが、ヒトインフルエンザウイルスはシアル酸 $\alpha$ 2-6ガラクトース糖鎖(SA $\alpha$ 2,6Gal: ヒト型レセプター)により強い親和性を示す。感染者から分離されたH5N1ウイルスのほとんどは鳥から分離されたH5N1と同様に鳥型レセプターに強い親和性を示す。ヒト型レセプターと異なり、鳥型レセプターは咽頭上皮には少なく下気道や肺で多く発現しているとされていることから、なぜ、これらの感染者がH5N1ウイルスに感染し得たかは明らかではない。また、現在までにこれらの感染者の遺伝的背景は明らかになっていない。

H5N1ウイルスがヒトに感染した場合には強い病原性を示すのにも拘らず、今のところ感染者の数は少なく、ヒトからヒトへの感染拡大は見られていない。それは、同じ呼吸器感染症のSARSコロナウイルスの場合、飛行機内での集団感染や医療従事者への感染が観察されたのと比較して、H5N1のヒトへの感染効率が低いことを示す。また、ヒトで分離されたウイルスの多くは、いまだにシアル酸 $\alpha$ 2-6ガラクトース糖鎖をレセプターとして使用できない株である。これらのことから、H5N1ウイルスのヒトへの感染は一般的集団には生じることなく、ある特定の感染感受性を持つ人へのみに生じているとの可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、シアル酸 $\alpha$ 2-3ガラクトース糖鎖をレセプターとするH5N1への感染感受性を持つ宿主側の因子の同定を目的とした。作業仮説として、稀に一部のヒトが咽頭上皮にも異所性に鳥型レセプターを発現する変異をシアル酸転移酵素(ST3GALとST6GAL)内に有している可能性を考え、H5N1ウイルス感染者のシアル酸転移酵素の遺伝子解析を行った。

3. 研究の方法

2004年に、マヒドン大学医学部シリラ病院のPilaipan Puthavathana教授らによって樹立された4名のH5N1ウイルス感染生存者(H51-H54)および10名の非感染者(C1-C10)の不死化B細胞を使用した。マヒドン大学に凍結保存してあった細胞からヒトゲノムDNAを常法で抽出し、Illumina社のNextera custom enrichment kitを用いて8種類のシアル酸転移酵素遺伝子(ST3GAL1-6とST6GAL1,2)の全長領域(表1)を濃縮し、Illumina社の次世

代シーケンサーMiSeqを用いて塩基配列を決定し、CLC Genomics Workbenchを用いてアダプターのトリミング、ヒト全ゲノムhp19を参照配列としてマッピング、SNV検出(Quality-Based Variant Detection)とアノテーションを行い、各SNPについて、Fisher's exact testにてH5N1ウイルス感染者に特異的な塩基多型を検索した。ゲノムデータ解析は、大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センターの中村昇太助教の協力のもと行った。

表1: 濃縮した遺伝子領域

遺伝子名	染色体	長さ(Kbp)	位置
ST3GAL1	8	152	134,467,091 134,584,183
ST3GAL2	16	78	70,413,337 70,472,991
ST3GAL3	1	291	44,173,201 44,396,837
ST3GAL4	11	77	126,225,482 126,284,538
ST3GAL5	2	65	86,066,271 86,116,157
ST3GAL6	3	83	98,451,079 98,514,790
ST6GAL1	3	192	186,648,315 186,796,552
ST6GAL2	2	111	107,420,011 107,503,563

4. 研究成果

(1)次世代シーケンス

MiSeqを用いたリードの平均長は、127.06-144.04bpであった。塩基配列解析を行った14検体のマッピングされたリード長を表2に示す。

サンプル	マップ済みリード	マップ率
H51	1,085,373	94.43%
H52	309,281	97.78%
H53	928,051	95.27%
H54	621,515	92.10%
C1	688,123	97.00%
C2	593,308	75.06%
C3	941,045	91.09%
C4	1,235,418	92.91%
C5	1,303,468	93.08%
C6	1,167,873	95.01%
C7	1,409,814	93.13%
C8	1,490,061	93.20%
C9	1,245,070	94.82%
C10	960,071	96.38%

H52のリード数が少なく、SNPを検出できていない可能性があるため、以下の解析では、感染者群4名中全員が持っているSNPか、H52を除く3名が持っているSNPを検出することにした。

