様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 ６ 日現在

機関番号：３５３０３
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０９１７０

研究課題名（和文）低忠実性ポリメラーゼ導入ウイルスによるインフルエンザ未来流行株予測システムの開発

研究課題名（英文）Development of a screening system of novel antigenic variants using a low-fidelity polymerase-based influenza virus strain.

研究代表者
内藤　忠相（Naito, Tadasuke）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：５０４５５９３７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザワクチン接種に用いられている不活化スプリットワクチンの問題点の1つとして、自然界で頻繁に起きるウイルス変異によりワクチン株と市中流行株との間で抗原性が一致せず、ワクチン効果が十分に発揮できない場合がある。そのリスクを低減させるため、世界で初めて単離した「低忠実性ポリメラーゼ導入ウイルス」を応用して、将来流行が想定される抗原変異株を事前に単離し、ワクチン開発に資するウイルス性状解析を試みた。その結果、市中流行株の主要抗原に由来する変異ウイルスライブラリーの作出が可能となり、迅速かつ高率に新規抗原変異株を単離できるスクリーニングシステムを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ワクチン製造株の選定条件として、①ウイルス増幅時に抗原部位に変異が導入されず、②ウイルスが高増殖性であり、③ウイルス抗原蛋白質(ヘマグルチニン)が高収率で精製できる必要がある。新規抗原変異株の出現後に、以上の条件を備えたウイルス株を速やかに単離して次シーズンのワクチン製造に間に合わせるのは困難である。本研究により、単離した抗原変異株のウイルス学的特徴と将来的なウイルス進化の方向性を事前に把握できれば、新規抗原変異株の出現時において迅速なワクチン開発が可能になる。さらに、その情報をもとに「未来流行株」に対するワクチン製造プロトコルを確立することが可能になる。

研究成果の概要（英文）：Influenza A virus rapidly acquires antigenic changes, which limit the effectiveness of vaccines, primarily owing to its high rate of evolution. To predict the antigenic properties of future epidemic strains of human influenza A virus, we attempted to develop the screening system of novel antigenic variants using a mutator polymerase-based influenza virus strain. An important advantage of our method for isolation of an escape variant is that we can screen those viruses using the mutant virus library derived from own low-fidelity polymerase that do not require random mutagenesis by targeting PCR.
In this study, we demonstrated that antigenic escape variants could be isolated from mutant virus libraries with random mutations introduced by RNA genome-wide mutagenesis system for the whole influenza viral gene. This approach would enable the selection of future vaccine candidates before antigenic mutant viruses emerge in nature.

研究分野：ウイルス学

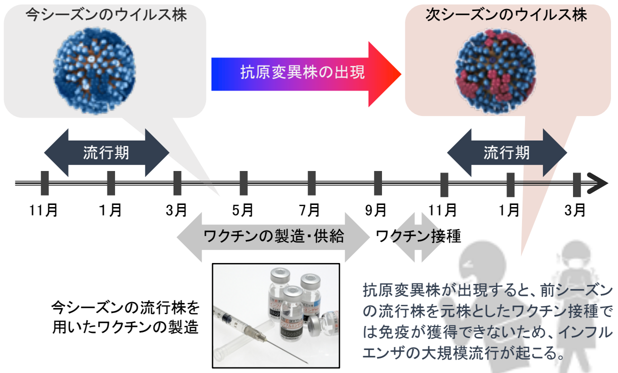
キーワード：インフルエンザウイルス　ワクチン開発　抗原変異　ウイルスポリメラーゼ　遺伝子変異　免疫逃避　ウイルスライブラリー　ウイルス進化

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

　インフルエンザウイルスのゲノムは８本に分節化された１本鎖 RNA であり、ウイルス由来の RNA ポリメラーゼである PB1 蛋白質により複製されるが、合成された RNA ゲノム内には１万塩基あたり約１個の頻度で変異が生じる。この高い変異導入効率により、季節性インフルエンザウイルスは頻繁に抗原変異を起こし、流行予測から選定されたワクチン株と市中流行株との間で抗原性が一致せず、ワクチンによる重症化阻止効果が著しく低下する場合がある（**図１**）。

