

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08491

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの流行状況把握とヒト上部気道への適応メカニズム解析

研究課題名(英文) Understanding the mechanism of H5N1 virus adaptation to humans and the current situation of highly pathogenic avian viruses circulating in Indonesia.

研究代表者

山田 晋弥 (YAMADA, SHINYA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90466839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスが、ヒトで効率よく増殖することに関与する新規ウイルス因子を明らかにし、更に、インドネシアにおける高病原性インフルエンザウイルス流行状況把握を目的として、インドネシアの家禽からウイルスを分離し解析を行った。分離ウイルスは、全てH5N1であり、それ以外の亜型ウイルスは確認されなかった。性状解析の結果、ヒト呼吸器上皮細胞での効率のよい増殖性やマウスでの高病原性に関与するPB2遺伝子の変異やウイルス熱安定性に関与するHA遺伝子変異を新たに見出した。この成績は、今後、パンデミックを起こしうるウイルスのリスク評価やパンデミックに対する事前策に有用な情報であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To better understand how H5N1 influenza viruses could become to replicate efficiently in human respiratory epithelial cells, and to understand the current situation of highly pathogenic avian viruses circulating in Indonesia, we isolated influenza viruses from poultry in Indonesia and characterized them genetically and biologically. Sequencing analysis showed no highly pathogenic viruses other than H5N1 subtypes was detected in poultry in Indonesia. Biological analysis revealed that some PB2 mutations confer the efficient replication in human lung cells and high pathogenicity in mice to H5N1 viruses. We also found HA mutations that affected thermal stability of virus particles. The information obtained in this study improves our understanding how avian H5N1 virus become to replicate efficiently in humans and are also useful to prepare for a potential H5N1 pandemic.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ

## 1. 研究開始当初の背景

アジアを中心に流行していた高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスは、2003 年以降、中東、アフリカ、欧州にまで流行は拡大した。多くの国で終息したが、エジプトやインドネシアでは、現在もなお、家禽での流行が持続しており、ヒトへの感染が起きている。幸い感染は単発的なものであり、ヒト間での効率のよい伝播は起きていない。

鳥由来のウイルスが、ヒトで効率よく増殖するためには、ウイルスのヘマグルチニン (HA) にて、ヒト型レセプターの認識に関わる変異を獲得することや、ウイルスのポリメラーゼがヒト細胞で効率よく働くことなどが重要であることが知られている。特に、ウイルスのポリメラーゼ構成タンパク質の 1 つである PB2 における、Q591K、E627K、D701N などの変異がポリメラーゼ活性に大きく関与することが分かっており、実際に、ヒトから分離された H5N1 ウイルスの多くの株にて、それらの変異が高頻度に見られる。

現在、エジプトの家禽で流行している H5N1 ウイルスは、既に PB2-E627K を獲得しており、ヒトで流行するポテンシャルが高いと考えられており、パンデミックが危惧されている。(実際に、エジプトでは 2015 年にヒトにおける小規模な流行が起こり、1 年で 130 人以上が感染した。) 一方で、インドネシアでヒトや家禽から分離された株のほとんどで、Q591K、E627K、D701N が見られないことから、まだ同定されていない適応変異がある可能性が考えられる。

また、ある宿主由来のウイルスを、異なる宿主に適応させると、HA 蛋白質のレセプター特異性に関わる部位以外に変異が多数生じることが分かっているが、その意味について詳細は不明である。PB2 や HA に起きる未同定のヒトへの適応変異を同定し、ヒトへの適応メカニズムを明らかにすることは、今後、ヒトでパンデミックを起こしうるウイルスのリスク評価を行い、パンデミックに対する事前策を講じる上で重要である。

## 2. 研究の目的

H5N1 ウイルスがヒトで効率よく増殖するために重要な因子を新たに同定すること、更に、インドネシアにおける高病原性鳥インフルエンザウイルスの流行把握を目的として、インドネシアの家禽や豚検体からウイルスを分離し、遺伝子解析および性状解析を行うことで、流行状況を理解し、ヒトで効率よく増えるようになる適応メカニズムの解明を行う。

## 3. 研究の方法

- (1) インドネシアの養鶏場や小規模農場、と殺場などで家禽や豚などから採取した検体から分離したウイルスについて、ヒト呼吸器上皮細胞で効率よく増殖する株やマウスにおける高い病原性を示す株がないか調べる。
- (2) ヒト呼吸器上皮細胞で効率よく増殖し、マウスにおける高い病原性を示すインドネシア株について、リバースジェネティクス法を用いて変異ウイルスを作製し、その原因因子を特定する。
- (3) レセプター特異性に関与しない位置にあり、ヒト適応に関与すると思われる HA 変異について、リバースジェネティクス法を用いて変異ウイルスを作製し、ヒト呼吸器上皮細胞での増殖性や膜融合活性、ウイルスの熱安定性への影響を調べる。
- (4) インドネシアの家禽や豚から分離したウイルスの遺伝子解析を行うことで、他の高病原性インフルエンザウイルス (H5N6, H5N8 など) がインドネシア国内への流入していないか、等について調べ流行状況を把握する。

## 4. 研究成果

- (1) 2010 年から 2016 年に、インドネシアの家禽や豚から採取した検体から分離した H5N1 ウイルスについて解析したところ、2012 年分離株 (clade2.1.3) の中に、既知の変異を獲得しておらず、ヒト呼吸器上皮細胞で効率よく増殖し、マウスにおいて高い病原性を示す株が存在していた。
- (2) 上記ウイルスに見られる変異を様々な組み合わせで有するウイルスを、リバースジェネティクス法を用いて作製し、ヒト呼吸器上皮細胞での増殖性やマウスでの病原性を比較解析したところ、PB2 遺伝子のユニークな変異 2 つが、ヒト細胞での高い増殖性やマウスでの高い病原性に関与することが明らかになった。その 2 つの変異によるウイルスポリメラーゼ活性への影響が見られなかったことから、ポリメラーゼ活性向上とは異なるメカニズムで、高い増殖性に寄与しているものと推測された。
- (3) 様々なクレードの H5 ウイルスおよ

び、ヒトの季節性ウイルスの HA に見られる特徴的な変異をデータベースで調べ、更に、正常ヒト呼吸器上皮細胞での増殖過程で、異なるクレードに属する H5N1 ウイルスの HA (レセプター特異性に関与しない位置) に共通して起きた変異に注目し、解析を行った。その結果、解析した HA 変異は、ヒト呼吸器上皮細胞での増殖性や膜融合活性には関与しないが、熱安定性に関与することが明らかになった。

(4) インドネシアの検体から分離したウイルスの遺伝子解析を行った結果、全てが、H5N1 亜型であり、H5N6 や H5N8 などは分離されなかった。現在、インドネシアの家禽では、H5N1 ウイルスが流行を続けていると考えられた。

以上より、PB2 における、ヒト呼吸器上皮細胞での増殖性やマウスでの病原性に関わる新規変異を同定した。また、HA 遺伝子において、ウイルスの伝播性に重要と考えられる、熱安定性向上に関与する変異を同定した。これらの情報は、H5N1 ウイルスに限らず、今後、パンデミックを起こしうるウイルスのリスク評価やパンデミックに対する事前策に有用であると考えられる。

## 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 5 件)

1. Diversity of antigenic mutants of influenza A(H1N1)pdm09 virus escaped from human monoclonal antibodies. Yasuhara A, Yamayoshi S, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sakai-Tagawa Y, Uraki R, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Sasaki T, Ikuta K, Yamada S, Kawaoka Y. *Sci Rep*. 2017 Dec 18;7(1):17735.
2. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from a Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R,

Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. *Cell Host Microbe*. 2017 Nov 8;22(5):615-626.

3. Emergence of Oseltamivir-Resistant H7N9 Influenza Viruses in Immunosuppressed Cynomolgus Macaques. Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Yamayoshi S, Uraki R, Ito M, Nakajima N, Yamada S, Imai M, Kawakami E, Tomita Y, Fukuyama S, Itoh Y, Ogasawara K, Lopes TJS, Watanabe T, Moncla LH, Hasegawa H, Friedrich TC, Neumann G, Kawaoka Y. *J Infect Dis*. 2017 Sep 1;216(5):582-593.
4. Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses. Arafa AS, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken CA, Zhong G, Hanson AP, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y. *Sci Rep*. 2016 Dec 6;6:38388.
5. Molecular Determinants of Virulence and Stability of a Reporter-Expressing H5N1 Influenza A Virus. Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. *J Virol*. 2015 Nov;89(22):11337-46.

[学会発表](計 0 件)

[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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山田 晋弥 (YAMADA SHINYA)

東京大学・医科学研究所・ウイルス感染分野、  
助教

研究者番号：90466839

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )