

平成 30 年 4 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08497

研究課題名(和文) 鳥インフルエンザウイルスが患者体内で獲得するヒト適応化分子機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of avian influenza virus variants isolated from infected patients

研究代表者

渡邊 洋平 (Watanabe, Yohei)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50452462

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)：H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスが感染患者体内で獲得した遺伝子変異をデータベース解析のアプローチから網羅的に探索すると共に、当該変異群がH5N1ウイルスのヒト適応化に与える影響を解析した。マスマデータ解析によって同定した59種類のHA領域における変異を導入した組換えウイルスを用いて、レセプター糖鎖結合特異性、膜融合活性、熱安定性およびヒト呼吸器細胞またはマウスでの増殖性を評価した。その結果、変異ウイルス群がレセプター糖鎖結合特異性、膜融合活性および熱安定性を変化させることで、ヒト呼吸器細胞においてより効率的に増殖するように変化することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Our database search of avian H5N1 influenza viruses identified 59 HA mutations that had been selected in infected patients. Using reverse genetics, we found that H5N1 variants with some of these HA mutations had increased human-type receptor specificity and increased HA membrane fusion activity, both of which are advantageous for viral replication in human airway epithelia. Furthermore, HA mutants selected during viral replication in patients were likely to have less HA stability, apparently as compensatory mechanism. Our findings showed that H5N1 viruses could rapidly adapt to growth in the human airway microenvironment by altering HA properties in infected patients and provided new insights into the human-adaptive mechanisms of avian influenza viruses.

研究分野：感染症内科

キーワード：ウイルス学 人獣共通感染症学 感染病態学 インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス (以下、H5N1 ウイルス) は現在、アジア・アフリカ地域において鳥類で伝播を繰り返す常在域を獲得している。当該地域では感染鳥との濃厚接触によるヒト感染事例が継続して報告されており、重度の呼吸器疾患を病因とする高い致死率 (約 60%) が重大な社会問題となっている。また家禽・家畜と隣り合わせで暮らす風土から、当該地域から H5N1 由来新型インフルエンザ (パンデミック) ウイルスが出現する可能性が指摘されている。そのため、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構を先駆的に解明することは、より効果的なパンデミックインフルエンザ対策を施策する上で極めて重要である。

(2) H5N1 ウイルスのヒト適応化機構の詳細は未解明である。最近、H5N1 ウイルスをフェレットで継代することで飛沫感染能の高い変異ウイルスが作出可能と報告された。このことは、H5N1 ウイルスが予想より遥かに少ない遺伝子変異を獲得することでパンデミック化する可能性を示唆している。一方で、先行研究の中心は実験動物を用いた変異選択試験である。そのため、ウイルスのヒト適応化機構の全容解明には、ヒト生体内のウイルス複製動態を反映した新しいアプローチに基づく解析が必要な状況にある。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、エジプト研究機関との連携することで同国の H5N1 感染患者由来ウイルス遺伝子配列からヒト生体内で選択されたアミノ酸変異を網羅的に検索し、当該変異がウイルスのヒト適応性に与える影響を包括的に評価することで、H5N1 ウイルスの新規パンデミック化機構の分子基盤を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) エジプトの感染患者および家禽から分離された H5N1 ウイルス HA 遺伝子配列を GISAID database から抽出した。得られた遺伝子配列情報をアラインメントすることで consensus 配列を決定した。当該配列と各ウイルスの遺伝子配列を比較してウイルス遺伝子集団における各アミノ酸残基の変異の種類とその検出率を算出後、検出率をさらに比較することで、感染患者体内で特異的に選択された変異群を選定した。

(2) リバースジェネティクス (RG) 法を用いて、選定した変異を導入した組換えウイルスを作出した。シードウイルスを凍結保存し、発育鶏卵または培養細胞に接種することでウイルス増幅して以降の解析に用いた。対照ウイルスとして、季節性インフルエンザウイルス (H1N1 および H3N2) の実験室株および臨床株を *in vitro* 解析に含めた。

(3) 鳥型シアロ糖鎖 ($\alpha 2,3$ Sia) を模倣した $\alpha 2,3$ sialylglycopolymer とヒト型シアロ糖鎖 ($\alpha 2,6$ Sia) を模倣した $\alpha 2,6$ sialylglycopolymer を用いた receptor

binding assay (ELISA 法) を用いて、変異導入組み換えウイルスのシアロ糖鎖結合特異性を評価した。得られた結果から非線形フィッティングによって結合定数 (K_a) を算出して、各シアロ糖鎖に対する K_a (各シアロ糖鎖) / K_a ($\alpha 2,3$ SLN1) を各シアロ糖鎖に対する結合特異性の指標にした。

