

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790710  
 研究課題名(和文) 高病原性トリインフルエンザが哺乳類呼吸器細胞にアポトーシスを誘導する機構の解明  
 研究課題名(英文) The mechanism of viral induced apoptosis in mammalian airway epithelial cells infected with highly pathogenic avian influenza virus H5N1

研究代表者  
 大道寺 智(DAIDOJI TOMO)  
 大阪大学・微生物病研究所・特任研究員  
 研究者番号：80432433

## 研果の概要(和文)：

高病原性トリインフルエンザウイルス A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1) (H5N1-Flu) は哺乳動物の呼吸器上皮としてのブタ初代肺胞上皮細胞にアポトーシスを誘導し、その誘導には H5N1-Flu の hemagglutinin (HA) 蛋白質が深く関与していることがわかった。各種 recombinant H5N3-Flu をブタ肺胞上皮細胞に感染させその細胞傷害性とアポトーシス誘導能について評価を行ったところ H5N1-Flu の HA 以外の遺伝子をもつ recombinant H5N3-Flu ではアポトーシスを誘導しないことがわかった。またさらに H5N1-Flu の HA 蛋白質のうちアポトーシス誘導に関与する HA のアミノ酸配列を同定するために本来アポトーシスを誘導しない H5N3-Flu と H5N1-Flu の HA とのキメラの HA を作成した。これを H5N3-Flu に導入しアポトーシス誘導に関与しているアミノ酸の同定を試みたところ HA の 81 - 340 アミノ酸領域のみを H5N1-Flu に変えた H5N3-Flu のウイルスでアポトーシスの誘導が認められた。

## 研究成果の概要(英文)：

To elucidate the mechanism of H5N1 pathogenesis, we prepared primary airway epithelial cells from alveolar tissues from 1-year-old pigs and generated recombinant H5N3 viruses possessing H5N1 hemagglutinin (HA) by using reverse genetics system. After infection with the recombinant H5N3 viruses, H5N1 HA protein played a critical role in inducing caspase-dependent apoptosis in infected porcine alveolar epithelial cells. In addition, H5N1 HA1 region (84-340 amino acids) was essential for induction of caspase-dependent apoptosis in infected cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：感染症内科学

キーワード：高病原性鳥インフルエンザ、アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 (H5N1-Flu) が今後世界規模での大流行を起こす可能性について懸念されている中、H5N1-Flu に関する症例報告が数多くされており (de Jong et al., 2005; Ng et al., 2006; Wang et al., 2006; Yu et al., 2006; Brankston et al., 2007)、また患者血清中のサイトカインの増加と患者の病態の悪化との関連を示唆する報告 (To et al., 2001; Cheung., 2002; de Jong et al., 2006) など H5N1-Flu に関する個体レベルにおける知見は蓄積しつつある。また H5N1-Flu は人の肺深部に存在するレセプターに親和性があるため、肺深部の炎症が病態悪化を引き起こしているのではないかという報告がなされている (Shinya et al., 2006)。しかしながらこのようなマクロ的な解析は行われている一方で H5N1-Flu が実際に哺乳動物に感染し、細胞に侵入した後に細胞自体にどのような変化をもたらすのか、つまりは H5N1-Flu の感染・増殖と細胞傷害性との関係については今なお不明な点が多い。

申請者はこれまでにインフルエンザウイルス (Flu) の自然宿主であるブタの呼吸器上皮より初代培養細胞 (気管・気管支・細気管支・肺胞) を分離、培養することに成功しており、予備的に H5N1-Flu ならびに人に病原性を示さない弱毒株の H5N2-Flu、H5N3-Flu の感染試験を行った。その結果、H5N1-Flu はその他 2 株に比べて著しい細胞傷害を起こし (図 1)、その原因がアポトーシス誘導であることを示唆するデータを得た。近縁の H5 亜型ウイルスの中で、現在流行している H5N1-Flu が顕著なアポトーシス誘導能を示すことはヒトへの病態を考える上でも大変興味深い。そこで本研究では H5N1-Flu の病原性を明らかにするために、H5N1-Flu が感染後、アポトーシスを誘導する分子メカニズムについてウイルスの側から明らかにしていくことを目的としている。

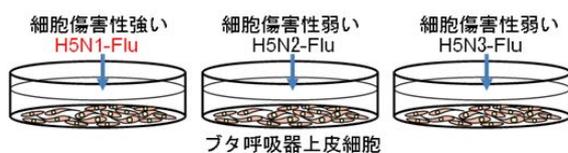


図 1 細胞種による H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu 感染時の細胞傷害性の違い

### 2. 研究の目的

本研究においては近年、人類を脅かしている呼吸器感染症の H5N1-Flu の病原性のメカニズムの一端を哺乳動物 (ヒト) のモデルとしてブタの呼吸器上皮細胞 (初代培養細胞) を用いてウイルス側の側面から分子レベルで解明することを主たる目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1-Flu の病原性を明らかにしていく上で、まずブタ呼吸器上皮細胞を用い、H5N1-Flu とともに弱毒株である H5N2-Flu、H5N3-Flu を用いた感染実験を行うことで病態評価を行い、さらにその病原性の詳しいメカニズムの検討を行った。また H5N1-Flu の遺伝子を弱毒株の H5N3-Flu に導入した組み換えウイルスを作成し H5N1-Flu の病原性に関与するウイルス遺伝子について詳細な解析を行った (下記参照)。

A ブタ呼吸器上皮細胞に対する H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu 感染時の病態評価

(1) ブタ初代肺胞上皮細胞の調製

・酵素消化による細胞の分離と培養

(2) 生存細胞数評価法 (MTT Assay) による H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu 感染時の細胞傷害性の評価。

・感染 8、16、24、32 時間後の細胞傷害性の程度を評価

(3) ウェスタンブロッティングによる細胞内ウイルス複製量の評価

・感染 8、16、24 時間後の細胞内のウイルス蛋白質を検出

(4) 細胞培養液中のウイルス粒子の経時的検出

・TCID<sub>50</sub> および ELISA による検出

(5) TUNEL 染色による H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu 感染時のアポトーシスの検出

・感染 16 時間後におけるアポトーシス細胞の検出

B H5N1-Flu の病原メカニズムの解明

(1) 組み換えウイルスを用いた H5N1-Flu の細胞傷害誘導に関与する病原遺伝子の決定

・H5N1-Flu の遺伝子と弱毒株 H5N3-Flu の遺

伝子を部分的に入れ替えた組み換えウイルスを作成することで H5N1-Flu の病原性（アポトーシス）に関与している遺伝子を特定する。

(2) 組み換えウイルスを用いた H5N1-Flu の細胞傷害誘導に関与する HA 領域の検討  
 ・様々な H5N1-Flu の HA 領域をもつ組み換え H5N3-Flu を作成することで H5N1-Flu HA の病原性（アポトーシス）に関与しているアミノ酸を特定する。

#### 4. 研究成果

A ブタ呼吸器上皮細胞に対する H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu 感染時の病態評価

(1) ブタ初代肺胞上皮細胞の調製

・1 歳齢のブタ肺より酵素消化により肺胞上皮細胞を分離し、培養・増殖を行った。得られた細胞の 99%以上が上皮細胞のマーカーである cytokeratin 19 に対する抗体で染色された。また繊維芽細胞のマーカーである vimentin では染色されなかった。以後この細胞を感染実験に用いることとした。

(2) 生存細胞数評価法 (MTT Assay) による H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu 感染時の細胞傷害性の評価

・ブタ肺胞上皮細胞 (pAEpC) に H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu をそれぞれ感染させ MTT Assay により細胞傷害性程度の数値化を行ったところ、H5N1-Flu では経時的に顕著な細胞傷害性が認められたが H5N2-Flu、H5N3-Flu においては顕著な細胞傷害性は認められなかった (図 2-A, B)。またこの傾向は上部気道から下部気道 (気管・気管支・細気管支・肺胞) の上皮細胞に共通しており、また組織の部位の違いによる細胞傷害性程度の違いは認められなかった。

・また一方でニワトリ胎子由来初代繊維芽細胞 (CEF) を用いて上記同様の実験を行ったところ H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu に共通して強い細胞傷害性が認められた (2-A, B2-A, B)。

