

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08017

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスのヒト上気道粘膜上皮細胞への馴化機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms involved in the adaptation of avian influenza viruses to human upper airway epithelial cells

研究代表者

今井 正樹 (Imai, Masaki)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30333363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：鳥インフルエンザウイルスにどのような変異が生じれば、そのウイルスがヒト気道細胞で効率良く増殖するようになるのかを調べた。低病原性H7N9鳥ウイルスは、2009年のパンデミックウイルスと比較して増殖速度は遅いながらも分化ヒト気道細胞で増殖した。また、この細胞で培養したH7N9鳥ウイルスは、その増殖過程で5種類のウイルス遺伝子(PB2、HA、NA、M、NS)に変異が生じていた。2016年に中国で発生した高病原性H7N9鳥ウイルスの性状を明らかにする目的で、高病原性H7N9鳥ウイルスのヒト分離株の分化ヒト気道細胞における増殖能を解析した。その結果、同ウイルスは分化細胞において効率よく増殖した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、H7N9鳥インフルエンザウイルスのパンデミックポテンシャルの一端が明らかにされた。さらに、本研究の成果はH7N9鳥インフルエンザウイルスを起因とするパンデミックの出現予測や感染拡大阻止に役立つだけでなく、今後のインフルエンザ・パンデミック対策計画を策定、実施する上で、重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：The 1918 H1N1, 1957 H2N2, and 1968 H3N2 pandemic strains contained genes from avian influenza viruses. To understand the mechanisms by which avian influenza viruses adapt to human hosts, differentiated human airway epithelial (dHAE) cells were infected with a low pathogenic avian influenza (LPAI) H7N9 virus. The LPAI H7N9 virus had a titer approximately 1-2 log units lower than that of a 2009 H1N1 pandemic virus. Sequencing of the dHAE-grown LPAI H7N9 virus revealed that it acquired mutations in its PB2, HA, NA, M1, and NS genes. In 2016, human infections with highly pathogenic avian influenza (HPAI) H7N9 viruses were first detected in China. To assess the pandemic potential of HPAI H7N9 viruses, the replication capacity of two HPAI H7N9 viruses isolated from patients in 2016 and 2017 was examined. Both the human HPAI H7N9 isolates replicated efficiently in dHAE cells. This result suggests that the highly pathogenic H7N9 viruses have a pandemic potential.

研究分野：ウイルス学

キーワード：H7N9鳥インフルエンザウイルス 適応変異 ヒト気道上皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

20 世紀における 3 度の新型インフルエンザの世界的大流行 (1918 年のスペイン風邪、1957 年のアジア風邪、1968 年の香港風邪) では、鳥由来のインフルエンザウイルスがヒトに適応したウイルスに変化して出現し、大きな健康被害とそれに伴う社会経済活動の停滞をもたらされた。新型インフルエンザの大流行による健康被害を最小限に留めるためには、新型インフルエンザの候補である鳥インフルエンザウイルスに対する効果的な監視体制と、検出された鳥インフルエンザウイルスの公衆衛生上のリスク評価法を確立する必要がある。

### 2. 研究の目的

鳥インフルエンザウイルスは、感染した鳥からヒトに伝播することはあっても、感染したヒトからヒトに容易に伝播することはない。鳥インフルエンザウイルスがヒトの間で流行している季節性インフルエンザウイルスのように、咳やくしゃみ、会話などによって周囲のヒトに感染を広げていくためには、鼻腔や咽頭などの上気道で効率よく増殖できる能力を獲得することが必要である。

(1) 鳥インフルエンザウイルスは、どのようなアミノ酸変異を獲得した時に、季節性インフルエンザウイルスの主な感染部位であるヒト上気道 (鼻腔など) 上皮細胞において、鼻腔温度条件下 (33 °C) で効率よく増殖できるようになるのか、その詳細は不明なままである。本研究では、鳥インフルエンザウイルスのヒト上気道粘膜上皮細胞における増殖能を増強させるアミノ酸変異を明らかにすることを目的として、同細胞に馴化させた鳥インフルエンザウイルスを作出し、馴化の過程で生じたウイルスの遺伝子変化と増殖性状の関連を解析した。

