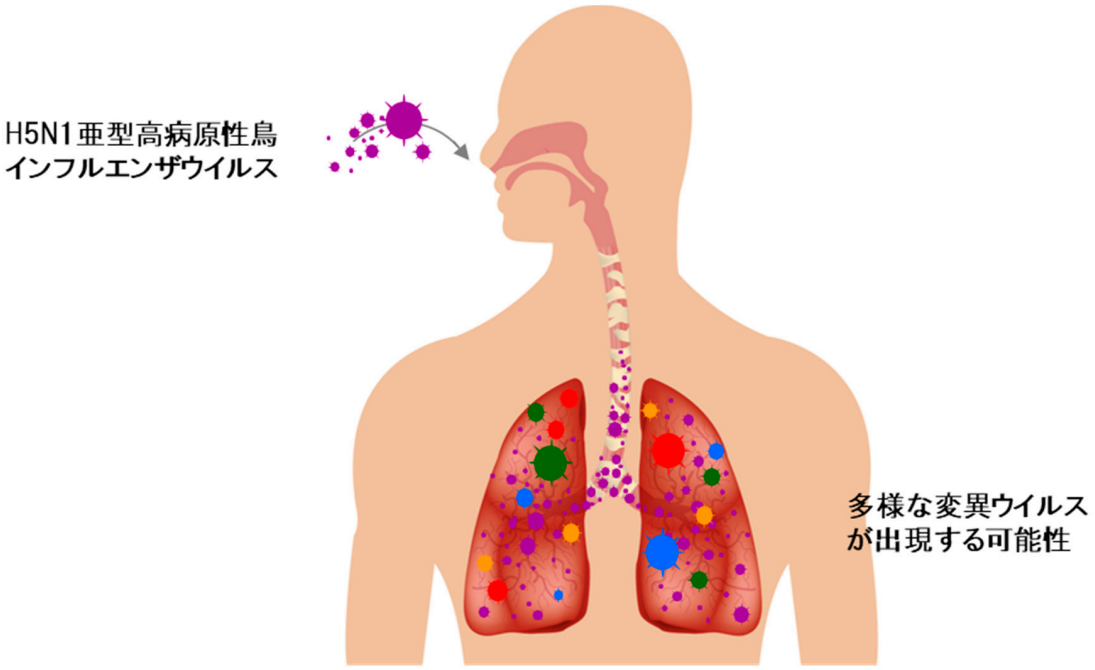
162　インフルエンザウイルスのヒト適応化分子機構の解明	渡邊　洋平

【目的】H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1 ウイルス）は現在、アジア・アフリカ地域において鳥類で伝播を繰り返す常在域を獲得している。当該地域における鳥間または鳥ーヒト間のウイルス伝播の過程で、H5N1 由来新型インフルエンザウイルスが出現する可能性が指摘されている。そのため、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構を先駆的に解明することは、より効果的なパンデミックインフルエンザ対策を施策する上で極めて重要である。本研究では、インフルエンザウイルスの感染性を決定する表面抗原の HA に着目して、H5N1 ウイルスが初代ヒト呼吸器上皮細胞での複製過程において獲得する HA 変異群を探索すると共に、選択された変異がウイルス性状変化に与える影響を評価することで、鳥インフルエンザウイルス宿主適応機構の分子基盤を解明することを目的とした。
【方法】H5N1 ウイルスを初代ヒト呼吸器上皮細胞に感染させ、感染 96 時間後までに生み出された子孫ウイルス集団における HA 遺伝子多型を網羅的に探索した。リバースジェネティクス法に基づいて、同定された 32 種類の変異を導入した組換え H5N1 ウイルスを作出することで、当該ウイルス群が獲得したレセプター糖鎖結合特異性、膜融合 pH 閾値、ヒト呼吸器細胞での増殖性と飛沫伝播性の指標となる熱安定性を解析した。
【結果】H5N1 ウイルスがヒト呼吸器上皮細胞での複製過程において、ヒト型レセプター糖鎖と膜融合活性を高く変化することで、急速にヒト細胞感染性を獲得することが明らかとなった。また、H5N1 ウイルスにおいては、ヒト生体局所環境での細胞感染性と個体間の伝播性が一義的にバランス関係にあることが示された。これらの知見は、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構の全容を解明する上で極めて有用な情報基盤を提起している。

