

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450422

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの病原性発現におけるヘマグルチニン蛋白質の役割

研究課題名(英文) Roles of the hemagglutinin in pathogenicity of influenza virus

研究代表者

渡辺 登喜子 (Watanabe, Tokiko)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：60557479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：スペイン風邪ウイルスのHAが、病原性発現と宿主応答にどのように関わっているかを調べるために、スペイン風邪ウイルスのHAを持つ季節性ウイルス(以下、スペイン風邪HAウイルス)をマウスに感染させた。本ウイルスは、普通の季節性ウイルスと比べて、マウスの肺で効率よく増殖し、強い免疫反応を伴う致死性の肺炎を起こした。スペイン風邪HAウイルスを感染させたマウスの肺での宿主応答を調べたところ、ウイルス感染における急性期反応とプロテインユビキチネーション経路に関連する遺伝子群の発現上昇が顕著であった。以上の結果は、HAが、感染個体において強い免疫応答を誘導する因子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The 1918 pandemic influenza virus caused fatal pneumonia and an estimated 20-50 million deaths worldwide. To understand roles of the HA gene in efficient replication and high virulence of the 1918 virus, we examined the biological properties of reassortant viruses between the 1918 virus and a contemporary human H1N1 virus (A/Kawasaki/173/2001; K173) in a mouse model. In addition to the 1918 HA, we demonstrated the role of viral RNA replication complex in efficient replication of viruses in mouse lungs, whereas only HA gene is responsible for lethality in mice. Increased expression of genes associated with the acute phase response and protein ubiquitination pathway were enriched during 1918 and 1918HA/K173 infections. These data suggest HA and the viral RNA polymerase complex are critical determinants of 1918 influenza pathogenesis, but only HA is responsible for extreme host responses observed in mice infected with the 1918 influenza virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス ヘマグルチニン 病原性

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは毎年冬になると流行し、乳幼児や高齢者を中心に多くの犠牲者を出し、社会的な問題となっている。また、2009年に出現した新型インフルエンザウイルスのように、インフルエンザウイルスは数十年に一度世界的大流行（パンデミック）を引き起こし、甚大な被害をもたらす。1918年に起こったパンデミックは、スペイン風邪と呼ばれ、死亡者数4000万人以上という未曾有の被害を起こした。なぜ、それほどまでに、スペイン風邪インフルエンザウイルス（以下、スペイン風邪ウイルス）の病原性が強かったのか、その理由は分かっていない。最近の研究により、スペイン風邪ウイルスの表面糖蛋白質ヘマグルチニン（HA）が、病原性発現の鍵を握る可能性が示されたが、詳細なメカニズムについてはいまだに不明である。

2. 研究の目的

本研究では、1) スペイン風邪ウイルスのHA蛋白質の性状解析、および、2) スペイン風邪ウイルスのHA蛋白質を導入した宿主内（細胞および動物）で起こる反応を解析することによって、スペイン風邪ウイルスの病原性発現におけるHA蛋白質の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、スペイン風邪ウイルスの病原性発現におけるHA蛋白質の役割を明らかにすることを目的として、以下に挙げることを調べる。

1) スペイン風邪ウイルスのHA蛋白質は、他のウイルス株のHA蛋白質と比べて、その機能活性に違いはあるか？

HA蛋白質は、ウイルス感染初期の二つの重要なステップ - a) ウイルス粒子の細胞表面レセプターへの結合と、b) ウイルス膜と細胞膜の融合 - において重要な役割を果たす。ウイルス株によって、これらのHAの機能活性が違うことが知られている。そこで、本研究では、スペイン風邪ウイルスと他のウイルス株のHA蛋白質の性状解析を行う。HA蛋白質のレセプター結合活性、膜融合活性、HA蛋白質の安定性などを調べ、スペイン風邪ウイルスとその他の株において、HAの機能活性に違いがあるかどうかを明らかにする。

2) スペイン風邪ウイルスのHA蛋白質を導入した宿主（細胞および動物）では、どのような反応が起こっているのだろうか？

上述のように、スペイン風邪ウイルスのHAを持つウイルス（スペイン風邪ウイルスおよびリアソータントウイルス）を感染させたマウスでは、季節性ウイルスのHAを持つウイルスを感染させたマウスより、過剰な免疫反応が起こる。この結果は、スペイン風邪ウイルスのHA蛋白質が、感染個体において、強い自

然免疫を誘導する可能性を示している。実際、H2亜型のHA蛋白質を、ヒトやマウス由来の細胞に入れると、自然免疫が誘導されることが報告されている。そこで、本研究では、スペイン風邪ウイルスのHA蛋白質を宿主（細胞あるいはマウス）に導入した時に起こる宿主応答について調べる。スペイン風邪ウイルスと他のウイルス株のHA蛋白質を導入した細胞および動物における遺伝子発現パターンを比較検討することによって、スペイン風邪ウイルスのHA蛋白質が、他の株と比べて、より強い免疫応答を誘導するかどうかなど、ウイルス株間での宿主応答の違いを明らかにする。マウスモデルでは、病原性の違いについても検討する。

4. 研究成果

スペイン風邪ウイルスに加えて、2013年に中国においてヒトから分離されたH7N9インフルエンザウイルス（以下、H7N9ヒトウイルス）のHAの性状解析を行った。

まず、スペイン風邪ウイルスとH7N9ヒトウイルスのレセプター特異性をグリカンアレイ法によって調べた。対照として、季節性インフルエンザウイルス（以下、季節性ウイルス）と鳥から分離されたインフルエンザウイルス（以下、鳥ウイルス）を用いた。その結果、スペイン風邪ウイルスと季節性ウイルスは、ヒト型レセプターと結合し、鳥ウイルスは鳥型レセプターと結合した。それに対して、H7N9ヒトウイルスは、ヒト型と鳥型の両方のレセプターを認識した。

スペイン風邪ウイルスのHAが、病原性発現と宿主応答にどのように関わっているかを調べるために、スペイン風邪ウイルスのHAを持つ季節性ウイルス（以下、スペイン風邪HAウイルス）をマウスに感染させた。本ウイルスは、普通の季節性ウイルスと比べて、マウスの肺で効率よく増殖し、強い免疫反応を伴う致死性の肺炎を起こした。スペイン風邪HAウイルスを感染させたマウスの肺での宿主応答を調べたところ、ウイルス感染における急性期反応とプロテインユビキチネーション経路に関連する遺伝子群の発現上昇が顕著であった。以上の結果から、HAが、スペイン風邪ウイルスを感染させたマウスにおける強い免疫応答を誘導する因子であることが明らかとなった。

最近の研究から、スペイン風邪ウイルスに良く似た鳥インフルエンザウイルスが、いまだに野鳥間で流行している可能性が示唆された。そこで、スペイン風邪ウイルスに良く似た鳥ウイルス遺伝子を持つスペイン風邪類似鳥ウイルスを人工的に作出し、性状解析を行ったところ、本ウイルスの哺乳類動物モデルにおける病原性は、スペイン風邪ウイルスよりは低かったが、一般的な鳥インフルエンザウイルスよりも高いことが分かった。続いて、フェレットを用いて、スペイン風邪類似鳥ウイルスの飛沫伝播性試験を行ったと

ころ、スペイン風邪類似鳥ウイルスは、一般的な鳥ウイルスと同様に、フェレット間で飛沫伝播しなかった。

これまでの研究から、HAは、ウイルスポリメラーゼとともに、宿主特異性を決める重要な因子であることが示されている。そこで、鳥ウイルスがヒトの細胞に感染しやすくなるアミノ酸変異を有するHAとウイルスポリメラーゼを持つスペイン風邪類似鳥ウイルスを作出し、本ウイルスの飛沫伝播性を調べたところ、フェレットにおいて限定的ではあるが飛沫伝播することが分かった。さらに分子生物学的な解析の結果、これらのアミノ酸変異によって、スペイン風邪類似鳥ウイルスがヒト型レセプターに結合しやすくなり、また、ヒトの細胞で増殖しやすくなっていることが明らかとなった。

スペイン風邪ウイルスのPB2を持つスペイン風邪類似鳥ウイルス（以下、スペイン風邪PB2鳥ウイルス）をマウスに感染させ、病原性および宿主応答を調べる解析を行った。その結果、スペイン風邪PB2鳥ウイルスを感染させたマウスの肺では、強い免疫応答および炎症性反応が認められた。さらに我々はスペイン風邪ウイルスのPB2が、肺の修復過程に関与するWnt signaling pathwayに関わる遺伝子群の発現を抑えていることを示した。以上の結果から、スペイン風邪ウイルスの病原性発現において、HAだけでなくPB2も重要な役割を果たしており、それらのウイルス蛋白質の発現により宿主の肺における免疫反応のバランスが崩されることによって、肺障害が引き起こされることが示された。

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13件）

1. Yamayoshi S, Yamada S, Fukuyama S, Murakami S, Zhao D, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Macken C, Neumann G, Kawaoka Y. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. *J. Virol.* 88: 3127-34. 2014. doi: 10.1128/JVI.03155-13.
2. Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Einfeld AJ, Neumann G, Hase T, Ghosh S, Shoemaker JE, Lopes TJ, Watanabe T, Watanabe S, Fukuyama S, Kitano H, Kawaoka Y. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol.* 7:97. 2013. doi: 10.1186/1752-0509-7-97.
3. 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, Einfeld 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. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature.* 501:551-5. 2013. (*Equally contributed) doi: 10.1038/nature12392.
4. Watanabe T*†, Tisoncik-Go J*, Tchitchek N, Watanabe S, Benecke AG, Katze MG, Kawaoka Y†. 1918 Influenza virus hemagglutinin (HA) and the viral RNA polymerase complex enhance viral pathogenicity, but only HA induces aberrant host responses in mice. *J Virol.* 87: 5239-54. 2013. (*Equally contributed; †Corresponding author) doi: 10.1128/JVI.02753-12.
5. Uraki R, Kiso M, Shinya K, Goto H, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Takahashi K, Daniels RS, Hungnes O, Watanabe T†, Kawaoka Y†. Virulence determinants of pandemic A(H1N1)2009 influenza virus in a mouse model. *J Virol.* 87: 2226-33, 2013. (†Corresponding author) doi: 10.1128/JVI.01565-12.
6. Yamayoshi S, Fukuyama S, Yamada S, Zhao D, Murakami S, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Neumann G,

- Kawaoka Y. Amino acids substitutions in the PB2 protein of H7N9 influenza A viruses are important for virulence in mammalian hosts. **Sci Rep.** 5:8039. 2015.
7. **Watanabe T***, Kawakami E*, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, Kiso M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Katsura H, Nonaka N, Fujii H, Fujii K, Sugita Y, Noda T, Goto H, Fukuyama S, Watanabe S, Neumann G, Oyama M, Kitano H, Kawaoka Y. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. **Cell Host Microbe.** 16: 795-805. 2014. (***Equally contributed**)
 8. **Watanabe T***, Zhong G*, Russell CA*, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. **Cell Host Microbe.** 15: 692-705. 2014. (***Equally contributed**)
 9. Moncla LH, Zhong G, Nelson CW, Dinis JM, Mutschler J, Hughes AL, **Watanabe T**, Kawaoka Y, Friedrich TC. Selective Bottlenecks Shape Evolutionary Pathways Taken during Mammalian Adaptation of a 1918-like Avian Influenza Virus. **Cell Host Microbe.** 19:169-80. 2016.
 10. Hanson A, Imai M, Hatta M, McBride R, Imai H, Taft A, Zhong G, **Watanabe T**, Suzuki Y, Neumann G, Paulson JC, Kawaoka Y. Identification of Stabilizing Mutations in an H5 HA Influenza Virus Protein. **J Virol.** 90: 2981-90.
 11. Forero A, Tisoncik-Go J, **Watanabe T**, Zhong G, Hatta M, Tchitchek N, Selinger C, Chang J, Barker K, Morrison J, Berndt JD, Moon RT, Josset L, Kawaoka Y, Katze MG. The 1918 PB2 protein enhances virulence through the disruption of inflammatory and Wnt-mediated signaling in mice. **J Virol.** 90:2240-53. 2015.
 12. Shoemaker JE, Fukuyama S, Einfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, **Watanabe T**, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y. An Ultrasensitive Mechanism Regulates Influenza Virus-Induced Inflammation. **PLoS Pathog.** 11(6):e1004856. 2015.
 13. Yamayoshi S, Fukuyama S, Yamada S, Zhao D, Murakami S, Uraki R, **Watanabe T**, Tomita Y, Neumann G, Kawaoka Y. Amino acids substitutions in the PB2 protein of H7N9 influenza A viruses are important for virulence in mammalian hosts. **Sci Rep.** 5:8039. 2015.
- [学会発表] (計17件)
1. **渡辺登喜子** 中国でヒトから分離されたH7N9鳥インフルエンザウイルスについて 第27回インフルエンザ研究者交流会シンポジウム、2013年6月28-30日、北海道大学獣医学部 (札幌市)
 2. **渡辺登喜子**、今井博貴、村上晋、中島典子、富田有里子、山吉誠也、浦木隆太、西藤岳彦、内田裕子、長谷川秀樹、田代真人、河岡義裕 中国で分離されたH7N9鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸国際会議場 (神戸市)
 3. **渡辺登喜子** 昨今のインフルエンザ事情、