(4) 組換えウイルスを初代ヒト呼吸器上皮 (SAE) 細胞に感染させ、感染 72 時間後までに培養上清中に放出された子孫ウイルス量を real time RT-PCR 法と focus-forming assay によって定量した。また、変異ウイルス感染に起因する細胞変性効果を顕微鏡にて経時的に観察した。

(5) 組換えウイルスを CV-1 細胞に感染させ、pH 5.2 から 6.0 までの fusion buffer にて 3 分処理して low pH 依存性の膜融合能を活性化させることで、polykaryon を形成する pH 閾値を観察することで組換えウイルスの膜融合活性を測定した。

(6) HA 発現プラスミドを構築して 293T 細胞に発現させ、細胞における HA 変異体発現量を western blotting によって定量した。

(7) 組換えウイルスを熱処理し、HA 活性の減衰を経時的に HA assay によって測定した。熱崩壊による HA 機能の半減期を非線形フィッティングによって算出することで、ウイルスの飛沫伝播効率の指標となる HA の熱安定性を評価した。

(8) HA 機能変化がヒト呼吸器上皮細胞での増殖性に与える影響を特性化するために、上記解析において得られた変異ウイルス群のヒト型シアロ糖鎖結合特異性、膜融合活性、熱安定性と SAE 細胞での増殖性を散布図にプロットすることで相関係数を算出した。

(9) 5 週齢雌の BALB/c マウスに対して、10 倍段階希釈した変異ウイルス液を経鼻接種して体重減少と致死性を観察した。またウイルス接種後 3 日および 6 日目の肺をサンプリングすることで、肺中で増殖したウイルス量を focus-forming assay によって定量した。

4. 研究成果

(1) データベース解析の結果、感染患者由来ウイルス遺伝子配列にのみ検出された変異または、家禽由来遺伝子配列と比較して感染患者由来遺伝子配列に高頻度に検出された計 59 種類の変異群を同定した。また reverse genetics 法によって、当該変異を導入した組換えウイルス群を作出した。

(2) receptor binding assay の結果、変異ウイルス群の多くがヒト型シアロ糖鎖に対して有意に高い結合特異性を獲得していた。その効果は、 $\alpha 2,6$ SLN1 より $\alpha 2,6$ SLN3 に対してより顕著であった。対照的に、変異ウイルス群は $\alpha 2,3$ SLN3 に対する結合特異性を変化させなかった。これらの結果は、感染患者体内で選択された変異ウイルス群がより長いヒト型シアロ糖鎖に対する結合特異性を獲得する傾向にあることを示唆した。

(3) 変異ウイルス群の多くは、SAE 細胞にお

いてより効率的に増殖できるように変化していた。また変異ウイルス感染細胞において、ウイルス増殖に伴う強い細胞障害性が観察された。対照的に、家禽で選択された変異はSAE細胞における増殖性に影響しなかった。一方で、ヒト型シアロ糖鎖に対する結合特異性を獲得した変異ウイルスの全てがSAE細胞での増殖性を高めなかった。これらの知見は、ヒト呼吸器上皮細胞でのH5N1ウイルス増殖性がヒト型シアロ糖鎖結合特異性のみでは規定されないことを示唆した。

(4) HAの主な機能はレセプター糖鎖結合を介した細胞接着と膜融合を介したウイルスゲノムの細胞内放出である。そこでHAのもう1つの機能である膜融合活性に着目してさら解析を進めた。低pH依存性の膜融合活性を評価した結果、HA変異体がより高い膜融合pH閾値を獲得する傾向にあった。このことは、変異ウイルス群がより僅かなpH低下によって細胞膜と膜融合できる形質を獲得することを意味した。興味深いことに、SAE細胞での効率的な増殖性を示した変異ウイルスの全てが、ヒト型シアロ糖鎖結合特異性と膜融合pH閾値を同時に高く変化させた。

(5) ヒト由来293T細胞でのHA発現量をwestern blottingにて解析した結果、HA変異体の発現量がwild-typeと比較して同様または低下する傾向にあった。特に、膜融合pH閾値が高く変化したHA変異体の発現量は低下しており、僅かなpH値で構造変化が誘起する形質を獲得することで代償的に構造安定性が低下することが示唆された。これらの結果は、HA変異体の膜融合pH閾値の上昇が、蛋白質発現量が高く変化した結果(量的変化)ではなく、膜融合活性が上昇した結果(質的变化)であることを示した。