マッピングを精査したところ、ST3GAL1に約

1kbp、ST6GAL1 に約 5kbp のギャップがあることが判明した。ST3GAL1 については、プライマーを別に設定し、PCR 産物をサンガー法にて配列を決定し、SNP がないことを確認したが、ST6GAL1 のギャップについては、PCR でゲノム配列を増幅することができず、SNP の有無を確認することが出来なかった。

## (2) SNP 解析

Fisher's exact test で  $p < 0.05$  の有意差を持って感染者群が持つ SNP は、ST3GAL3、ST3GAL6、ST6GAL1 の遺伝子内に存在したが、ST3GAL6 の SNP は、感染者群 4 名全員が持つものに対して非感染者 2 名 (C2, C7) が持つ SNP 群 (rs1440153, rs3772098) と非感染者 3 名 (C2, C7, C8) が持つ SNP 群 (rs9872152, rs7611929 他 15SNP) に分かれハプロタイプを形成すると考えられたが、両 SNP 群ともに HapMap におけるアレル頻度は 0.4 であり、稀な SNP とは言えなかった。それ以外の稀な SNP について、以下の表 3 にまとめる。

表 3 : 候補 SNP 一覧

遺伝子 ST3GAL3,	1 番染色体、	rs199712286
感染者 vs 非感染者	3 名 vs 0 名	
HapMap アレル頻度		0
遺伝子 ST3GAL3,	1 番染色体、	rs200875345
感染者 vs 非感染者	4 名 vs 3 名 (C5, 7, 8)	
HapMap アレル頻度		0
遺伝子 ST6GAL1,	3 番染色体、	rs116799496
感染者 vs 非感染者	3 名 vs 1 名 (C4)	
HapMap アレル頻度		0.01
遺伝子 ST6GAL1,	3 番染色体、	rs371128719
感染者 vs 非感染者	3 名 vs 1 名 (C4)	
HapMap アレル頻度		0
遺伝子 ST3GAL1,	8 番染色体、	rs57228648
感染者 vs 非感染者	3 名 vs 0 名	
HapMap アレル頻度		0.16
遺伝子 ST3GAL1,	8 番染色体、	rs60776551
感染者 vs 非感染者	3 名 vs 0 名	
HapMap アレル頻度		0.10

以上の候補 SNP は、エクソンやプロモーター領域ではなくイントロンに位置していたため機能的な考察から、候補遺伝子をこれ以上に絞り込むことは出来なかった。タイではこれ以上の検体の取得は困難なため、2006 年から 2011 年にかけて H5N1 のヒト感染が見られたエジプトの Central Public Health Laboratories の Ahmed Satwat Abdelghani Abdelaal 博士との共同研究を計画している。

## 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) すべて査読有り

1) Likanonsakul S, Suntasakul B, Nitiyanontakij R, Prasithsirikul W, Nakayama EE, Shioda T, Sangsajja C. A Single-Nucleotide Polymorphism in ABCC4 Is Associated with Tenofovir-Related Beta2-Microglobulinuria in Thai Patients with HIV-1 Infection. PLoS One. 2016.11:e0147724. doi:10.1371/journal.pone.0147724.

2) Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato H, Shioda T. Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIM5 generated by random mutagenesis. J Gen Virol. 2016 97:963-76. doi: 10.1099/jgv.0.000408.

3) Nakayama EE, Shioda T. Impact of TRIM5 in vivo. AIDS. 2015.29:1733-43. doi: 10.1097/QAD.0000000000000812.

4) Uttayamakul S, Oudot-Mellakh T, Nakayama EE, Tengtrakulcharoen P, Guernon J, Delfraissy JF, Khusmith S, Sangsajja C, Likanonsakul S, Theodorou I, Shioda T. Genome-Wide Association Study of HIV-Related Lipodystrophy in Thai Patients: Association of a DLGAP1 Polymorphism with Fat Loss. AIDS Res Hum Retroviruses. 2015.31:792-6. doi: 10.1089/AID.2014.0266.

5) Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world monkey TRIM5. PLoSOne. 2015.10:e0121199. doi: 10.1371/journal.pone.0121199.

6) Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, Shioda T, Miyasaka M. The HIV-1 Gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. PLoS One. 2015.10:e0117454.

doi: 10.1371/journal.pone.0117454

7) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5. *Microbes Infect.* 2014. 16:936-44.

doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.017.

8) Taya K, Nakayama EE, Shioda T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages.

*PLoS One.* 2014.9:e90969.

doi: 10.1371/journal.pone.0090969.