- 福岡呼吸器アーベント、2013年11月19日、九州大学（福岡市）
4. 渡辺登喜子 鳥インフルエンザウイルスの脅威、第2回NINS Colloquium（自然科学研究機構）、2013年12月16-17日、ヤマハリゾート（静岡県掛川市）
 5. 渡辺登喜子 H7N9インフルエンザウイルスについて、第1回バイオセキュリティワークショップ、2013年1月25日、慶応大学（東京）
 6. Watanabe T. Pandemic Potential of H7N9 influenza A Viruses Isolated from Humans. 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム、2014年1月20-22日、仙台国際センター（仙台市）
 7. 渡辺登喜子 インフルエンザ感染における宿主因子の役割 インフルエンザを制圧する、2014年2月17日、東京大学医科研究所（港区）
 8. 渡辺登喜子 インフルエンザウイルスの感染動物モデル～フェレット編～、第61回日本実験動物科学技術さっぽろ2014、2014年5月15-17日、札幌コンベンションセンター（札幌市）
 9. 渡辺登喜子 インフルエンザA(H7N9)ウイルスの性状について、衛生微生物技術協議会第35回研究会、2014年6月26-27日、タワーホール船橋（東京都江戸川区）
 10. 渡辺登喜子 中国における人のH7N9亜型鳥インフルエンザウイルス感染の現状、第157回獣医学会学術集会、2014年9月9-12日、北海道大学（札幌市）
 11. 渡辺登喜子 鳥インフルエンザウイルスパンデミックの可能性、生理学研究所一般公開、2014年10月4日、生理学研究所（岡崎市）
 12. 渡辺登喜子、Gongxun Zhong, Colin A. Russell, 中島典子、八田正人、Anthony Hanson,高橋健太、渡辺真治、今井正樹、長谷川秀樹、河岡義裕 スペイン風邪ウイルスに類似の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、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月23-25日、札幌コンベンションセンター（札幌市）
 13. 渡辺登喜子 インフルエンザウイルス増殖に関わる宿主因子の同定～抗ウイルス薬開発への応用～、第4回バイオガレッジセミナー～RNAウイルス研究の最前線～、2014年12月15日、株式会社リバネス（東京都新宿区）
 14. 渡辺登喜子 インフルエンザウイルスの病原性発現機構の解析、大阪大学微生物病研究所、2015年2月12日、大阪大学微生物病研究所（大阪府吹田市）
 15. 渡辺登喜子 インフルエンザウイルス感染における宿主因子の役割、第29回インフルエンザ研究者交流の会、2015年5月22-23日、東京大学医科学研究所（東京都港区）

16. Watanabe T. Kawakami E Identification of host factors involved in influenza virus replication, Negative strand virus meeting 2015, 2015年6月14-19日、Siena, Italy
17. Watanabe T. Host-virus interactions in influenza virus replication, The 14th Awaji international forum on infection and immunity, 2015年9月8-11日、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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

渡辺登喜子 (Tokiko Watanabe)

東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス感染分野・特任准教授

研究者番号：60557479