(2) 一方、2016 年に高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が中国において確認された。しかし、この高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスの哺乳類に対する病原性・増殖性は明らかにされていなかった。高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスの性状解明は、今後のインフルエンザ対策を遂行する上で、緊急に取り組まなければならない課題である。そこで、患者から分離された高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヒト気道上皮細胞における増殖力を解析した。

### 3. 研究の方法

市販のヒト気管/気管支粘膜から単離された上皮細胞を用いた。in vivo のヒト気道と同様の形態になるように、気管/気管支粘膜上皮細胞を分化誘導剤のレチノイン酸存在下、トランスウェル膜を用いた気相-液相境界面で 1 ヶ月から 2 ヶ月間程度培養した。分化の程度は、線毛の軸糸を構成する蛋白質 (β-チューブリンなど) を蛍光抗体法で検出することで確認した。

水禽類から分離された低病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルス (A/duck/Gunma/466/2011) 並びに患者から分離された高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルス (A/Guangdong/17SF003/2016、A/Taiwan/1/2017) を用いた。また、対照の季節性ウイルスとして、2009 年にパンデミックを起こした H1N1 インフルエンザウイルスを用いた。

分化させたヒト気道細胞にウイルスを接種した後、ヒトの鼻腔内の温度である 33 °C で 4 日間培養した。細胞の頂端側 (apical) への子孫ウイルスの放出の有無をイヌ腎由来の MDCK 細胞によるブラック法で確認した。

### 4. 研究成果

(1) 低病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルス (A/duck/Gunma/466/2011) の分化ヒト気道細胞における増殖性を解析したところ、感染後 24、48、72、96 時間目における同ウイルスの感染価は、2009 年にパンデミックを起こした H1N1 インフルエンザウイルスと比較して、いずれの時間においても 10 分の 1 から 100 分 1 程度低かった (図 1)。感染後 4 日目に回収した低病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスの 8 種類の遺伝子 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS) について塩基配列を決定し、ウイルス蛋白質のアミノ酸配列を推定した。感染前の元のウイルスの配列と比較したところ、5 種類の遺伝子 (PB2、HA、NA、M、NS) に変異が生じていることがわかった。興味深いことに、分化ヒト気道上皮細胞で増やした A/duck/Gunma/466/2011 株は、NA タンパク質の C 末端側 191 残基が欠損していることが分かった。今後は、同定されたアミノ酸変異が低病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヒト気道細胞での効率のよい増殖にとって重要であるかどうかを検証するために、個々のアミノ酸変異を導入したウイルスを人工的に作出し、その増殖能を解析する必要がある。

(2) 2016 年に中国で発生した高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスの分化ヒト気道細胞における増殖性を解析した。2016 年に中国の患者から分離された高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルス A/Guangdong/17SF003/2016 を分化ヒト気道細胞に接種したところ、感染後 48、72、96 時間目における同ウイルスの感染価は、2009 年の H1N1 パンデミックインフルエンザウイルスと比較して、いずれの時間においても 10 分の 1 から 100 分 1 程度低かったものの、感染後 72、96 時間目において比較的高い感染価が検出された (図 1)。中国では A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) 株とは遺伝的に異なる株が多数分離されている。このこと

は性状の異なる高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスが中国において混在して流行している可能性を示している。そこで、A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) 株とは遺伝的に異なる 2017 年に台湾の患者から分離された高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルス (A/Taiwan/1/2017) についても分化ヒト気道細胞における増殖性を解析した。A/Taiwan/1/2017 株は、A/Guangdong/17SF003/2016 株と同様に感染後 96 時間目において高い感染価が検出された(図 1)。これらの成績は、ヒトから分離された高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスは、ヒト上気道細胞において効率よく増えることを示唆している。この成績は高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスがパンデミックを起こす可能性を持っていることを示唆している。

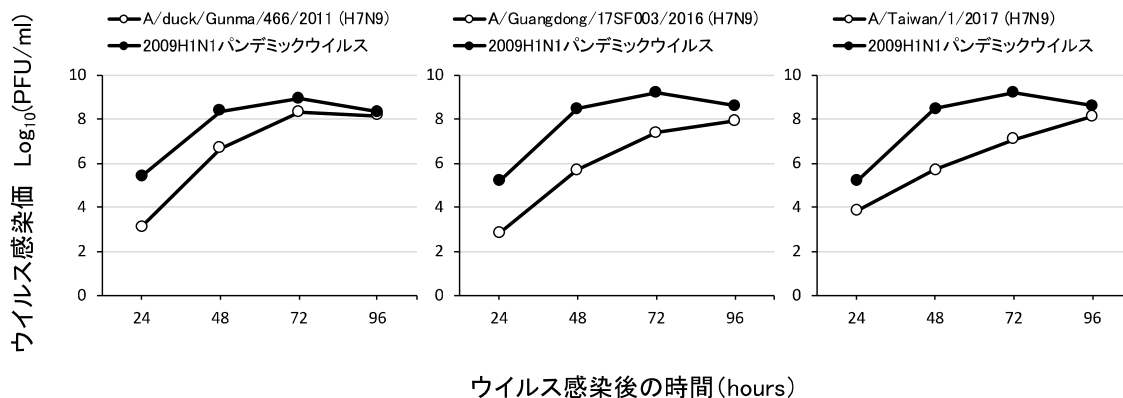


図1. 分化ヒト気道上皮細胞におけるH7N9鳥インフルエンザウイルスの増殖性  
H7N9鳥インフルエンザウイルスを分化ヒト気道上皮細胞に接種して、33°Cで4日間培養した。培養上清中のウイルスカ価をブランクアッセイにて測定した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

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. Emergence of Oseltamivir-Resistant H7N9 Influenza Viruses in Immunosuppressed Cynomolgus Macaques. *J Infect Dis* 216:582-593, 2017. doi: 10.1093/infdis/jix296.

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, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A highly pathogenic avian H7N9 influenza virus isolated from a human is lethal in some ferrets infected via respiratory droplets. *Cell Host & Microbe* 22:615-626, 2017. doi: 10.1016/j.chom.2017.09.008.

Hatta M, Zhong G, Gao Y, Nakajima N, Fan S, Chiba S, Deering KM, Ito M, Imai M, Kiso M, Nakatsu S, Lopes TJ, Thompson AJ, McBride R, Suarez DL, Macken CA, Sugita S, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Toohey-Kurth KL, Kawaoka Y. Characterization of a Feline Influenza A(H7N2) Virus. *Emerg Infect Dis.* 24:75-86, 2018. doi: 10.3201/eid2401.171240.

### 〔学会発表〕(計6件)

今井正樹、鳥インフルエンザウイルスの哺乳類間伝播機構、第31回 インフルエンザ研究者交流会のシンポジウム、2017年6月9日

今井正樹、中国で発生した高病原性 H7N9 鳥インフルエンザウイルスの性状解析、7th Negative Strand Virus-Japan Symposium、2018年1月15日

Masaki Imai, Characterization of a highly pathogenic avian H7N9 influenza virus、20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim、2018年1月10日、深セン、中国

今井正樹、特別企画 スペインかぜ大流行 100周年記念講演、第92回日本感染症学会学術講演会 第66回日本化学療法学会総会 合同学会、2018年6月1日

Masaki Imai, Characterization of a highly pathogenic avian H7N9 influenza virus、IMSUT-CAS Workshop on Infectious Diseases 2018、2018年10月9日

今井正樹、H7N9 鳥インフルエンザウイルスはヒトの間で大流行を起こすのか、第18回東北臨床感染症研究会、2019年1月26日

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。