H5N1 ウイルスがヒト呼吸器細胞で複製する過程において、様々な HA 変異ウイルス群が出現する



162. インフルエンザウイルスのヒト適応化分子機構の解明

渡邊　洋平

京都府立医科大学 大学院医学研究科 感染病態学

Key words：インフルエンザウイルス，ヒト適応機構，変異選択

緒　言

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス（以下、H5N1 ウイルス）は現在、アジア・アフリカ地域において鳥類で伝播を繰り返す常在域を獲得している。当該地域では感染鳥との濃厚接触によるヒト感染事例が継続して報告されており、重度の呼吸器疾患を病因とする高い致死率（約 60%）が重大な社会問題となっている。また家禽・家畜と隣り合わせで暮らす風土から、当該地域から H5N1 由来新型インフルエンザ（パンデミック）ウイルスが出現する可能性が指摘されている。パンデミックウイルス出現が社会に及ぼす影響は、2009 年の H1N1 pdm の事例からも明らかなように世界規模かつ重大である。そのため、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構を先駆的に解明することは、より効果的なパンデミックインフルエンザ対策を施策する上で極めて重要である。

H5N1 ウイルスのヒト適応化機構の詳細は未解明である。最近、H5N1 ウイルスをフェレットで継代することで飛沫感染能の高い変異ウイルスが作出可能と報告された［1, 2］。このことは、H5N1 ウイルスが予想より遥かに少ない遺伝子変異を獲得することでパンデミック化する可能性を示唆している。一方で、先行研究の中心はフェレットやマウスを用いた変異選択試験である。そのため、ウイルスのヒト適応化機構の全容解明には、ヒト生体内のウイルス複製動態を反映した新しいアプローチに基づく解析が必要な状況にある。

私たちはこれまで、マスデータ解析の手法に基づいて H5N1 ウイルスが感染患者体内で獲得したと推定される遺伝子変異群を同定してきた［3, 4］。本研究では、インフルエンザウイルスの感染性を決定する表面抗原の Hemagglutinin（HA）に着目して、H5N1 ウイルスが初代ヒト呼吸器上皮細胞での複製過程において実際に獲得する HA 変異群を網羅的に探索すると共に、選択された変異がウイルス性状変化に与える影響を網羅的に評価することで、鳥インフルエンザウイルス宿主適応機構の分子基盤を解明することを目的とした。その結果、H5N1 ウイルスがヒト型レセプター糖鎖と膜融合活性を高く変化することでヒト細胞感染性を急速に獲得することが明らかとなった。また、H5N1 ウイルスにおいては、ヒト生体局所環境での細胞感染性と個体間の伝播性が一義的にバランス関係にあることが示された［5］。

方法および結果

1. ヒト呼吸器での複製過程で選択されるウイルス変異群の同定

H5N1 ウイルスを初代ヒト呼吸器上皮（small airway epithelial: SAE）細胞に感染させ、大部分の細胞集団に感染拡大する感染 96 時間後までに生み出された子孫ウイルスの HA 遺伝子配列を RT-PCR 法によって増幅後にクローニングした。得られたコロニーを無作為に 30 個選択肢して Sanger sequencing することで、子孫ウイルス集団に含まれる HA 遺伝子多型を網羅的に評価した（図 1A）。対照として鶏胚線維芽細胞（CEF）を用いて鳥細胞での複製過程で選択されるウイルス遺伝子多型を評価した。試験は各細胞で独立 4 回実施した。その結果、SAE 細胞で特異的に選択された計 32 種類の HA 遺伝子変異群が同定された。その内訳は、HA head 領域と HA stalk 領域（図 1B）にそれぞれ 19 種類と 13 種類であった。

