

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10043

研究課題名(和文) 高病原性H5N1のシアル酸非依存的感染経路における新規受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of novel receptor in the sialic acid-independent infection of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus

研究代表者

梶原 直樹 (KAJIWARA, Naoki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主任研究員

研究者番号：70453917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000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は、ヘマグルチニンのプロテアーゼ開裂部位に膜透過性配列を有し、シアル酸欠損細胞にも感染可能である。本研究では、DNAマイクロアレイやハプロイドジェネティックスクリーニングを用いて、新規受容体の候補遺伝子(F2R、FZD、S1PR1)を見出した。これら受容体候補分子の過剰発現細胞を作製し、検証実験を実施したが、機能的な亢進は認められなかった。一方、欠損細胞での解析により、プロテオグリカンがシアル酸非依存的な細胞侵入に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な感染経路における受容体の同定を通じて、ウイルスの感染性の理解を深める点で学術的に非常に大きな意味を持つ。また、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染を予防、治療しうる分子的根拠を明らかにすることが可能であり、治療薬開発を通じて医療に貢献するばかりでなく、感染対策を講ずることにより社会的混乱や経済的損失の防止にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：H5N1 highly pathogenic avian influenza virus has multiple basic amino acids at cleavage site of hemagglutinin. This unique motif showed the cell-penetrating activity against various cells and lung tissues. In this study, we found the candidate genes of a novel receptor such as coagulation factor II thrombin receptor (F2R), frizzled class receptor (FZD), and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) using DNA microarray and haploid genetic screening. The candidate gene-overexpressed cells were prepared and validation experiments were carried out, but no functional enhancement was observed. On the other hand, the cell-penetrating activity was impaired in a mutant CHO cell line (pgsA745) that lacks xylosyltransferase activity. These findings suggest that proteoglycans may be involved in sialic acid-independent infection of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus.

研究分野：感染症学

キーワード：インフルエンザ H5N1 感染 シアル酸 ヘマグルチニン

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザの世界的大流行は、重大な健康被害と社会的混乱を引き起こす。1997年には、H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染が香港で報告され、感染者の半数以上が死亡している（致死率約 53%）。2003 年以降、中東やアフリカでもヒト感染例が確認されており、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの世界的大流行が懸念されているものの、その感染機構や病態形成機構は十分に解明されていない。

インフルエンザウイルスの感染には、ウイルス外膜糖蛋白質であるヘマグルチニン（HA）と細胞膜上のシアル酸の結合が重要である。トリを宿主とする H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染する機序は、「シアル酸への結合特異性」によって説明されてきた。つまり、トリとヒトではシアル酸の結合様式が異なり、通常、ヒトへの感染は起こらない。しかしながら、高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したトリとの濃厚接触などにより、ウイルスがヒトの下気道や肺胞に達した場合には、それら組織に発現するトリ型のシアル酸を介して感染が成立するという考え方である。一方で、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは、トリ型のシアル酸を欠失したヒトの気道上皮細胞にも感染できることが報告された。このことは、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染性を「シアル酸への結合特異性」のみで論じることが困難であることを示しており、別の概念が求められている。

我々は、免疫蛍光染色にてウイルスの感染能を評価し、H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスがシアル酸欠損細胞にも感染可能なことを見出した。一方、同じ H5N1 亜型の低病原性鳥インフルエンザウイルスは、シアル酸欠損細胞に感染できなかった。このことは、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスがシアル酸非依存的に感染可能なことを明確に示している。また、我々は H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスが HA のプロテアーゼ開裂部位に膜透過性ペプチドと類似の配列を有することに着目し、既知の感染受容体であるシアル酸を介さない新規感染経路を見出している。

2. 研究の目的

本研究は、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な感染経路の分子機構および宿主応答への影響を分子・細胞・個体レベルで明らかにすることを目的とする。シアル酸非依存的感染経路の分子機構および宿主応答への影響を明らかにすることで、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染性や高病原性の理解を深め、H5N1 亜型のウイルスの感染を阻害する薬剤の開発に貢献する。

抗インフルエンザ薬としてタミフルに代表されるノイラミニダーゼ阻害薬が繁用されており、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染による死亡率はタミフル処置によって 49%減少することが示されている。しかしながら、タミフルは発症後 48 時間以内に使用しなければならず、2005 年にはタミフル耐性の H5N1 株も確認されている。また、新規抗インフルエンザ薬として RNA ポリメラーゼ阻害薬の「アピガン」が 2014 年に承認されたが、催奇形性の副作用を抱えており、H5N1 株に対する効果は未知数である。これらの薬剤はいずれもウイルス蛋白質を標的としていることから、アミノ酸変異が生じやすいインフルエンザウイルスでは耐性株の出現は避けられない。ウイルスの感染に必要不可欠で、変異が生じ難い宿主因子を標的とすることで、耐性ウイルスが出現しにくい新規治療薬の開発が可能になると期待される。

3. 研究の方法

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染阻害薬の開発を目指すには、シアル酸非依存的な感染経路における受容体の同定が非常に重要である。それゆえ、下記の 3 点により H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な感染経路における新規受容体の同定に集中的に取り組む。

(1) DNA マイクロアレイを用いて受容体候補分子を絞り込む。これら分子の関与を明確にするため、受容体候補分子を過剰発現させたハプロイド細胞 (HAP1) およびヒトまたはマウス細胞を作製する。受容体候補分子の過剰発現細胞に HA ペプチドまたはインフルエンザウイルスを処置し、FACS、免疫蛍光染色などを用いて細胞内への侵入能を評価する。また、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を利用して受容体候補分子欠損株を作製し、裏付けとなるデータを取得する。

(2) ハプロイドジェネティックスクリーニングを用いて、受容体の候補を選別する (Carette JE et al, Nature. 477(7364): 340-3, 2011.)。具体的には、HAP1 細胞にジーントラップ用のレトロウイルスを感染させ、ランダムに遺伝子が破壊された細胞集団を作製する。セルソーターを用いて蛍光標識した HA ペプチドの細胞侵入能が抑制された細胞群を濃縮し、RACE 法、Whole

genome sequence により挿入遺伝子の位置を特定し、受容体候補分子を選別する。前述の機能的検証を行い、新規受容体を同定する。

(3) 受容体候補分子との相互作用を検討するため、インフルエンザウイルスまたは組換え HA タンパク質を処置した細胞を可溶化し、磁性ビーズを用いた免疫沈降法により、結合蛋白質を調べる。

4. 研究成果

(1) H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス由来の膜透過性 HA ペプチドの細胞内侵入能は、細胞によって強弱があるため、本性質を利用し受容体候補遺伝子を見出した。すなわち、膜透過性 HA ペプチドは、KU812 細胞には強く、HL-60 細胞に対しては弱い侵入能を示す。また、HL-60 細胞内には、HA ペプチドが侵入できる群とできない群が存在する。これらの結果に基づいて、各細胞における遺伝子発現を網羅的に調べ、20 種類の候補遺伝子を抽出した。20 種類の候補遺伝子のうち、HA ペプチドによる細胞内侵入能と遺伝子発現の相関が低い遺伝子を除外することにより、受容体候補遺伝子を 3 つ (Coagulation factor II thrombin receptor (F2R)、Frizzled class receptor 6 (FZD6)、Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1)) にまで絞り込むことができた (図 1)。受容体候補分子の機能的な検証のため、過剰発現細胞を作製し、HA ペプチドの細胞侵入能を検討したが、著明な影響は見られなかった。一方で、ゲノム編集技術を利用し遺伝子欠損細胞の作出を試みたが、タンパク質レベルの欠失が確認できず、受容体候補分子の欠損細胞を樹立することはできなかった。S1PR1 に対しては、受容体拮抗薬の効果も検討したが、未処置との間に顕著な差は見られなかった。

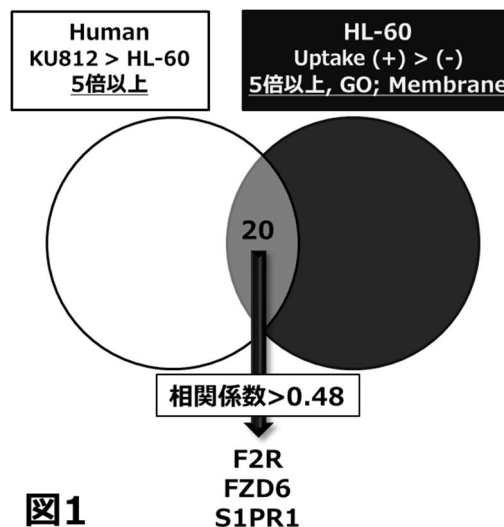
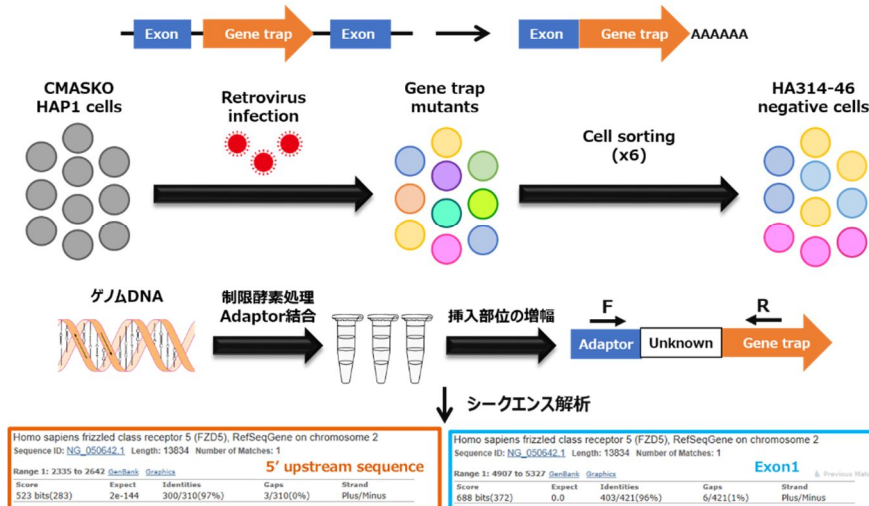


図 1

(2) 新たな受容体候補遺伝子を見出すために、HAP1 細胞とジーントラップ法を用いたハプロイドジェネティックスクリーニングを行った。HAP1 細胞にレトロウイルスを感染させ、ランダムに遺伝子が破壊された細胞集団を作製し、膜透過性 HA ペプチドの細胞侵入能が抑制された細胞群を濃縮した。RACE 法にて挿入遺伝子の位置を探索した結果、受容体候補分子として Frizzled class receptor 5 (FZD5) を見出した (図 2)。FZD5 を含む FZD ファミリーの過剰発現細胞を樹立し、機能的な検証を行ったが、細胞への侵入能に顕著な影響は認められず、新規受容体を同定することができなかった。また、Whole genome sequence によりプロモーターを持たないレポーター遺伝子の挿入位置の解析を試みたが、ゲノム DNA 上に挿入遺伝子がほとんど検出されず、新たな受容体候補分子を選別することはできなかった。さらに、DNA マイクロアレイにより、濃縮前の細胞集団と比較して、濃縮後の細胞集団で発現が低下している遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子の過剰発現細胞を作製し、機能的な検証を実施したが、いずれの細胞においても細胞内への侵入能の亢進は認められなかった。

Haploid genetic screening

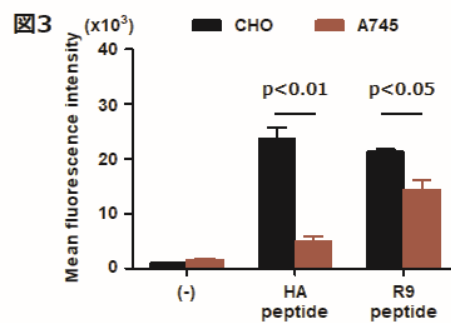
図 2



代表的な膜透過性ペプチドである TAT (47-57) やポリアルギニンとの配列類似性から、新規受容体の探索を進めた。HA ペプチドの細胞内侵入能は、プロテオグリカンを欠損する CHO 細胞

の変異体である pgsA745 細胞で抑制された (図 3)。この結果より、プロテオグリカンが HA ペプチドの細胞内への侵入に寄与している可能性が示唆された。

(3) H5N1 亜型の鳥インフルエンザウイルスまたはその変異株を感染させた細胞を可溶化し、抗ヘマグルチニン抗体および磁性ビーズを用いてヘマグルチニンと結合するタンパク質を濃縮した。細胞溶解液を電気泳動し銀染色を行ったが、特異的もしくは濃縮されたバンドは認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kajiwara Naoki, Nomura Namiko, Ukaji Masako, Yamamoto Naoki, Kohara Michinori, Yasui Fumihiko, Sakoda Yoshihiro, Kida Hiroshi, Shibasaki Futoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell-penetrating peptide-mediated cell entry of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74604-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原 直樹、山本 直樹、小原 道法、安井 文彦、迫田 義博、喜田 宏、芝崎 太
2. 発表標題 H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの膜透過性ペプチドを介した細胞侵入機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶原直樹、山本直樹、小原道法、安井文彦、芝崎太
2. 発表標題 H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な細胞侵入機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶原直樹、山本直樹、小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、芝崎太
2. 発表標題 H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な細胞侵入経路の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原直樹、山本直樹、小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、芝崎太
2. 発表標題 H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な細胞侵入機構
3. 学会等名 Conference for BioSignal and Medicine 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原直樹、野村奈美子、宇梶麻紗子、貞任大地、小原道法、安井文彦、芝崎太
2. 発表標題 高病原性トリインフルエンザウイルスH5N1のシアル酸非依存的感染機構
3. 学会等名 Conference for BioSignal and Medicine 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梶原直樹、野村奈美子、宇梶麻紗子、貞任大地、山本直樹、小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、芝崎太
2. 発表標題 H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な細胞侵入経路の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 梶原直樹、芝崎太	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社技術情報協会	5. 総ページ数 676
3. 書名 医薬品モダリティの特許戦略と技術開発動向	

〔産業財産権〕

〔その他〕

H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの新しい感染の仕組み
https://www.igakuken.or.jp/topics/2020/1022_2.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	芝崎 太 (SHIBASAKI Futoshi) (90300954)	公益財団法人東京都医学総合研究所・病院等連携研究センター・研究員 (82609)	
研究分担者	大保木 啓介 (OBOKI Keisuke) (80415108)	公益財団法人東京都医学総合研究所・病院等連携研究センター・副参事研究員 (82609)	削除：2019年3月18日

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小原 道法 (KOHARA Michinori) (10250218)	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・シニア研究員 (82609)	
連携研究者	田島 陽一 (TAJIMA Youichi) (00300955)	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員 (82609)	
連携研究者	野村 奈美子 (NOMURA Namiko) (50599694)	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任基盤技術研究職員 (82609)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------