(6) 熱安定性試験の結果、膜融合pH閾値が高く変化した全てのHA変異体が熱安定性を低下させた。この結果は、膜融合活性が高く変化した変異ウイルスの飛沫伝播性が低下することを示唆した。

(7) データ値を散布図へプロットすることで、HA機能変化がSAE細胞でのウイルス増殖性に与える影響を解析した。その結果、変異ウイルス群のヒト呼吸器上皮での増殖性が、ヒト型シアロ糖鎖結合特異性および膜融合活性と正の相関性を示した。その一方で、ヒト呼吸器細胞での増殖性はHA構造安定性と負の相関性を示した。

(8) 以上の結果は、感染患者体内において選択されたHA変異ウイルスが、ヒト型シアロ糖鎖結合特異性と膜融合活性を高く変化させることで急速にヒト適応性を獲得することを示唆した。一方で、僅かなpH低下によって構造変化する形質を獲得することで、飛沫伝播性が低下する可能性が示唆された。これらの知見は、個体内でのウイルス増殖性と個体間での飛沫伝播性が異なる機序であることを提起すると共に、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構の全容を解明する

上で極めて有用な情報基盤を提起している。

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12件)

Watanabe Y, Arai Y, Kawashita N, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, Kajikawa J, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Ono T, Takagi K, Takahashi K, Shioda T, Matsumoto K, Suzuki Y, Nakaya T. Characterization of H5N1 influenza virus quasispecies with adaptive hemagglutinin mutations from single-virus infections of human airway cells. *J. Virol.* (査読有) [Epub ahead of print] (2018) DOI: 10.1128/JVI.02004-17

Sriwilaijaroen N, Nakahita S, Kondo S, Yagi H, Kato K, Murata T, Hiramatsu H, Kawahara T, Watanabe Y, Kanai Y, Ono T, Hirabayashi J, Matsumoto K, Suzuki Y. N-glycan structures of human alveoli provide insight into influenza A virus infection and pathogenesis. *FEBS J.* (査読有) [Epub ahead of print] (2018) DOI: 10.1111/febs.14431

Daidoji T, Watanabe Y, Arai Y, Kajikawa J, Hirose R, Nakaya T. Unique infection strategy of H5N1 avian influenza virus is governed by the acid-destabilized property of hemagglutinin. *Viral Immunol.* (査読有) 30(6):398-407 (2017) DOI: 10.1089/vim.2017.0020

Hirose R, Nakaya T, Naito Y, Daidoji T, Watanabe Y, Yasuda H, Konishi H, Itoh Y. Viscosity is an important factor of resistance to alcohol-based disinfectants by pathogens present in mucus. *Sci. Rep.* (査読有) 7:13186 (2017) DOI: 10.1093/infdis/jix224

Hirose R, Nakaya T, Naito Y, Daidoji T, Watanabe Y, Yasuda H, Konishi H, Itoh Y. Mechanism of human influenza virus RNA persistence and virion survival in feces: mucus protects virions from acid and digestive juices. *J. Infect. Dis.* (査読有) 216:105-109 (2017) DOI: 10.1093/infdis/jix224

Elgendy EM, Arai Y, Kawashita N, Daidoji T, Ibrahim MS, Nakaya T, Watanabe Y. Identification of polymerase gene mutations that affect viral replication in H5N1 influenza viruses isolated from pigeons. *J. Gen. Virol.* (査読有) 98:6-17 (2017) DOI: 10.1099/jgv.0.000674

Ono T, Oe T, Kanai Y, Ikuta T, Ohno Y, Maehashi K, Inoue K, Watanabe Y, Nakakita S, Suzuki Y, Kawahara T, Matsumoto K. Glycan-functionalized-FETs toward selective detection of human-infectious avian influenza virus.

