

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659482

研究課題名(和文) ヒト呼吸器細胞における H5N1 インフルエンザウイルス感染動態のバイオイメージング

研究課題名(英文) Infection kinetics of avian H5N1 influenza viruses in human airway epithelial cells by bio-imaging analysis

研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA, Takaaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80271633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 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、現在もなおヒトへの致死的な感染例が報告されている。その一方で、従来の鳥インフルエンザウイルスは、ヒトに対する病原性は極めて低い。そこで、バイオイメージング技術等を用いて、ウイルスのヒト呼吸器上皮細胞への感染初期過程について検討した。その結果、H5N1 ウイルスと従来型の鳥インフルエンザウイルスは細胞侵入後、エンドソーム内で膜融合を起こす際にそれぞれ異なる pH 感受性閾値を持つことが示唆された。したがって、H5N1 ウイルスと従来型の鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器上皮細胞に対する感染様式の違いは、細胞侵入後の膜融合過程と関係している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses have spread across Eurasia and into Africa; however, the mechanism underlying the pathogenesis of H5N1 in humans remains unclear. To identify differences in the mechanisms underlying the tropism of current H5N1 and previous avian influenza virus strains for human lower respiratory tract epithelial cells, we analyzed the infection kinetics of both viruses in epithelial cells using bio-imaging techniques. The results suggest that the pH of endosomes correlates closely with susceptibility to viruses, and that infectivity is dependent on the stability of viral hemagglutinin protein in acidic endosomes.

研究分野：感染症内科学

科研費の分科・細目：挑戦的萌芽研究

キーワード：インフルエンザウイルス H5N1 呼吸器上皮細胞 H5N1

1. 研究開始当初の背景

高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 (Asian-H5N1) は 2003 年のアウトブレイク以来、現在もなおヒトへの致死的な感染例が報告されている。その病原性については、感染組織 (肺) への直接的傷害の他に、レセプターの認識性、炎症性サイトカインの異常亢進、多臓器への感染拡大、など種々の要因の複合的関与が指摘されている。その一方で、従来の H5 亜型鳥インフルエンザウイルスは、ニワトリなどの家禽に重篤な感染症を引き起こす性質は Asian-H5N1 と同じであるものの、ヒトに対する病原性は極めて低い。

そこで、「なぜ Asian-H5N1 と従来の H5 亜型ウイルスではヒトに対する病原性が異なるのか」という問題を提起し、ウイルス学的研究によるアプローチからその解答を得ることを計画した。

これまでのインフルエンザウイルスの宿主トロピズムの研究は、主にレセプターであるシアル酸の構造解析と、(固定した)ヒト呼吸器組織にウイルスが結合するか否かを検討する組織病理学的解析が中心であったと考えられる。本研究は、ヒト呼吸器初代細胞を用いて H5 亜型鳥インフルエンザウイルスの感染動態について、その感染初期から子孫ウイルス産生までリアルタイムモニタリングすることが特色である。

2. 研究の目的

ヒトへの致死率が 50% を超える Asian-H5N1 のヒトへの病原性の分子メカニズムを解明するために、ヒト呼吸器上皮細胞を用いて H5N1 ウイルスの感染動態をリアルタイムで解析するバイオイメージングシステムを用いる。これまでに樹立したヒト細気管支由来上皮細胞株を基に、マーキング (染色) したインフルエンザウイルスの感染動態を解析する。

試験に用いるウイルスは、2000 年以前に分

離された H5 亜型などの鳥インフルエンザウイルスと、Asian-H5N1 の中でも特にヒトへの感染例が多発している、タイ、エジプトおよびインドネシア由来の H5N1 分離株とし、各ウイルスグループ間で比較する。

3. 研究の方法

(1) ウイルス

従来の鳥インフルエンザウイルスとして、2000 年以前に分離された A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)、A/Turkey/Ontario/7732/66 (H5N9)、A/pigeon/Osaka/1/01 (H7N7)、A/Duck/Hong Kong/448/78 (H9N2) を用いた。一方、高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスは国内で鳥より分離された株 (A/Crow/Kyoto/53/04) の他にエジプトで分離されたウイルス (A/chicken/Egypt/CL6/07) およびヒト感染例が続いているタイ、中国、インドネシア国の分離株 (A/Thailand/Kan353/04、A/Shanghai/1/06、A/Indonesia/5/05) 由来の HA 遺伝子を用いた。組換えウイルスは Asian-H5N1 および A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) の cDNA クローンを用いてリバーシジェネティクスシステムにより作出した。

(2) 細胞株

ヒト細気管支由来上皮細胞に、レトロウイルスベクターによる SV40-T 遺伝子を導入し、不死化細胞株を 20 株以上樹立した。その中で、1A5 および 21E5 と命名した細胞株を用いて以下の試験を行った。

(3) インフルエンザウイルス粒子の染色

精製したインフルエンザウイルスを脂質染色性の色素 (octadecyl rhodamine B chloride : R18) で染色し、マーキングすることにより、共焦点レーザー顕微鏡等を用いて、ウイルスが細胞表面に吸着後、内部に移行していく様子を観察するシステムを確立した。

4. 研究成果

高病原性株である A/Crow/Kyoto/53/04 (H5N1)、A/chicken/Egypt/CL6/07 (H5N1) は多くの細胞クローンに対し広く感染性を示した。その一方で、A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)、A/Turkey/Ontario/7732/66 (H5N9) は一部の細胞にしか感染せず、しかもその感染効率は A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1)、A/chicken/Egypt/CL6/07 (H5N1) と比較して低かった。

そこで、感染性の違いに関するメカニズムを検討するために A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1)、A/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) のそれぞれのウイルスを R18 で色素ラベルし、細胞への侵入の様子を経時的に観察したところ、いずれのウイルスも細胞へ同じように吸着し、細胞質内へ移行していくことが分かった。

(図)

さらに、両ウイルスの 21E5 細胞への吸着量をイムノプロットで解析したところ、大きな違いが見られないことが分かった。

(図)

しかし一方で H5N1 ウイルスと従来型の鳥インフルエンザウイルスは細胞侵入後、膜融合を起こす際にそれぞれ異なる pH 感受性を示した。

以上の結果より、H5N1 ウイルスと従来より存在する鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器上皮細胞に対する感染様式の違いは細胞侵入後の膜融合過程と関係していることがわかった。そしてそれぞれのウイルスの感染様式の違いとヒトに対する病原性の関係の可能性が示唆された。

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4件)

(査読有)

1. M. Morita, K. Kuba, M. Nakayama, A. Ichikawa, J. Katahira, R. Iwamoto, T. Watanebe, S. Sakabe, T. Daidoji, S. Nakamura, A. Kadowaki, T. Nakanishi, H. Nakanishi, R. Taguchi, T. Nakaya, M. Murakami, Y. Yoneda, H. Arai, Y. Kawaoka, J.M. Penninger, M. Arita, *Y. Imai, "The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza", *Cell*, Vol.153, pp.1-14 (2013) doi: 10.1016/j.cell.2013.02.027.
2. Y. Watanabe, M.S. Ibrahim, H.F. Ellakany, N. Kawashita, T. Daidoji, T. Takagi, T. Yasunaga, T. Nakaya, * K Ikuta, "Antigenic Analysis of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 Sublineages Co-Circulating in Egypt", *J Gen Virol*. Vol.93(Pt 10), pp.2215-2226 (2012) doi: 10.1099/vir.0.044032-0.

(査読無)

3. 中屋隆明 「鳥インフルエンザ」
Neuroinfection 18(1), 28-33, (2013)
4. 中屋隆明 「インフルエンザウイルスHAタンパク質の病原性分子機構」
京府医大誌 122(3), 123-131, 総説, (2013)

〔学会発表〕(計7件)

1. 大道寺智、渡邊洋平、Madiha S. Ibrahim、安木真世、丸山央峰、益田泰輔、新井史人、大場誠介、本田文江、生田和良、中屋隆明 「鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器上皮細胞に対する感染メカニズム」第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月12日、神戸市 (ミニシンポジウム)
2. 渡邊洋平、Madiha S. Ibrahim、大道寺智、荒井泰葉、平松宏明、中屋隆明、鈴木康夫、生田和良 「エジプトにおける患者由来 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス HA 遺伝子の変異解析」第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月12日、神戸市 (一般口演)
3. 中屋隆明 「Critical role of hemagglutinin (HA) in pathogenesis of influenza A viruses」

日露国際ワークショップ(京都大学)2013
年10月30日 京都市

4. 中屋隆明「血液感染症の治療戦略」京滋血液感染症研究会 2013 年9月13日 京都市(特別講演)
5. 中屋隆明「鳥インフルエンザ」日本神経感染症学会、2012年10月20日、京都市(教育講演)
6. 中屋隆明「インフルエンザウイルスの宿主域拡大戦略」,CREST 公開シンポジウム「光が拓く細胞解析の新展開」,2012年8月18日,東京(品川)(招待講演)
7. 中屋隆明「新興・再興ウイルス感染症のダイナミクス」,びわ湖国際医療フォーラム,2012年7月14日,滋賀県大津市(特別講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ URL

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/did/>

<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/classes/basicmedicine/221.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA, Takaaki)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 80271633

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: