Osaka University Knowledge Archive

Title	Novel Polymerase Gene Mutations for Human Adaptation in Clinical Isolates of Avian H5N1 Influenza Viruses
Author(s)	荒井, 泰葉
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59540
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	荒井　泰葉
論文題名 Title	Novel Polymerase Gene Mutations for Human Adaptation in Clinical Isolates of Avian H5N1 Influenza Viruses （H5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのポリメラーゼ遺伝子における新規ヒト適応変異の同定）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

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、トリーヒト間伝播によって致死率が約60％と極めて高い重篤な呼吸器疾患を引き起こすことから、公衆衛生上の重大な懸案事項となっている。H5N1ウイルスは、現在、エジプト・ベトナム・インドネシア・中国において鳥類における流行地域を獲得しており、当該地域においてヒト感染事例が継続して報告されている。幸いにも、これまでのヒト感染事例は感染鳥との濃厚接触に限定されているが、繰り返させるウイルス感染伝播の過程において遺伝子変異が蓄積され、ヒトにより感染しやすい変異ウイルスが出現する危険性が指摘されている。なかでも、エジプトは、近年の全世界の約67%のヒト感染事例が報告されている特異な国であり、当該地域からH5N1由来パンデミックウイルスが出現する高い潜在性が指摘されている。また、H5N1エジプト流行株は、これまでに報告されている代表的なヒト適応性変異の幾つか（PB2-E627KやHA-158位の脱グリコリル化等）を既に獲得しており、他地域のH5N1ウイルスに比べて、ヒト適応化が進んでいると考えられている。本研究では、エジプトのH5N1ウイルス感染患者において特異的に検出されたウイルスポリメラーゼ（PB2, PB1, PA, NP）領域の変異に着目することで、エジプトで流行するH5N1ウイルスのヒト適応化を評価すると共に、関連するヒト適応変異を同定することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

パブリックデータベース（GISAIDおよびNCBI）を用いてデータベースサーチを行い、エジプトの感染患者体内で特異的に検出されたウイルスポリメラーゼ領域の変異をヒト適応変異の候補として計85種類（単変異、セグメント内同時変異及びセグメント間同時変異）選出した。まず、minigenome-assayによって、変異がポリメラーゼ活性に与える効果を種々の条件下(鳥由来細胞 vs ヒト由来細胞、33℃ vs 37℃、cRNA 合成vs vRNA合成)で評価した。次に、minigenome-assayにおいて有意にポリメラーゼ活性を高めた29種類の変異を対象に、リバースジェネティクス法により変異導入組み換えウイルスを作出した。当該ウイルスを初代ヒト呼吸器細胞および初代鶏胚繊維芽細胞に感染させ、異なる温度条件下（33℃および37℃）でのウイルス複製動態を評価し、複数の変異がヒト呼吸器細胞において特異的かつ有意にウイルス増殖性を高めることを確認した。さらに、マウス感染実験によって、変異がマウス病原性と肺中ウイルス増殖性に与える効果について評価し、変異が*in vivo*での病原性・複製性を有意に高めることを明らかにした。また、変異による高ウイルス増殖化機構を明らかにするために、primer extension assayによってウイルスのgenomic RNA (vRNA)、complementary RNA (cRNA)及びmRNAの合成量を定量化した。その結果、変異がcRNAからvRNAを合成する複製能を高めることが明らかとなった。興味深いことに、特に顕著な効果を示す変異は、vRNAプロモーターを取り囲む特徴的なPB1ドメインに位置しており、vRNA promoterとPB1ドメイン間の相互作用を変化させることで複製開始過程に影響すると推察された。これらの変異は、これまでに報告されたことがない新規のヒト適応変異であった。

〔総　括(Conclusion)〕

エジプトはH5N1ウイルスのhot-spotであり、当該地域で流行するウイルス株は現在最もヒト適応化が進んでいると考えられている。本研究によって、H5N1エジプト流行株は、感染患者体内において、ポリメラーゼ遺伝子に新規のヒト適応変異を獲得していることが明らかとなった。これらの変異は、PB2-627Kと協調的に作用することで、ヒト適応化をさらに進める重要な役割を果たすと示唆された。興味深いことに、同定されたヒト適応変異は、これまで報告されている変異とは異なるドメインに位置しており、vRNA promoterとの相互作用を変化させることで複製過程を至適化していると考えられる。これらの成果は、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構において、新規の分子メカニズムを提起するものである。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　荒井　泰葉

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	塩田達雄
	副　査	大阪大学教授	松浦善治
	副　査	大阪大学教授	堀口安彦

論文審査の結果の要旨

H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、感染鳥との濃厚接触により重度の呼吸器疾患を引き起こすことからアジア・アフリカ地域において重大な社会問題となっている。H5N1ウイルスは未だヒトーヒト間での飛沫伝播能を獲得していないが、繰り返されるウイルス伝播の過程で遺伝子変異が導入され、パンデミックが発生する危険性がある。特にエジプトは、H5N1ウイルスのヒト感染事例が最も多く報告されており、同国からH5N1由来パンデミックウイルスが出現する潜在性が指摘されている。一方で、H5N1ウイルスのパンデミック化機序は不明な点が多く、ウイルスの宿主適応機構の解明が急務となっている。

申請者は、エジプトにおいてH5N1ウイルスに感染した患者から検出されたウイルス遺伝子変異を網羅的に探索することで、ウイルスポリメラーゼ蛋白質に新規のヒト適応変異を複数同定した。これらのヒト適応変異は、ヒト呼吸器上皮細胞およびマウス肺中において著しくウイルス増殖性を高めた。興味深いことに、当該変異は過去に報告がないポリメラーゼ蛋白質の機能ドメインに位置していた。これらの研究成果は、鳥インフルエンザウイルスの新しいパンデミック化分子機序を提起するものであり、パンデミックインフルエンザ発生メカニズムを解明する糸口となる重要な発見である。

以上の理由より、これらの研究は、博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。