・さらにここで認められた H5N1-Flu による強い細胞傷害性は株価細胞である A549 (人肺胞由来) や MDCK (犬腎由来、インフルエンザウイルス実験で汎用) では認められなかった。

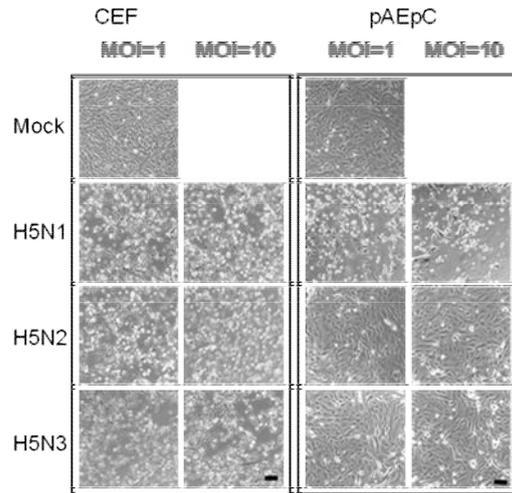


図 2-A ニワトリ胎子由来初代繊維芽細胞およびブタ肺胞上皮細胞に H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu を感染させ 24 時間後の細胞傷害性の程度 (Scale bars, 100 μm)

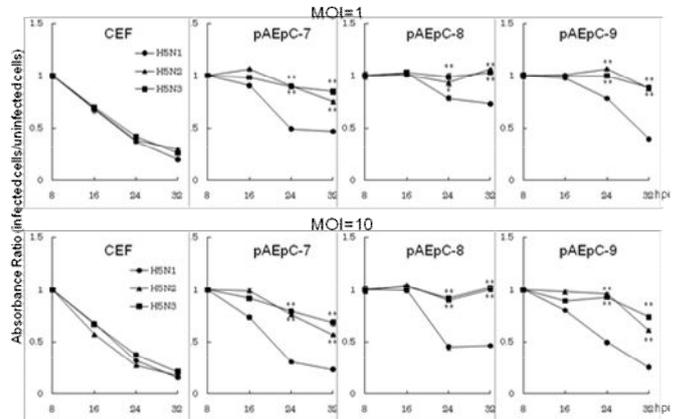


図 2-B ニワトリ胎子由来初代繊維芽細胞およびブタ肺胞上皮細胞に H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu を感染させた後の細胞傷害性程度の経時変化

(3) ウエスタンブロッティングによる細胞内ウイルス複製量の評価

・上記同様に H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu を感染させ、感染後のウイルス複製量の経時変化 (8、16、24 h) を比較したところ、それぞれのウイルス株は同様のカイネティクスでウイルス蛋白質の産生を行っていた。また単位時間当たりのウイルス複製量は 16 hpi でプラトーに達していた (図 3)。

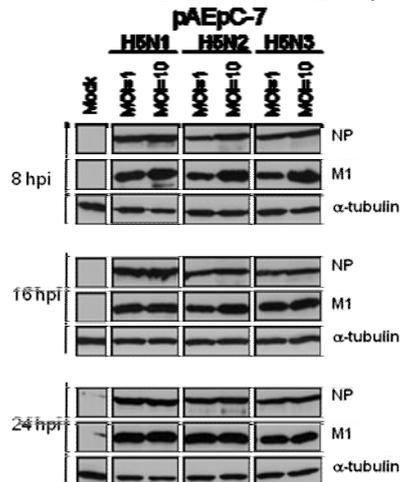


図3 ブタ肺胞上皮細胞内における H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu 感染後のウイルス蛋白質複製量の経時的变化 (ウエスタンブロッティング)。NP: Nucleoprotein; M: Matrix Protein

(4) 細胞培養液中のウイルス粒子の経時的検出

・H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu をブタ肺胞上皮細胞へ感染後、培養上清中へ放出されたウイルス粒子を TCID<sub>50</sub> (図4) および ELISA により検出を行ったところ、H5N1-Flu は若干他の2株に比べて多く産生されていたもののそれぞれのウイルス株のウイルス産生量はほぼ同程度であった。

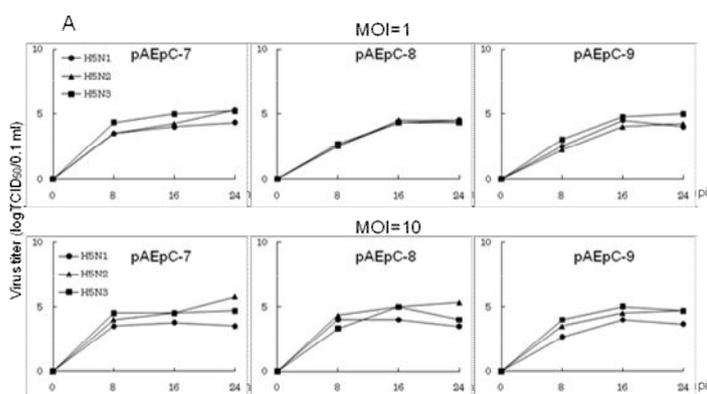


図4 H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu を感染後のブタ肺胞上皮細胞内からのウイルス産生量の経時的变化 (TCID<sub>50</sub>)。

(5) TUNEL 染色による H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu 感染時のアポトーシスの検出

・H5N1-Flu、H5N2-Flu、H5N3-Flu を感染させ16時間後のブタ上皮細胞においてアポトーシスの検出を行うために TUNEL 染色を行ったところ H5N1-Flu を感染させた細胞でのみ顕著に TUNEL 陽性細胞が認められた。また TUNEL 陽性細胞は caspase inhibitor z-VAD-FMK を含んだ培地で培養することによりほぼ完全に消失したことから H5N1-Flu は哺乳動物上皮細胞にアポトーシスを誘導することがわかった。

B H5N1-Flu の病原メカニズムの解明

(1) 組み換えウイルスを用いた H5N1-Flu の細胞傷害誘導に関する病原遺伝子の決定

・本研究においては H5N1-Flu の HA 遺伝子を弱毒株の H5N3-Flu に導入した組み換えウイルス (rH5N3KYHA、rH5N3ThaiHA) を作成し、上記同様にブタ肺胞上皮細胞での感染実験を行ったところ rH5N3KYHA、rH5N3ThaiHA は wild type の H5N3-Flu とは異なり強い細胞傷

害性と高いアポトーシス誘導能を示した (図5)。このことから H5N1-Flu の細胞傷害メカニズムの1因子として H5N1-Flu の HA 遺伝子が関係していることがわかった

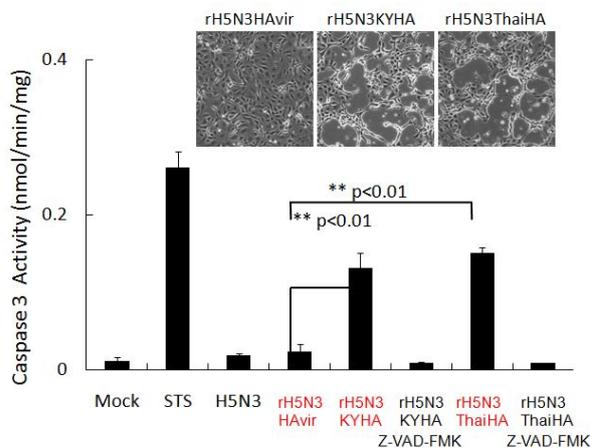


図5 組み換え H5N3-Flu を pAEpC に感染させた際の細胞傷害性とアポトーシス誘導能

(2) 組み換えウイルスを用いた H5N1-Flu の細胞傷害誘導に関する HA 領域の検討

・さらに H5N1-Flu の HA 蛋白質のうちアポトーシス誘導に関する H5N1-Flu の HA のアミノ酸配列を同定するために本来アポトーシスを誘導しない H5N3-Flu と H5N1-Flu の HA とのキメラの HA を作成しこれを H5N3-Flu に導入しアポトーシス誘導に関与しているアミノ酸の同定を試みたところ HA の 81-340 アミノ酸領域のみを H5N1-Flu に変えた H5N3-Flu のウイルスでアポトーシスの誘導が認められた (図6)。