Jpn. J. Appl. Phys. (査読有) 56:030302 (2017)

<https://doi.org/10.7567/JJAP.56.030302>

Arai Y, Kawashita N, Daidoji T, Ibrahim MS, El-Gendy EM, Takagi T, Takahashi K, Suzuki Y, Ikuta K, Nakaya T, Shioda T, Watanabe Y. Novel Polymerase Gene Mutations for Human Adaptation in Clinical Isolates of Avian H5N1 Influenza Viruses. *PLoS Pathog.* (査読有) 12:e1005583 (2016)

DOI: 10.1371/journal.ppat.1005583

Elgendy EM, Watanabe Y, Daidoji T, Arai Y, Ikuta K, Ibrahim MS, Nakaya T. Genetic characterization of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses isolated from naturally infected pigeons in Egypt *Virus Genes* (査読有) 52:867-871 (2016) DOI: 10.1007/s11262-016-1369-z

Hirose R, Daidoji T, Naito Y, Watanabe Y, Arai Y, Oda T, Konishi H, Yamawaki M, Ito Y, Nakaya T. Long term detection of seasonal influenza RNA in faces and intestinal tissue. *Clin. Microbiol. Infect.* (査読有) 22:813 (2016)

DOI: 10.1016/j.cmi.2016.06.015

渡邊洋平、大道寺智、中屋隆明、H5N1 鳥インフルエンザウイルス HA の宿主適応機構、ウイルス (査読有) 65(2):187-198 (2015)

DOI: 10.2222/jsv.65.187

Watanabe Y, Arai Y, Daidoji T, Kawashita N, Ibrahim MS, El-Gendy EM, Hiramatsu H, Kubota-Koketsu R, Takagi T, Murata T, Takahashi K, Okuno Y, Nakaya T, Suzuki Y, Ikuta K (2015) Characterization of H5N1 Influenza Virus Variants with Hemagglutinin Mutations Isolated from Patients. *mBio* (査読有) 6:e00081-15 (2015)

DOI: 10.1128/mBio.00081-15

[学会発表](計 29 件)

大道寺智、分化条件下における鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器上皮由来細胞株への感染様式について、7th Negative Strand Virus-Japan Symposium、2018

Watanabe Y. Adaptive change of H5N1 avian influenza virus circulating in Egypt. Interim workshop for project on infectious diseases in Vietnam and development of application in diagnosis, prevention and treatment, 2017

Arai Y. Identification of novel polymerase gene mutations for human adaptation in clinical isolates of avian H5N1 influenza virus in Asia. Interim workshop for project on infectious diseases in Vietnam and development of application in diagnosis, prevention and treatment, 2017

Watanabe Y. Changing nature of H5N1

avian influenza virus in Egypt. 2nd Kyoto International Symposium on Virus-Host Coevolution, 2017

Watanabe Y. Characterization of H5N1 influenza virus with HA mutations diversified in human airway epithelial cells as minor variants. JSPS Core-to-Core Program 2nd Scientific Seminar, 2017

Arai Y. Co-circulation of H9N2 and H5N1 avian influenza in Egypt and their reassortment potential. JSPS Core-to-Core Program 2nd Scientific Seminar, 2017

Daidoji T. Avian influenza virus infection in human airway epithelial cell model. JSPS Core-to-Core Program 2nd Scientific Seminar, 2017

Watanabe Y, Arai Y, Kawashita N, Daidoji T, Elgendy EM, Ibrahim MS, Kajikawa J, Hiramatsu H, Takagi T, Takahashi K, Shioda T, Suzuki Y, Nakaya T. Characterization of H5N1 influenza virus with HA mutations diversified in human airway epithelial cells as minor variants、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017

Arai Y, Kawashita N, Hotta K, Hoang MPV, Nguyen KHL, Nguyen TC, Vuong CD, Le MQ, Soda K, Kajikawa J, Daidoji T, Nakaya T, Takagi T, Ito T, Hasebe H, Shioda T, Watanabe Y. Novel polymerase gene mutations for human adaptation in clinical isolates of Avian H5N1 influenza virus in Asia、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017

Daidoji T, Noguchi M, Kajikawa J, Watanabe Y, Arai Y, Hirose R, Morimoto M, Nakaya T. Evaluation of avian influenza virus infection in differentiated airway epithelial cells、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017

Nakaya T, Hirose R, Daidoji T, Naito Y, Watanabe Y, Arai Y, Kawada K, Kajikawa J, Yamawaki M, Itoh Y. Mechanism of seasonal influenza virus persistence in human digestive tract: Mucus protects virions from acid and digestive juices、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017

Kajikawa J, Daidoji T, Watanabe Y, Arai Y, Hirose R, Nakaya T. Establishment of immortalized cell clones from human tracheal epithelial cells and their different susceptibility to influenza viruses、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017

