

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590549

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスがヒトに適応するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding of mechanisms of avian influenza virus adaptation to humans.

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：H5N1インフルエンザウイルスが、ヒトで効率よく増殖・伝播するように変化することに関わるウイルス因子を明らかにするために、H5N1ウイルスが正常ヒト気管支細胞(NHBE)に適応する過程で獲得した変異について解析を行った。効率のよい増殖に寄与するヘマグルチニン(HA)の変異の一部は、ウイルスの熱安定性やpH依存的なHA蛋白質の膜融合能、および上部気道上皮細胞における細胞傷害活性に関与しており、より季節性ウイルスに近い性状へと変化していた。この成績は、H5N1ウイルスがヒト細胞で効率よく増殖する因子を同定するとともに、季節性ウイルスへと適応していくメカニズムの一端を説明するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To better understand how H5N1 influenza viruses could become to replicate and transmit efficiently among humans, we analyzed mutations occurred in H5N1 viruses through the adaptation to normal human bronchial epithelial (NHBE) cells. We found some HA mutations responsible for the efficient replication in NHBE cells affected thermal stability, fusion activity and cytotoxicity, suggesting such mutations might confer the phenotype of seasonal human viruses to avian H5N1 viruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ 適応

1. 研究開始当初の背景

H5N1 インフルエンザウイルスは、ヒトへの散発的な感染は起きているものの、ヒト間での効率の良い伝播は起きていない。インフルエンザウイルスがヒトからヒトに効率よく伝播するには、くしゃみや咳などにより拡散される必要があり、鼻などの上部気道で効率よく増殖することが重要である。そのためには、ウイルスの膜表面タンパク質の1つであるヘマグルチニン(HA)がヒトの上部気道に多く発現しているヒト型レセプターと結合することやウイルスのポリメラーゼがヒトの細胞で効率よく働くことなどが重要であると考えられている。しかし、一部のウイルスは、ヒト型レセプターの認識に関わる変異やヒト細胞でポリメラーゼが効率よく働くことに関する変異を有しているが、効率の良い伝播は起きていない。つまり、ヒト間の伝播には、それ以外の重要な因子があると考えられる。H5N1 ウイルスがヒトの間で流行を起こすには、更にヒトに適応し変異を獲得する必要あるが、どのように変化した場合、ヒト間で伝播するようになるのか、そのメカニズムを解明し、病原性がどのように変化するか解析することは、今後、新たなパンデミックを起こす可能性をもつ H5N1 ウイルスのリスク評価およびパンデミックの事前策を講ずる上で重要である。

2. 研究の目的

H5N1 インフルエンザウイルスがヒト細胞で効率よく増殖し伝播するためには、既存の変異以外には、どのようなウイルス因子が重要であるか明らかにし、そのメカニズムを明らかにすることでパンデミックに対する事前策に有用な知見を得る。

3. 研究の方法

- (1) 正常ヒト気管支細胞 (NHBE) 細胞に適応した H5N1 ウイルスで起きた様々な変異について、NHBE での高い増殖性に寄与する変異を同定する。
- (2) ヒト分離 H5N1 ウイルスについて、ヒト呼吸器上皮細胞での増殖性を調べ、よく増える株については、どのアミノ酸変異が高い増殖性に寄与しているか特定する。
- (3) (1)および(2)で同定した変異が起きること、レセプター特異性、熱安定性、膜融合、ウイルスポリメラーゼ活性、薬剤耐性、細

胞傷害活性等のウイルス性状がどのように変化したか解析する。

- (4) マウスやフェレット等を用いて、各変異の増殖性や病原性等への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト呼吸器上皮細胞での効率のよい増殖に関するアミノ酸変異の同定。

ヒト分離 H5N1 ウイルスおよびヒト気管支細胞(NHBE)馴化ウイルスについて、NHBE 細胞およびヒト肺胞上皮細胞(A549 細胞)における増殖性を調べ、高い増殖性に関するアミノ酸変異を同定した。その結果、レセプター結合を担う糖タンパク質であるヘマグルチニン(HA)やPB2、PAなどのウイルスポリメラーゼ複合体の構成蛋白質、マトリックス(M)タンパク質等における変異が、それぞれ独立して寄与することを明らかにした。

(2)PB2、PA 蛋白質における変異の機能解析

PB2、PA 蛋白質におきた各変異について、ヒト由来細胞(NHBE, 293 細胞)にて、ウイルスのポリメラーゼ活性への影響を調べたところ、いずれの変異についても変異の有無による顕著な差は認められなかった。ポリメラーゼ活性を上昇させる働きとは異なるメカニズムで関与していると思われる。

(3)HA 蛋白質における変異の解析

いずれの HA 蛋白質の変異においても、レセプター特異性への顕著な影響は見られなかった。しかし、一部の変異については、膜融合の際の指摘 pH に影響しており、より高い(より季節性のヒトインフルエンザウイルスに近い)pH で膜融合できるようになっていた。その変異は熱安定性を不安定化してしまうが、異なる変異が更に起きることで、熱安定性が回復することが明らかになった。

(4)変異ウイルスの細胞傷害活性の解析

NHBE 馴化ウイルスは NHBE 細胞において、親株に比べ低い細胞傷害活性を示した。そこで、呼吸気道に置いて、深部に位置する肺胞上皮細胞(A549)と上部にある鼻腔上皮細胞および 293 細胞について比較解析した。その結果、A549 細胞については、顕著な差がなかったが、鼻腔上皮細胞や 293 細胞においては、変異ウイルスが親株よりも低い細胞傷害活性を示した。なお、いずれの細胞においても、変異ウイルスが親株に比べ高い増殖性を示した。季節性ウイルスは、上部気道において、顕著な細胞傷害を示さずに、効率よく増殖すると考えられていることから、本研究の変異ウイルスにおける変化は、より上部気道で増えやすくなる、ヒト間の伝播形態に即した適応である可能性が示唆された。

(5) フェレットにおける病原性の評価

一部の変異ウイルスについては、既にフェレットを用いた病原性解析を実施していたため、そのデータを再評価した。その結果、細胞傷害活性低下等に関わる HA の変異は、フェレットにおいても病原性の低下に關与しうることが示唆された。

以上の成績は、H5N1 ウイルスがヒト細胞で効率よく増殖する因子を同定するとともに、ヒト以外を宿主とするインフルエンザウイルスが、季節性ウイルスへと適応していくメカニズムの一端を説明するものとする。

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 11 件)

1. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ozawa M, Ando T, Shoemaker JE, Ishikawa I, Yamada S, Neumann G, Watanabe S, Kitano H, Kawaoka Y. Nat Commun. 2015 Mar 25;6:6600. doi: 10.1038/ncomms7600. 査読有
2. Mammalian adaptive mutations of the PA protein of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus. Yamaji R, Yamada S, Le MQ, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y. J Virol. 2015 Apr;89(8):4117-25. doi: 10.1128/JVI.03532-14. Epub 2015 Jan 28. 査読有
3. Amino acids substitutions in the PB2 protein of H7N9 influenza A viruses are important for virulence in mammalian hosts. Yamayoshi S, Fukuyama S, Yamada S, Zhao D, Murakami S, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Neumann G, Kawaoka Y. Sci Rep. 2015 Jan 27;5:8039. doi: 10.1038/srep08039. 査読有
4. Identification of PB2 mutations responsible for the efficient replication of H5N1 influenza viruses in human lung epithelial cells. Yamaji R, Yamada S, Le MQ, Li C, Chen H, Qurnianingsih E, Nidom CA, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y. J Virol. 2015 Apr;89(7):3947-56. doi: 10.1128/JVI.03328-14. 査読有
5. Detection sensitivity of influenza rapid diagnostic tests. Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Yamada S, Uchida Y, Saito T, Takahashi K, Sugaya N, Tashiro M, Kawaoka Y. Microbiol Immunol. 2014 Oct;58(10):600-6. doi:10.1111/1348-0421.12185. 査読有
6. Detection sensitivity of influenza rapid diagnostic tests. Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Yamada S, Uchida Y, Saito T, Takahashi K, Sugaya N, Tashiro M, Kawaoka Y. Microbiol Immunol. 2014;58(10):600-6. doi: 10.1111/1348-0421.12185. 査読有
7. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. Yamayoshi S, Yamada S, Fukuyama S, Murakami S, Zhao D, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Macken C, Neumann G, Kawaoka Y. J Virol. 2014;88(6):3127-34. doi: 10.1128/JVI.03155-13. 査読有
8. Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. Gen F, Yamada S, Kato K, Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T. Arch

- Viol. 2013;158(5):1003-11. doi:
10.1007/s00705-012-1577-3. 査読有
9. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Nature. 2013; 501(7468):551-5. doi: 10.1038/nature12392. 査読有
10. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, Li C, Kawakami E, Yamada S, Kiso M, Suzuki Y, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Nature. 2012 May 2;486(7403):420-8. doi: 10.1038/nature10831. 査読有
11. Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010. Nidom CA, Yamada S, Nidom RV, Rahmawati K, Alamudi MY, Kholik, Indrasari S, Hayati RS, Iwatsuki Horimoto K, Kawaoka Y. Genetic characterization of H5N1

influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010. Virus Genes. 2012 Jun;44(3):459-65.doi:10.1007/s11262-012-0722-0. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

The American Society for Virology (ASV)
31st Annual Meeting. 平成24年7月21日～
27日 Monona Terrace Community and
Convention Center, Madison, USA.(口頭発表)

〔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：
出願年月日：
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：