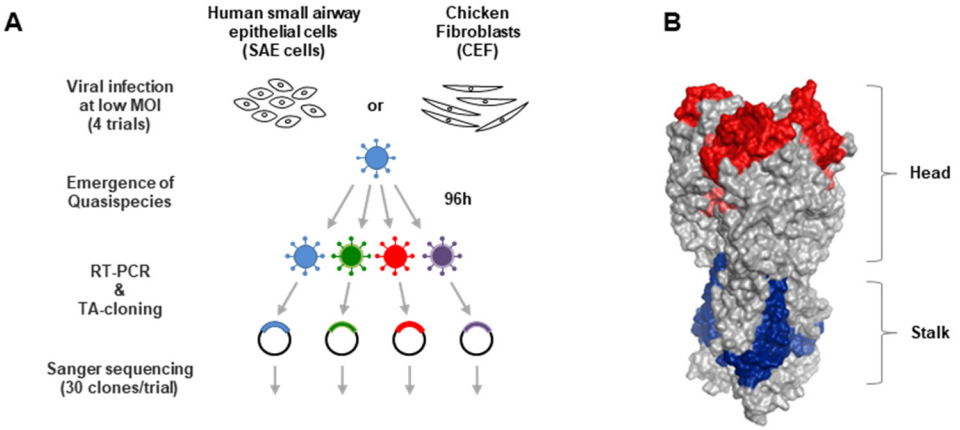


図 1. 本研究における解析方法の概要

（A）H5N1 ウイルスをヒト初代呼吸器（SAE）細胞または対照として鶏胚線維芽細胞（CEF）に感染させ、感染 96 時間までに出現した子孫ウイルス集団における HA 遺伝子多型を Sanger sequencing によって解析した。（B）HA 三量体構造モデル。解析の結果、ヒト呼吸器細胞での複製過程で選択された計 32 種類の HA 変異群（HA head 領域に 19 種類と HA stalk 領域に 13 種類）が同定された。

2. 変異導入組換え H5N1 ウイルスの作出

Site-directed mutagenesis によって変異導入プラスミドを作製すると共に、リバースジェネティクス法を用いて選定した 32 種類の変異をそれぞれ導入した組換え H5N1 ウイルス群を作出した。プラスミドを 293T 細胞に導入後、培養上清を発育鶏卵に接種することで、シードウイルスを回収して以降の解析に使用した。

3. 変異ウイルス群のレセプター糖鎖結合特異性の解析

ヒト型レセプター糖鎖を模倣したα2,6 sialylglycopolymer と鳥型レセプター糖鎖を模倣したα2,3 sialylglycopolymer を用いた receptor binding assay［3］（ELISA 法）によって、32 種類の変異ウイルスを対象にヒト型レセプター糖鎖および鳥型レセプター糖鎖結合親和性を解析した。得られたデータから非線形曲線フィッテングにより結合定数（*Ka*）を算出後、ヒト型糖鎖に対する *Ka*/鳥型糖鎖に対する *Ka* をヒト型レセプター糖鎖結合特異性の指標とした。32 種類の変異群の中で、HA head 領域における変異群の全てがウイルスのヒト型レセプター糖鎖結合特異性を有意に高めた（図 2）。一方で、変異ウイルスが獲得したヒト型レセプター糖鎖結合特異性は、季節性インフルエンザウイルス（H1N1 および H3N2）と比較すると依然として低かった。

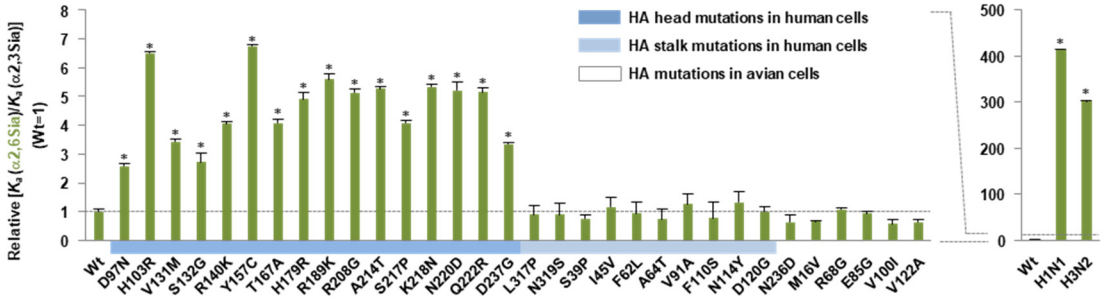


図 2. 変異ウイルス群が獲得したヒト型レセプター糖鎖結合特異性

ヒト型レセプター糖鎖（α2,6Sia）を模倣したα2,6 sialylglycopolymer と鳥型レセプター糖鎖（α2,3Sia）を模倣したα2,3 sialylglycopolymer を用いた ELISA 法により各糖鎖に対する結合定数（*Ka*）を算出することで、*Ka*（α2,6Sia）/*Ka*（α2,3Sia）をヒト型レセプター糖鎖結合特異性の指標とした。対照として、ヒトで流行する季節性インフルエンザウイルス（H1N1 および H3N2）のレセプター結合特異性を解析した。

*$P < 0.01$（Tukey's multiple-comparison test）。

4. 変異ウイルス群の膜融合活性の解析

HA の主な機能は、レセプター糖鎖結合を介した宿主細胞への接着と膜融合を介したウイルスゲノムの細胞内放出である［6］。そこで、32 種類の変異導入 HA 発現プラスミドを Vero 細胞に導入後、低 pH 依存性に誘導される膜融合に起因した多核巨細胞を観察することで、膜融合を誘起した pH 閾値を解析した。32 種類の変異群の中で、HA head 領域および HA stalk 領域における変異群の多くが、より僅かな pH 低下により膜融合を誘導するように変化した（図 3）。

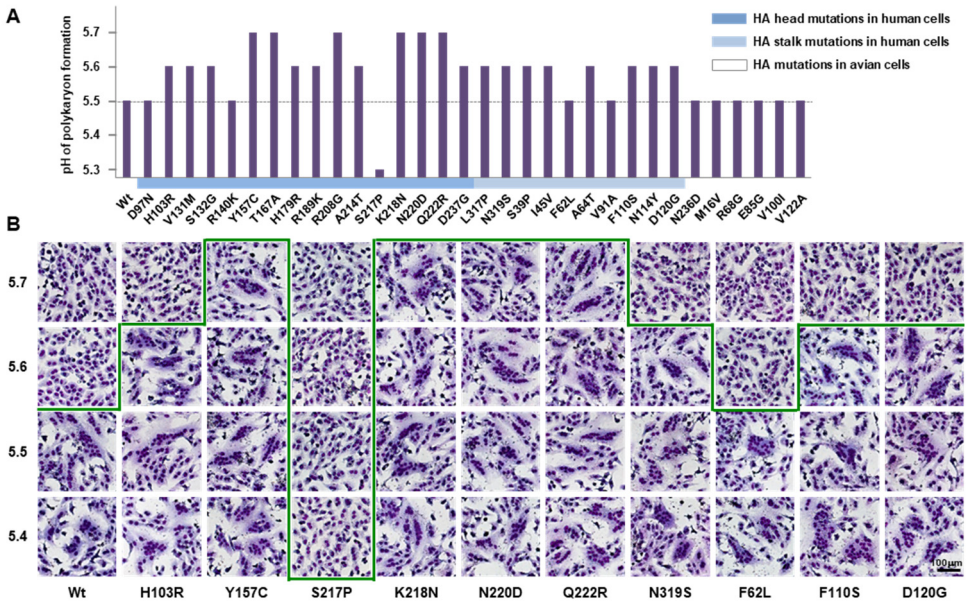


図 3. 変異ウイルス群が獲得した膜融合 pH 閾値

（A）変異導入 HA を Vero 細胞に発現させて、pH 値低下により誘導される多核巨細胞形成を観察することで膜融合 pH 閾値を解析した。（B）各変異 HA が示した典型的な多核巨細胞像。緑線：膜融合が観察された pH 値境界。