9) Kono K, Takeda E, Tsutsui H, Kuroishi A, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Slower uncoating is associated with impaired replicative capability of simian-tropic HIV-1.

*PLoS One.* 2013.8:e72531.

doi: 10.1371/journal.pone.0072531.

10) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.

*J Virol.* 2013.87:11447-61.

doi: 10.1128/JVI.01549-13.

〔学会発表〕(計 14 件)

1) Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato H, Shioda T. Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2016 年 2 月 22 日-25 日、ボストン (米国)

2) 中山 英美, Sirirat Likanonsakul, Bussakorn Suntisuklappon, Ravee Nitayanontakij, Pimrapat Tengtrakulcharoen, Wisit Prasithsirikul, Chariya Sangsajja, 塩田 達雄 テノフォビア服用による尿中ベータグロブリンの高値は ABCC4 遺伝子の一塩基多型と相関する、第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会 2015 年 11 月 30 日-12 月 1 日。東京ドームホテル(東京・文京区)

3) Priya Dhole, Emi E. Nakayama, Supraneer Phanthanawiboon, Kriengsak Limkittikul, Kazuyoshi Ikuta, Tatsuo Shioda, Takeshi Kurosu Sequence analysis of Dengue Virus Type2 in Brain and Thymus of Infected Interferon Receptor KO mice: Implication for Neuroinvasiveness 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22 日-24 日 福岡国際会議場 (福岡・博多)

4) Sultana Tahmina, Emi E. Nakayama, Satoshi Tobita, Akatsuki Saito, Masako Nomaguchi, Akio Adachi, Hirohumi Akari, Tatsuo Shioda Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis

第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日-24 日、福岡国際会議場 (福岡・博多)

5) Tahmina Sultana, 中山 英美, 飛田 哲志, 齊藤 暁, 明里 宏文, 塩田 達雄 Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3-5 日。大阪国際会議場(大阪・大阪)

6) 中山英美, Uttayamakul Sumonmal, Tiphaine Oudot-Mellakh, Pimrapat Tengtrakulcharoen, Julien Guernon, Jean-Francois Delfraissy, Srisin Khusmith, Chariya Sangsajja, Sirirat Likanonsakul, Ioannis Theodorou, 塩田達雄: Genome-wide association study of HIV-related lipodystrophy in Thai patients: Association of a DLGAP1 polymorphism with fat loss. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日-5 日大阪国際会議場(大阪・大阪)

7) 武田英里, 河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 存在下における HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日 -5 日大阪国際会議場(大阪・大阪)

8) 田谷かほる, 武田英里, 中山英美, 塩田達雄, 明里宏文, 金子新. 再生医療技術のエイズ研究応用のためのアカゲザル iPS 細胞樹立と CD34 陽性細胞への分化. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日-5 日 大阪国際会議場(大阪・大阪)

9) 武田英里, 河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 に

よる HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻促進:可視化ウイルスによる解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10 日-12 日、パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

10) Nakayama EE., Tobita, S., Sultana, T., Saito A., Akari H., and Shioda T. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. Retroviruses 2014, 2014 年 5 月 19 日-24 日, Cold Spring Harbor(アメリカ)

11)田谷かほる、中山英美、塩田達雄: マクロファージ指向性 HIV-1 も、マクロファージおよび単球において SAMHD1 による増殖抑制を受けている. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 2013 年 11 月 20-22 日、熊本市市民会館 (熊本・熊本)

12)武田英里、河野健、Hulme Amy E., Hope Thomas J., 中山英美、塩田達雄: 可視化ウイルスをつかった HIV-2 カプシドコアの脱核速度測定法の確立 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10-12 日、神戸国際会議場(兵庫・神戸)

13)Akatsuki Saito, Emi E. Nakayama, Tatsu Shioda, Tomoyuki Yoshida, Atsunori Higashio, Saori Suzuki, Yoshi Kawaoka, Hirofumi Akari. Diversity of antiretroviral host factor TRIM5 gene in macaque monkeys. Retroviruses 2013, 2013 年 5 月 20 日-25 日、Cold Spring Harbor(アメリカ)

14)Ken Kono, Eri Takeda, Hiromi Tsutui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi E. Nakayama, Tatsu Shioda. Slower uncoating has a deleterious effect on replication of the simian-tropic HIV-1. Retroviruses 2013, 2013 年 5 月 20 日-25 日、Cold Spring Harbor(アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中山 英美 (NAKAYAMA Emi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号: 70324845