

H5N1 およびパンデミックウイルスのウイルス学的解析

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスがアジアの家禽で蔓延しておりヒトへの感染も続いている中、本研究二年度目初頭の平成 25 年春、中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染した。現在も感染者が増え続け、次のパンデミックに発展する危険性が懸念されている。本研究では、初年度に H5N1 ウイルスのオセルタミビル耐性獲得のメカニズムを、二、三年度目に H7N9 ウイルスの性状を解析した。H5N1 ウイルスの NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸変異がウイルスとオセルタミビルの結合親和力を弱め、生体内でのオセルタミビル感受性を低下させていることを明らかにした。また、H7N9 ウイルスのマウスを用いた病原性解析では、H7N9 ウイルスが通常の鳥の H7 ウイルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも病原性が強いことを明らかにした。さらに、H7N9 ウイルス感染者は高齢男性に多く、喫煙歴や慢性呼吸器疾患の合併が見られることが特徴であることから、喫煙マウスモデルを用いて喫煙と H7N9 ウイルス感染との関連を解析した。その結果、タバコ煙暴露群はコントロールの空気暴露群と比較して H7N9 ウイルス感染に対して抵抗性を示すことが分かった。

本研究で得られた成果は、H5N1 ウイルスおよび H7N9 ウイルスの監視をする上で重要であるのみならず、感染者を治療する際にも有用な情報となる。

A . 研究目的

・ H5N1 ウイルスのウイルス学的解析

抗インフルエンザ薬のオセルタミビルは、インフルエンザの治療に広く使われている。近年、NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸のイソロイシンからバリンへの変異が、オセルタミビル耐性に関与することが明らかになってきた。しかし 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビル治療中に出現したのではなく、家禽からの分離株で見つかったものであり、その耐性機序は不明な点が多い。そこで、117 番目のアミノ酸変異による耐性化のメカニズムを明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

・ H7N9 ウイルスのウイルス学的解析

平成 25 年春、中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルス感染者が発生した。この H7N9 ウイルスは、ヒトからヒトへの伝播はほとんど起こっていないが、死亡例や重症化例が多数確認された。さらに平成 27 年に入ってから感染者が急増しており、次のパンデミックに発展する危険性が懸念されている。H7N9 ウイルス感染例の疫学的な特徴として、高齢男性での感染例が多く、喫煙歴や慢性呼吸器疾患の合併が見られた。そこで、ヒトから分離された H7N9 ウイルスの哺乳類における病原性、および喫煙と H7N9 ウイルス感染との関連を検討した。

B . 研究方法

・ H5N1 ウイルスのウイルス学的解析

本研究では、遺伝的背景の異なる H5N1 ウイルス 3 株 [A/Vietnam/1203/2004 (VN1203, クレード 1), A/duck/Vietnam/ TY114/2007 (TY114, クレード 2.3.4), A/Vietnam/UT31412II/2008 (VN31412, クレード 2.3.4)] を用いた。

各ウイルスの NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸を、イソロイシンからバリンに変えたウイルス (NA-I117V) を作製した。これらのウイルスの NA 酵素活性やオセルタミビル感受性を、in vitro、in vivo および in silico で、それぞれの親株と比較解析した。

・ H7N9 ウイルスのウイルス学的解析

中国の患者から分離された H7N9 ウイルス (A/Anhui/1/2013(H7N9); Anhui/1) のマウスにおける感染性・病原性を、2009 年のパンデミックウイルス (A/California/04/2009(H1N1pdm09); CA04) および中国の患者から分離された H7N9 ウイルスとは別系統の H7N9 ウイルス (A/duck/Gunma/466/ 2011(H7N9); DK/GM466) と比較解析した。

さらに、喫煙曝露システムを用いて 180 日間のタバコ煙曝露を C57BL/6 マウスにおこない、喫煙マウスモデルと、コントロールとして空気曝露群を作製した。Anhui/1 株を経鼻感染し、14 日間の体重モニタリングと、感染 2 日目と 5 日目に肺を採取しウイルス力価の測定、病理解析、マイクロアレイ解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

動物実験は、東京大学医科学研究所実験動物委員会の承認のもと、東京大学動物実験規則に従って実施した。

C . 研究結果

・ H5N1 ウイルスのウイルス学的解析

in vitro において、NA-I117V 変異による NA 酵素活性は 3 株とも親株と比べ大きな変化はなかったが、オセルタミビル感受性は 1.3-6.3 倍と、わずかであるが低下した。

in vivo では、マウスにおけるオセルタミビル感受性試験により、VN1203 NA-I117V ウイルスと VN31412 NA-I117V ウイルスの 2 株で、親株に比べ感受性が低下した。

さらに、in silico では、分子動力学シミュレーションにより、NA-I117V の変異が NA 蛋白質の 118 番目のアルギニンと、オセルタミビルのカルボキシル基との水素結合を弱め、ウイルスとオセルタミビルの結合親和力の低下をもたらすことが示唆された。

これらの結果から、NA の 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビルとウイルスの結合

親和性を弱めることにより、生体内でのタミフル感受性を低下させていることが明らかとなった。

・H7N9 ウイルスのウイルス学的解析

ヒトから分離された Anhui/1 のマウスにおける体重減少および致死率は、鳥から分離された GM466 並びに 2009 年のパンデミックウイルス CA04 よりも高いことが明らかとなった。また、Anhui/1 および CA04 の感染後 3 日目の肺および鼻甲介のウイルス力価は、GM466 よりわずかであるが高かった。このことから、中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのマウスでの病原性は、通常の鳥のウイルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも強いことが明らかとなった。

喫煙マウスモデルでの解析では、感染前のタバコ煙暴露群の肺には炎症細胞の浸潤がみられたが、慢性閉塞性肺疾患(COPD)に特徴的な肺胞壁の破壊は顕著ではなかった。H7N9 ウイルス感染後は、タバコ煙暴露群に比較して空気暴露群の方が体重減少が大きく、生残率も低かった。一方で、肺のウイルス力価は両群間に明らかな差は認められなかった。組織学的解析では、両群ともに気管支上皮と肺胞にウイルス感染細胞が分布していたが、炎症細胞の分布を比較すると、空気暴露群のほうが、気管支周囲の炎症細胞の浸潤が強かった。この組織学的な相違について検討するために、肺の遺伝子発現解析をおこなった結果、空気暴露群では、感染 2 日目と 5 日目にウイルス感染によって多くの遺伝子発現の変動がみられたが、タバコ煙暴露群では少数の遺伝子だけが発現変動していた。さらに、細胞浸潤に関連するケモカイン CCL24 と CXCL3 は、空気暴露群では発現上昇していたが、タバコ煙暴露群では、ほとんど変化していなかった。

D . 考察

本研究により、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの NA-I117V によるオセルタミビル耐性メカニズムの新たな知見が得られた。今後、H5N1 ウイルスに感染した患者を治療する際にも本研究で得られた情報は有用となる。

また、中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのマウスにおける病原性が、2009 年にパンデミックをおこしたウイルスよりも強いことが明らかとなった。

喫煙マウスは、我々の予想に反して、H7N9 ウイルスの攻撃に対して抵抗性を示した。H7N9 ウイルス感染による気管支の炎症に対して、タバコ煙暴露による抑制効果が示唆された。タバコ煙暴露は、H7N9 ウイルス感染によるケモカインの発現誘導を阻害する可能性が示唆された。

E . 結論

本研究で得られた成果は、H5N1 ウイルスおよび H7N9 ウイルスの監視をする上で重要であるのみならず、感染者を治療する際にも有用な情報となる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le MQ, Sekijima M, Ito K, Takada A, kawaoka Y. Molecular

mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the neuraminidase of subtype H5N1 avian influenza A viruses. *J Infect Dis* 207:89-97, 2013.

Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. *J Infect Dis* 207:262-271, 2013.

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, Shiraikura 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* 26:551-555, 2013.

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** 88:3127-3134, 2014.

Neumann G, Macken CA, Kawaoka Y. Identification of amino acid changes that may have been critical for the genesis of A(H7N9) influenza viruses. **J Virol** 88:4877-4896, 2014.

Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Yamada S, Uchida Y, Saito T, Takahashi K, Sugaya N, Tashiro M, Kawaoka Y. Detection sensitivity of influenza rapid diagnostic tests. **Microbiol Immunol** 58:600-606, 2014.

2 . 学会発表

坂井(田川)優子、高山育代、影山勉、内田裕子、西藤岳彦、田代真人、河岡義裕「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは迅速診断キットで判定可能か？」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

G . 知的所有権の取得状況

該当なし