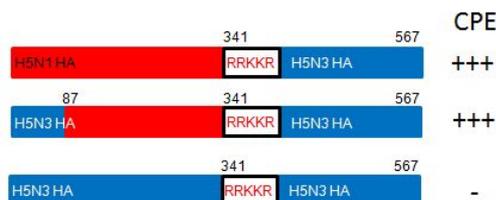


図6 HA 領域と細胞傷害性との関係  
CPE: cytopathic effect

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7件)

1. Ueda M, Daidoji T, Du A, Yang CS, Ibrahim MS, Ikuta K, Nakaya T. (2010) Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induces extracellular Ca<sup>2+</sup> influx, leading to apoptosis in avian cells. J Virol., 6, 3068-3078. 査読あり

2. Kaihatsu K, Mori S, Matsumura H, Daidoji T, Kawakami C, Kurata H, Nakaya T, Kato N. (2009) Broad and potent anti-influenza virus spectrum of gallocatechin-3-O-gallate-monopalmitate. *J Mol Genet Med.*, 3, 195-197. 査読あり

3. Wang SW, Kulkarni KH, Tang L, Wang JR, Yin T, Daidoji T, Yokota H, Hu M. (2009) Disposition of flavonoids via enteric recycling: UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1As deficiency in Gunn rats is compensated by increases in UGT2Bs activities. *J Pharmacol Exp Ther.*, 329, 1023-1031. 査読あり

4. Du A, Daidoji T, Koma T, Ibrahim MS, Nakamura S, de Silva UC, Ueda M, Yang CS, Yasunaga T, Ikuta K, Nakaya T. (2009) Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun.*, 378, 197-202. 査読あり

5. Daidoji T, Koma T, Du A, Yang CS, Ueda M, Ikuta K, Nakaya T. (2008) H5N1 avian influenza virus induces apoptotic cell death in mammalian airway epithelial cells. *J Virol.*, 82, 11294-11307. 査読あり

6. Nomura S, Daidoji T, Inoue H, Yokota H. (2008) Differential metabolism of 4-n- and 4-tert-octylphenols in perfused rat liver. *Life Sci.*, 83, 223-228. 査読あり

7. Ueda M, Yamate M, Du A, Daidoji T, Okuno Y, Ikuta K, Nakaya T. (2008) Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus. *Virus Res.*, 136, 91-97. 査読あり

[学会発表] (計5件)

1. 第57回日本ウイルス学会学術集会 (平成21年10月25日、都市センターホテル (東京))

大道寺智、中村昇太、Chandimal de Silva、上田真世、ドゥアナリワ、楊成松、生田和良、中屋隆明、高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 の細胞傷害誘導に関係する HA 領域の検討

2. International Joint Forum on Infectious Diseases (September 16, 2009, Siam City Hotel, Bangkok, Thailand)

Tomo Daidoji, Anariwa Du, Yusuke Shibai, Daisuke Ito, Mayo Ueda, Cheng-Song Yang,

Hisahiko Iwamoto, Kazuyoshi Ikuta, Takaaki Nakaya, One-step immunochromatographic assay for asian H5N1 detection

3. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (平成20年12月11日、神戸国際会議場)

大道寺智、駒貴明、楊成松、デュアナリワ、上田真世、生田和良、中屋隆明、高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 は哺乳動物呼吸器上皮細胞に対してアポトーシスを誘導する

4. 第56回日本ウイルス学会学術集会 (平成20年10月28日、岡山コンベンションセンター)

大道寺智、駒貴明、楊成松、Du Anariwa、上田真世、生田和良、中屋隆明、高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 の細胞傷害メカニズムの検討

5. FORUM OF THE NETWORK OF RESEARCH CENTERS ON INFECTIOUS DISEASES (October 6, 2008, National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Hanoi-Vietnam)

Tomo Daidoji, Takaaki Koma, Anariwa Du, Cheng-Song Yang, Mayo Ueda, Kazuyoshi Ikuta, and Takaaki Nakaya, H5N1 avian influenza virus induces apoptotic cell death in mammalian airway epithelial cells

6. 第5回日本カテキン学会総会 (平成20年8月22日、東京国際フォーラム)

開発邦宏、森修一、加藤修雄、大道寺智、中屋隆明、茶カテキンから抗インフルエンザ分子の創製を目指して

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・特任研究員

研究者番号: 80432433

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし