

機関番号：12601

研究種目：特別推進研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18002014

研究課題名（和文） 新型インフルエンザウイルスの出現機構とその制圧

研究課題名（英文） Mechanism of emergence of new influenza viruses and their control

研究代表者 河岡 義裕 (KAWAOKA YOSHIHIRO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70135838

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、高病原性 H5N1 鳥インフルエンザによるパンデミックの危機に備え、H5N1 ウイルスの生物学的性状を分子レベルで解析した。H5N1 ウイルスがヒトへ伝播するために重要な様々なアミノ酸を特定するとともに、ヒトの呼吸器におけるレセプター分布などを明らかにし、鳥インフルエンザがヒトへ伝播するメカニズムを解明した。また、本研究期間中にパンデミックが発生したことから、H5N1 ウイルスのみならず、パンデミックウイルスの抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの出現頻度や、出現メカニズムを明らかにした。さらに、インフルエンザウイルスの粒子形成について解析を行い、ゲノム-ウイルス蛋白質複合体の立体構造を明らかにし、8本のゲノムの粒子への取込機構の一端を明らかにした。本研究により得られた成果は、次のパンデミック予測、感染拡大阻止、薬剤開発などに役立つものとなる。

研究成果の概要（英文）： We studied the mechanisms by which H5N1 avian influenza viruses are transmitted to humans. We identified several amino acids that support efficient avian virus replication in mammals, and determined the distribution of avian-type receptors in the human airway. In 2009, during the term of this project, an influenza pandemic occurred. We therefore analyzed the mechanisms of the emergence of drug-resistant pandemic (H1N1) 2009 and H5N1 viruses. The data we obtained were and continue to be critical to the proper usage of influenza drugs in the clinical setting. We also analyzed the packaging mechanism of the influenza viral genome, and elucidated the three-dimensional structure of ribonucleoprotein complexes within progeny virions. The information obtained from these studies is critical for not only the prevention of future pandemics but also the development of new strategies to combat seasonal and pandemic influenza.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	89,000,000	26,700,000	115,700,000
2007 年度	89,000,000	26,700,000	115,700,000
2008 年度	89,000,000	26,700,000	115,700,000
2009 年度	89,000,000	26,700,000	115,700,000
2010 年度	89,000,000	26,700,000	115,700,000
総計	445,000,000	133,500,000	578,500,000

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、抗ウイルス薬、薬剤耐性ウイルス、レセプター、ウイルス粒子形成、オセルタミビル

1. 研究開始当初の背景

アジアを中心に高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスが猛威を振るっており、本ウイルスはヒトにも感染し多数の死亡者が確認されている。今のところ H5N1 ウイルスはヒトからヒトへは効率よく伝播することが出来ないため、世界的な流行（パンデミック）には至っていないが、一度そのような能力を獲得すると、スペイン風邪（世界中で2千万人以上が死亡）規模のパンデミックを引き起こすのは必至である。

2. 研究の目的

本研究課題では、高病原性鳥インフルエンザによるパンデミックの危機に備えて、H5N1 鳥インフルエンザウイルスの生物学的性状を分子レベルで解析するために、下記3項目から構成されている。

- (1) インフルエンザウイルスがパンデミックを起こすのに必要なウイルスの変異を同定することにより、どのようなメカニズムで鳥インフルエンザウイルスがヒトに伝播し、パンデミックを起こすようなウイルスに変化するのかを明らかにする。得られた情報は H5N1 ウイルスのリスク評価に役立つ。
- (2) H5N1 オセルタミビル耐性ウイルスの出現頻度ならびに性状を解析することにより、H5N1 ウイルスがパンデミックを起こした際に有用な情報を集積する。
- (3) インフルエンザウイルス粒子形成の詳細、特にウイルスゲノム分節が、細胞内でどのように集合し、その集合体がどのようにウイルス粒子に取り込まれるのかを解明する。得られた情報は新規抗インフルエンザ薬開発に役立つ。

3. 研究の方法

- (1) H5N1 インフルエンザウイルスの鳥→ヒトおよびヒト→ヒト感染に関わる要因の解析: ヒトの各種臓器における鳥ウイルスレセプター分布を解析した。また様々な H5N1 ウイルスを分子生物学的に解析し、ヒトへの伝播、増殖性に関わる因子を同定した。さらに、本研究期間中の平成 21 年にパンデミックが発生したことから、パンデミックウイルスの伝播についても解析を行った。
- (2) 抗インフルエンザ薬耐性ウイルス: 季節性のインフルエンザ罹患者から分離したウイルスを解析し、耐性ウイルスの出現状況を解析した。また、ヒトから分離した耐性ウイルスについて、実験動物を用いて病原性を解析した。さらに、パンデミックイン

フルエンザの抗ウイルス薬耐性ウイルスについても出現頻度等の解析を行った。

- (3) 粒子形成機構: ウイルスゲノム分節の粒子への取り込み機構を解析するために、分子生物学的解析および超微形態学的解析により、粒子形成機構を調べる。

4. 研究成果

- (1) H5N1 インフルエンザウイルスの鳥→ヒトおよびヒト→ヒト感染に関わる要因の解析
 - ① ヒトにおける H5N1 鳥インフルエンザウイルスの経口感染の可能性を示した。また、ヒトの肺胞部および結腸部に鳥型レセプターが発現していることを明らかにした。
 - ② H5N1 鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプター認識に、HA 蛋白質の 182 と 192 番目のアミノ酸が重要であることを示した。
 - ③ H5N1 ウイルスがヒトからヒトへ伝播するために、PB2 蛋白質の 627 番目のアミノ酸が重要であることを示した。
 - ④ ヒトから分離したウイルスは、鳥由来のウイルスよりもヒト細胞での増殖性が高いことを示した。
 - ⑤ ヒト、ニワトリ、カモから分離した 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解析したところ、ヒト由来株>ニワトリ由来株>カモ由来株といった順で増殖するという明確な傾向が見られた。
 - ⑥ ヒトの呼吸器・消化器・眼瞼結膜などの粘膜表面におけるインフルエンザレセプター分布を解析した結果、ヒトの上部気道にはヒト型レセプターが多いが、肺胞部には鳥型レセプターも多く、結腸部からも鳥型レセプターが検出された。これらの部位は、死亡した患者体内のウイルス分布と一致していた。
 - ⑦ NHBE 細胞で継代し、NHBE 細胞でよく増えるようになった H5N1 ウイルス株では、様々な変異が起きており、中でも HA のレセプター結合部位周辺に位置する 134 番目の変異が重要であることが明らかになった。また、この変異によりヒトの鼻腔上皮細胞でも増えやすくなることがわかり、ヒト間で伝播しやすくなる可能性が示唆された。
 - ⑧ フェレットモデルを用いて、H5N1 インフルエンザウイルスの病原性に影響する因子を解析した結果、HA 蛋白質のレセプター結合能と、NS1 蛋白質のインターフェロン拮抗作用が重要であることが明らかとなった。
 - ⑨ ヒトから分離した H5N1 ウイルス A/Vietnam/UT3062/04 株 および A/Vietnam/UT3028/03 株のフェレットに

における致死率は、それぞれ 67%および 0%であった。これら 2 株の遺伝子組換えウイルスを用いて、フェレットにおける病原性解析を行ったところ、HA 蛋白質と NS 遺伝子がコードする二つの蛋白質の合計 5 か所のアミノ酸が病原性に関与していることが明らかになった。

- ⑩ マウスでの病原性が異なるパンデミックウイルスを用いて、病原性に関わる因子を解析し、PB2 と PB1 のアミノ酸が病原性に寄与していることを明らかにした。さらに、マイクロアレイ解析を行い、病原性発現に影響を与えている宿主因子を同定した。
- (2) 抗インフルエンザ薬耐性ウイルス
- ① タミフル耐性 B 型インフルエンザウイルスをタミフル服用前の患者から検出し、ウイルスが患者の体内で耐性を得たのではなく、耐性ウイルスがヒトからヒトへ伝播していたことを明らかにした。
- ② フェレットを用いたヒト由来 H5N1 タミフル耐性ウイルスの性状解析を行い、NA 蛋白質 294 番目の Asn→Ser のタミフル耐性変異は、親ウイルスと比較して病原性が弱まっているとともに、ザナミビル（リレンザ）耐性であることを明らかにした。
- ③ 耐性ウイルス出現に備えて、タミフルおよびリレンザを用いた併用療法について検討したところ、耐性ウイルスは出現するが、患者の予後に影響はないことが明らかとなった。
- ④ マウスにおけるオセルタミビル投与実験の結果、H5N1 ウイルス感染時には、従来の季節性ウイルス感染時よりも高濃度、長期間の投与が必要であることが示唆された。
- ⑤ 薬剤耐性ウイルス出現に備えて、オセルタミビルおよびザナミビルを用いた併用療法について検討したところ、耐性ウイルスの出現頻度は高まるが、有効であることが明らかとなった。
- ⑥ パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスに罹患し、オセルタミビル治療を受けた患者について解析を行ったところ、オセルタミビル耐性のパンデミック (H1N1) 2009 ウイルスが検出された。
- ⑦ オセルタミビル耐性のパンデミック (H1N1) 2009 ウイルスについて、ザナミビル、ラニナミビルおよび T-705 に対しては感受性を保持していることを明らかにした。
- (3) 粒子形成機構
- ① ゲノム分節のウイルス粒子への取り込み過程において、パッケージング・シグナルが選択的に相互作用することで遺伝子集合体が形成され、ウイルス粒子に取り込ま

れている可能性を示した。

- ② ゲノムパッケージング機構を、7 本鎖ウイルスおよび HA 蛋白質欠損ウイルスを用いて解析し、効率よくパッケージングされるためには、8 種類すべての遺伝子分節が必要であることを明らかにした。
- ③ A/WSN/33 株の NA および HA 分節由来するモデル vRNA を作成し、ウイルス粒子に取込まれる効率を解析したところ、NA、HA 両方の分節が存在するときに取込み効率が增加することが明らかになった。
- ④ 電子線トモグラフィ法を用いてインフルエンザウイルス粒子内に取込まれたゲノム-ウイルス蛋白質複合体 (RNP) の立体構造解析を行い、8 本の RNP が物理的に結合した巨大複合体を形成していることを明らかにした。本成果により、インフルエンザウイルスが持つ分節化ゲノムのパッケージング機構の一端が明らかになった。

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 77 件、以下代表論文)

1. Noda T, Sugita Y, Aoyama K, Hirase A, Kawakami E, Miyazawa A, Sagara H, Kawaoka Y. Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. **Nat Commun** 3:639, 2012.
2. Kiso M, Takahashi K, Sakai-Tagawa Y, Shinya K, Sakabe S, Le QM, Ozawa M, Furuta Y, Kawaoka Y. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107:882-887, 2010.
3. Kiso M, Kubo S, Ozawa M, Le QM, Nidom CA, Yamashita M, Kawaoka Y. Efficacy of the new neuraminidase inhibitor CS-8958 against H5N1 influenza viruses. **PLoS Pathog** 6:e1000786, 2010.
4. Imai H, Shinya K, Takano R, Kiso M, Muramoto Y, Sakabe S, Murakami S, Ito M, Yamada S, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Takahashi K, Omori Y, Noda T, Shimojima M, Kakugawa S, Goto H, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kawaoka Y. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. **PLoS Pathog** 6:e1001106, 2010.
5. Kiso M, Shinya K, Shimojima M, Takano R, Takahashi K, Katsura H, Kakugawa S, Le MQ, Yamashita M,

- Furuta Y, Ozawa M, Kawaoka Y. Characterization of oseltamivir-resistant 2009 H1N1 pandemic influenza A viruses. **PLoS Pathog** 6:e1001079, 2010.
6. Yamada S, Hatta M, Staker BL, Watanabe S, Imai M, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Ozawa M, Watanabe T, Sakabe S, Li C, Kim JH, Myler PJ, Phan I, Raymond A, Smith E, Stacy R, Nidom CA, Lank SM, Wiseman RW, Bimber BN, O'Connor DH, Neumann G, Stewart LJ, Kawaoka Y. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. **PLoS Pathog** 6:e1001034, 2010.
 7. Li C, Hatta M, Nidom CA, Muramoto Y, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107:4687-4692, 2010.
 8. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamoto M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. **Nature** 460: 1021-1025, 2009.
 9. Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106:588-592, 2009.
 10. Hao L, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y. Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. **Nature** 454:890-893, 2008.
 11. Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, Hatta Y, Kim JH, Halfmann P, Hatta M, Feldmann F, Alimonti JB, Fernando L, Li Y, Katze MG, Feldmann H, Kawaoka Y. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. **Nature** 445:319-323, 2007.
 12. Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, Yamazaki M, Ichikawa M, Kimura K, Kiso M, Shimizu H, Kawakami C, Koike K, Mitamura K, Kawaoka Y. Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. **JAMA** 297:1435-1442, 2007.
 13. Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Kawaoka Y. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice **PLoS Pathog** 3:1374-1379, 2007.
 14. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. **Nature** 440:435-436, 2006.
 15. Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso M, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. **Nature** 444:378-382, 2006.
- [学会発表] (計 18 件、全て招待講演)
1. 河岡義裕 「Pandemic Influenza」 Influenza: Translating basic insights 平成 22 年 12 月 3 日、ワシントン
 2. 河岡義裕 「Systems Biology Approaches to Viral Pathogenesis and Immunity」 Pacific Northwest regional Center of Excellence 平成 22 年 9 月 22 日、ポートランド
 3. 河岡義裕 「Molecular Determinants of Transmission and Virulence」 Option for the Control Influenza VII 平成 22 年 9 月 3 日、香港
 4. 河岡義裕 「2009 Pandemic Influenza」 14th International Congress of Immunology 平成 22 年 8 月 24 日、神戸
 5. 河岡義裕 「Pandemic Influenza」 American Society for Microbiology, 110th General Meeting 平成 22 年 5 月 23 日、サンディエゴ
 6. 河岡義裕 「2009 Pandemic Influenza」 European Society for Virology 平成 22 年 4 月 7 日、チェルノッピオ
 7. 河岡義裕 「New Insights from studies on influenza」 XII International Symposium on Respiratory Viral Infection 平成 22 年 3 月 11 日、台北
 8. 河岡義裕 「新型インフルエンザー本当の

- 姿」再生医療・創薬 新しい医療の確立を目指して、平成 22 年 2 月 8 日、神戸
9. 河岡義裕「Keynote Speech」JUNBA 2010 Symposium 平成 22 年 1 月 12 日、サンフランシスコ
 10. 河岡義裕「Why influenza kills and will kill again」China-Japan Research Collaboration on Emerging and Reemerging Infections: First Five Years and Future 平成 21 年 10 月 21 日、北京
 11. 河岡義裕「Insights into Influenza Pathogenesis and Prevention」International Symposium on Respiratory Viral Infections 平成 21 年 2 月 21 日、バンコク
 12. 河岡義裕「パンデミック・インフルエンザー過去と未来ー」第 31 回日本分子生物学会、平成 20 年 12 月 12 日、神戸
 13. 河岡義裕「パンデミック・インフルエンザ」第 56 回日本ウイルス学会、平成 20 年 10 月 26 日、岡山
 14. 河岡義裕「1918 and H5N1 viruses」XIV. International Congress of Virology 平成 20 年 8 月 15 日、イスタンブール
 15. 河岡義裕「Influenza: Recent findings」4th China-Japan Bilateral Symposium on Avian Influenza 平成 20 年 4 月 29 日、北京
 16. 河岡義裕「Influenza Pandemic: Past and Future」5th International Conference on Emerging Zoonosis 平成 19 年 11 月 18 日、パリ
 17. 河岡義裕「Why influenza kills and kill again」Options for the Control of Influenza VI 平成 19 年 6 月 22 日、トロント
 18. 河岡義裕「Enigmas of influenza」1st Max Planck Symposium “Virology” 平成 19 年 4 月 13 日、ベルリン

[図書] (計 3 件)

1. 河岡義裕、渡辺登喜子「闘う！ウイルス・バスターズ」朝日新書、264 頁、平成 23 年出版
2. 河岡義裕「新型インフルエンザ 本当の姿」集英社新書、185 頁、平成 21 年出版
3. 河岡義裕、堀本研子「インフルエンザパンデミック」講談社新書、238 頁、平成 21 年出版

[その他]

(新聞掲載 27 件)

1. 朝日新聞：平成 24 年 1 月 25 日夕刊
2. 読売新聞：平成 22 年 8 月 7 日朝刊
3. 朝日新聞：平成 22 年 8 月 6 日朝刊
4. 朝日新聞：平成 22 年 8 月 5 日朝刊
5. 日経新聞：平成 22 年 2 月 26 日夕刊

6. 朝日新聞：平成 22 年 2 月 26 日夕刊
7. 毎日新聞：平成 22 年 2 月 27 日朝刊
8. 読売新聞：平成 22 年 2 月 27 日夕刊
9. 日経新聞：平成 21 年 12 月 22 日朝刊
10. 読売新聞：平成 21 年 12 月 22 日夕刊
11. 毎日新聞：平成 21 年 7 月 14 日朝刊
12. 朝日新聞：平成 21 年 7 月 14 日朝刊
13. 産経新聞：平成 21 年 7 月 14 日朝刊
14. 読売新聞：平成 21 年 7 月 14 日朝刊
15. 日経新聞：平成 21 年 7 月 14 日朝刊
16. 朝日新聞：平成 21 年 6 月 23 日朝刊
17. 毎日新聞：平成 21 年 6 月 16 日朝刊
18. 朝日新聞：平成 21 年 6 月 15 日夕刊
19. 毎日新聞：平成 21 年 1 月 12 日朝刊
20. 毎日新聞：平成 19 年 10 月 7 日朝刊
21. 読売新聞：平成 19 年 4 月 4 日夕刊
22. 毎日新聞：平成 19 年 4 月 21 日朝刊
23. 朝日新聞：平成 18 年 12 月 1 日夕刊
24. 毎日新聞：平成 18 年 11 月 16 日朝刊
25. 日経新聞：平成 18 年 11 月 16 日朝刊
26. 読売新聞：平成 18 年 11 月 16 日夕刊
27. 読売新聞：平成 18 年 10 月 20 日朝刊

(ホームページ)

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/virology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河岡義裕 (KAWAOKA YOSHIHIRO)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：70135838

(2) 研究分担者

新矢恭子 (SHINYA KYOKO)
神戸大学・医学部・准教授
研究者番号：90374925