Watanabe Y. Characterization of H5N1 influenza virus variants with adaptive mutations isolated from patients. The Sixth China-Japan Bilateral Symposium on All Influenza Viruses, 2017

Watanabe Y. Characterization of H5N1 influenza virus variants with HA

mutations selected during the viral replication in human airway epithelial cells. Egypt-Japan First Forum. The Year of Education and Research Collaboration, 2016

Watanabe Y. The Kaizen way to self-improvement. Egypt-Japan First Forum. The Year of Education and Research Collaboration, 2016

Arai Y. Novel polymerase gene mutations for human adaptation in clinical isolates for avian H5N1 clade 2.2.1 influenza viruses. Egypt-Japan First Forum. The Year of Education and Research Collaboration, 2016

Daidoji T. H7 influenza virus human infection and hemagglutinin acid stability. Egypt-Japan First Forum. The Year of Education and Research Collaboration, 2016

Watanabe Y, Arai Y, Daidoji T, Elgendy EM, Ibrahim MS, Takahashi K, Shioda T, Ikuta K, Suzuki Y, Nakaya T. Characterization of H5N1 influenza virus variants with HA mutations selected during the viral replication in human airway epithelial cells. 第64回日本ウイルス学会学術集会、2016

Arai Y, Kawashita N, Daidoji T, Ibrahim MS, Takayashi K, Suzuki Y, Nakaya T, Shioda T, Ikuta K, Watanabe Y. Novel polymerase gene mutations for human adaptation in clinical isolates of avian H5N1 influenza viruses. 第64回日本ウイルス学会学術集会、2016

Elgendy EM, Arai Y, Ibrahim MS, Daidoji T, Ikuta K, Nakaya T, Watanabe Y. Identification of unique mutations that influence the polymerase activity of H5N1 avian influenza virus isolated from pigeons. 第64回日本ウイルス学会学術集会、2016

②① Daidoji T, Elgendy EM, Watanabe Y, Arai Y, Ibrahim MS, Ikuta K, Nakaya T. Hemagglutinin acid stability and viral infection in H7 influenza virus. 第64回日本ウイルス学会学術集会、2016

② Watanabe Y. Novel Polymerase Mutations for Human Adaptation in Clinical Isolates of Avian H5N1 Influenza Viruses. *The 11th Japan-China International Conference of Virology*, 2016

②③ Daidoji T. H5N1 viruses broaden their cell tropism in humans. *The 11th Japan-China International Conference of Virology*, 2016

②④ 大道寺智, H7 鳥インフルエンザにおける HA 蛋白質の pH 感受性について、5th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2016

②⑤ Watanabe Y, Arai Y, Daidoji T, Ibrahim

MS, Elgendy EM, Takahashi K, Suzuki Y, Shioda T, Ikuta K, Nakaya T. Genetic diversification of H5N1 avian influenza virus variants during replication in human airway epithelial cells. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015

②⑥ Arai Y, Daidoji T, Ibrahim MS, Takahashi K, Suzuki Y, Nakaya T, Shioda T, Ikuta K, Watanabe Y. Identification of human adaptive mutations in the polymerase complex of H5N1 avian influenza virus in Egypt. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015

②⑦ Elgendy EM, Ibrahim MS, Arai Y, Daidoji T, Watanabe Y, Nakaya T. Genetic characterization of H5N1 avian influenza virus from pigeon in Egypt. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015

②⑧ Daidoji T, Elgendy EM, Watanabe Y, Ikuta K, Nakaya T. Hemagglutinin acid stability in H7 influenza virus infection to host cells. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015

②⑨ Nakamura S, Daidoji T, Honda T, Nakaya T, Komori T, Tomonaga K. Dynamics of influenza A virus infection in mucin-type glycosyltransferase Galnt3-knockout mice. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015

〔図書〕(計1件)

Watanabe Y. Glycan-mediated human adaptation of avian influenza viruses and pandemic control. *Glycoforum, Glycomicrobiology Now*, 2016

web page:
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycomicrobiology/glycoinfeE.html>

〔その他〕
ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 洋平 (WATANABE Yohei)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：50452462

(2) 研究分担者

鈴木 康夫 (SUZUKI Yasuo)
中部大学・生命健康科学部・客員教授
研究者番号：00046278

大道寺 智 (DAIDOJI Tomo)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80432433

(3) 連携研究者

荒井 泰葉 (ARAI Yasuha)
京都府立医科大学・医学研究科・博士研究員
研究者番号：80793182