5. 変異ウイルス群のヒト呼吸器細胞における増殖性評価

32 種類の変異ウイルス群を SAE 細胞に感染させ、経時的に産出される子孫ウイルス量を real time RT-PCR 法によって定量した。32 種類の変異群の中で、HA head 領域および HA stalk 領域における変異群の多くがヒト呼吸器細胞においてより効率的に増殖した（図 4）。一方で、変異ウイルスの増殖性は季節性ウイルス（H1N1 および H3N2）と比較すると依然として低かった。

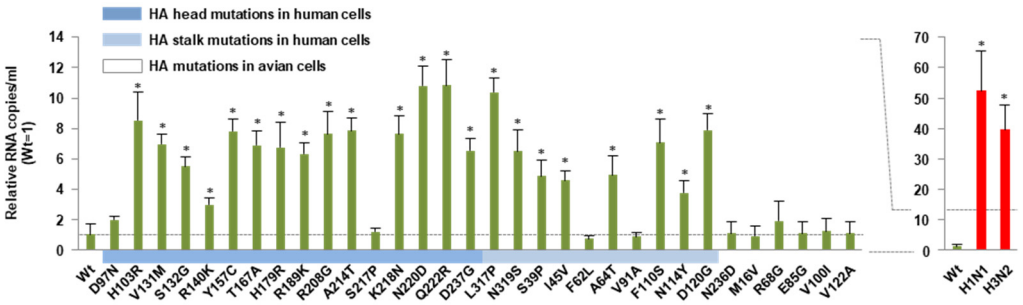


図 4. 変異ウイルス群が獲得したヒト呼吸器細胞での増殖性

（A）変異ウイルスを SAE 細胞に感染させ、感染 48 時間後に培養上清中に放出された子孫ウイルス量を real time RT-PCR 法によって定量した。対照として、ヒトで流行する季節性インフルエンザウイルス（H1N1 および H3N2）の増殖性を解析した。

*P< 0.01（Tukey's multiple-comparison test）。

6. ヒト呼吸器細胞におけるウイルス複製に必要な HA 特性の解析

32 種類の変異ウイルス群において、SAE 細胞での増殖性とヒト型レセプター結合特異性または膜融合 pH 閾値のデータを散布図にプロットした。HA head 領域の変異群において、ヒト呼吸器細胞での増殖性とヒト型レセプター糖鎖結合特異性または膜融合 pH 閾値にそれぞれ有意な正の相関性が確認された（図 5A，B）。一方で HA stalk 領域の変異群において、ヒト呼吸器細胞での増殖性と膜融合 pH 閾値に有意な正の相関性が確認された（図 5C，D）。

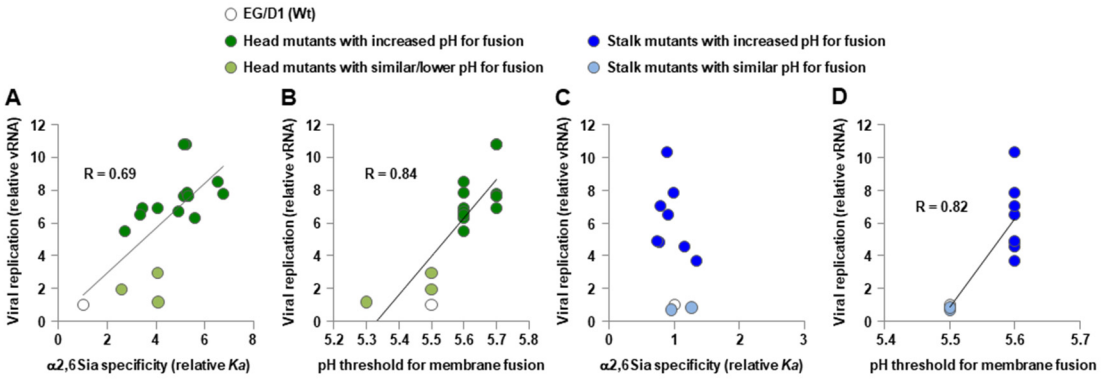


図 5. 変異ウイルス群が獲得したウイルス特性

（A，B）HA head 領域の変異群における、ヒト呼吸器細胞での増殖性とヒト型糖鎖結合特異性（A）または膜融合 pH 閾値（B）の関連性。（C，D）HA stalk 領域の変異群における、ヒト呼吸器細胞での増殖性とヒト型糖鎖結合特異性（C）または膜融合 pH 閾値（D）の関連性。R；相関係数。

7. ヒト呼吸器での複製過程で選択されるウイルス変異群の同定

インフルエンザウイルスの飛沫伝播性が HA 構造安定性と相関すると報告されている［1，7］。そこで、128 hemagglutination units（HAU）の変異ウイルス群（32 種類）を 50℃下で熱処理後、残存する HAU を HA assay によって測定した。得られたデータから非線形フィッテングによってウイルスが 8 HAU まで減衰する時間を算出した。32 種類の変異群の中で、HA head 領域および HA stalk 領域における変異群の多くが HA 熱安定性を有意に低下させた（図 6A）。また HA 熱安定性と膜融合 pH 閾値またはヒト呼吸器細胞での増殖性のデータを散布図にプロットした。HA head 領域および HA stalk 領域の変異群において、HA 熱安定性と膜融合 pH 値またはヒト呼吸器細胞での増殖性にそれぞれ有意な負の相関性が確認された（図 6B～E）。

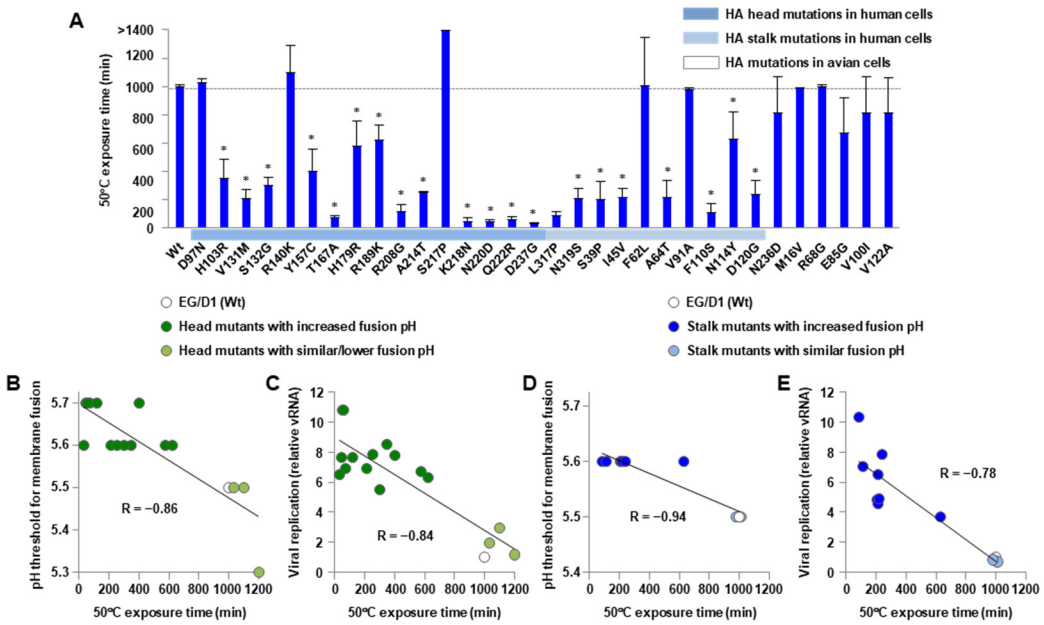


図 6. 変異ウイルス群の HA 構造安定性

（A）128 HAU の変異ウイルスを 50℃下で熱処理することで 8 HAU にウイルス力価が減衰する時間を測定した。HA 熱安定性はインフルエンザウイルスの飛沫伝播性の指標となる。*P< 0.01（Tukey's multiple-comparison test）。（B，C） HA head 領域の変異群における、熱安定性と膜融合 pH 閾値（B）またはヒト呼吸器細胞での増殖性（C）の関連性。（D，E） HA stalk 領域の変異群における、熱安定性と膜融合 pH 閾値（D）またはヒト呼吸器細胞での増殖性（E）の関連性。R；相関係数。

考　察

鳥インフルエンザウイルスの宿主適応機構はこれまで動物実験における変異選択試験を中心に研究されており、ヒト生体内における変異選択の頻度や当該変異がウイルス適応化に与える影響の詳細はこれまで不明であった。本研究では、H5N1 ウイルスが初代ヒト呼吸上皮細胞における複製過程で獲得する遺伝子変異群を網羅的に探索すると共に、変異ウイルスが獲得したヒト性状を特性化した。その結果、感染 96 時間までに様々な HA 変異群が特異的に選択されると共に、当該変異群がウイルスのヒト適応性を急速に高めることが明らかとなった。変異ウイルスは、ヒト型レセプター糖鎖結合特異性または膜融合 pH 閾値を高く変化させることでヒト呼吸器細胞での増殖性を高めていた。一方で変異ウイルス群の多くが、細胞感染性を高める代償性に HA 構造安定性の低下を起因として飛沫伝播性を低下させた。当該結果は、個体内での感染性と個体間での飛沫伝播性は一義的にバランス関係にあることを示唆した。これらの知見は、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構の全容を解明する上で極めて有用な情報基盤を提起している。私たちはこれらの結果を、Journal of Virology に報告した［5］。

謝　辞

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

1) 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. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. Nature. 2012 May 2;486(7043):420-8. PMID:22722205 doi: 10.1038/nature10831

2) Herfst S, Schrauwen EJ, Linter M, Chutinimitkul S, de Wit E, Munster VJ, Sorrell EM, Bestebroer TM, Burke DF, Smith DJ, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. Science. 2012 Jun 22;336(6088):1534-41. PMID:22723413 doi: 10.1126/science.1213362

3) Watanabe Y, Arai Y, Daidoji T, Kawashita N, Ibrahim MS, El-Gendy Eel-D, Hiramatsu H, Kobuta-Koketsu R, Takagi T, Murata T, Takahashi K, Okuno Y, Nakaya T, Suzuki Y, Ikuta K. Characterization of H5N1 influenza virus variants with hemagglutinin mutations isolated from patients. Mbio. 2015 Apr 7;6(2). Pii:e00081-15. PMID:25852160 doi: 10.1128/mBio.00081-15

4) Arai Y, Kawashita N, Daidoji T, Ibrahim MS, El-Gendy EM, Takagi T, Takahashi K, Suzuki Y, Ikuta K, Nakaya T, Shioda T, Watanabe Y. PLoS Pathog. 2016 Apr 20;12(4):e1005583. PMID:27097026 doi: 10.1371/journal.ppat.1005583

5) Watanabe Y, Arai Y, Kawashita N, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, Kajikawa J, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Ono T, Takagi T, Takahashi K, Shioda T, Matsumoto K, Suzuki Y, Nakaya T. Characterization of H5N1 influenza virus quasispecies with adaptive hemagglutinin mutations form single-virus infections of human airway cells. J Virol. 2018 Mar 21. pii: JVI.02004-17. PMID:29563293 doi: 10.1128/JVI.02004-17 [Epub ahead of print]

6) Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annu Rev Biochem. 2000;69:531-69. PMID:10966468 doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531

7) Miller MS, Palese P. Peering into the crystal ball: influenza pandemics and vaccine efficacy. Cell. 2014 Apr 10;157(2):294-299. PMID:24725400 doi: 10.1016/j.cell.2014.03.023