図1　季節性インフルエンザワクチン開発における問題点

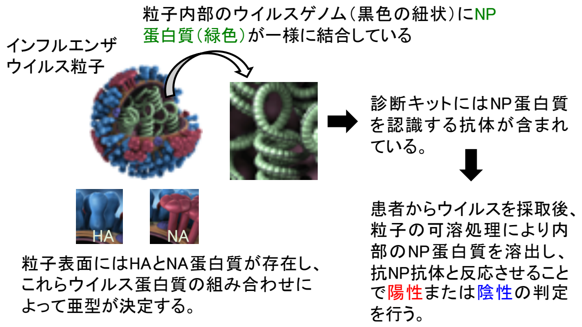


　そこで、ワクチン株と市中流行株との間の抗原性を一致させるため、次シーズン以降の流行株に起きる抗原変異部位を予測する研究成果が報告されている（**文献①**）。しかし、従来技術で予想可能な変異部位は、全ウイルス抗原のうちヘマグルチニン（Hemagglutinin: HA）の主要抗原領域に限定されており、全長の HA や他の主要抗原であるノイラミニダーゼ（Neuraminidase: NA）を含めた全ウイルス蛋白質について予測可能なシステムではない。そのため、抗原決定基となりうる「全ウイルス蛋白質」の「全領域」を対象にしたアミノ酸置換の多様性を把握できれば、抗原変異を伴う未来流行株を高精度に予測可能になる。

　また現在、臨床現場でインフルエンザ感染者を迅速に特定する手段として、インフルエンザウイルス抗原診断キットが使用されている。診断キットにはイムノクロマト法が採用されており、判定時間はわずか数分であり、有用な診断法である。しかし、2009 年に出現した新型パンデミックウイルス“A(H1N1)pdm09 株”の流行当時においては、診断キットを用いた陽性検出率は約 50%であり、インフルエンザであっても陽性にならない「偽陰性」と判定された患者が数多く存在していた。イムノクロマト診断キットでは、インフルエンザウイルスが持つヌクレオプロテイン(NP)と呼ばれる蛋白質を認識する抗 NP モノクロナール抗体が使われている(**図２**)。

　将来流行するインフルエンザウイルスにおいて NP 蛋白質に変異が起こり、既存診断キットの抗 NP 抗体では認識されない可能性があるため、感染していても陰性と判定されて早期の治療機会を失う恐れがある。実際に 2009 年当時の診断キットを用いた A(H1N1)pdm09 株の検出感度は、NP 蛋白質の変異による抗原部位の構造変化のため、抗体による認識感度が 100 倍ほど低下していた。未来流行株の予測が可能となれば、感染防御効果の高いワクチン開発研究に加えて、新規インフルエンザ診断キットの開発にも応用が期待できる。

図2　インフルエンザウイルスの構造とNP蛋白質

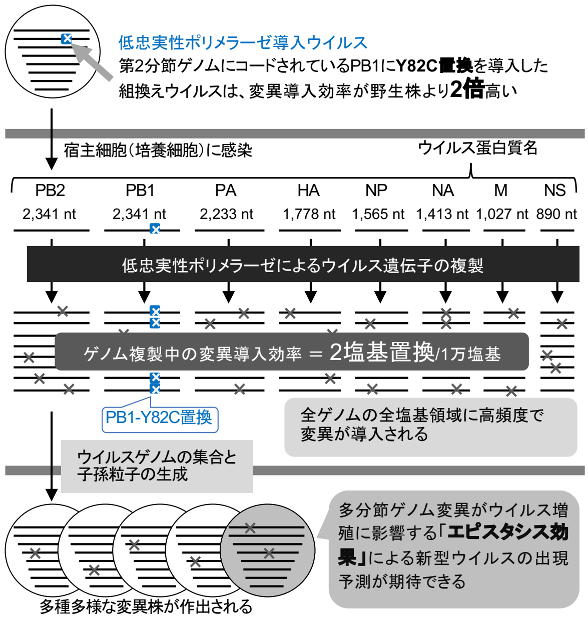


２．研究の目的

　申請者は、PB1 蛋白質の 82 番目の Tyr 残基を Cys に置換することにより、野生株よりも変異が入りやすい低忠実性ポリメラーゼ導入ウイルス PB1-Y82C 株を世界で初めて単離した（**文献②**）。本研究では PB1-Y82C 株を用いて、次シーズン以降の流行株に起きる抗原変異部位を予め推測できるインフルエンザウイルス未来流行株予測システムを開発する。そして、新規抗原変異株の性状解析を行うことで、毎年の流行株と抗原性が一致したワクチン株選定を可能にできる基盤情報を蓄積する。

　さらに本システムにより、従来のスクリーニング系では単離が不可能であった多分節ゲノム間の多塩基変異（エピスタシス効果）に由来する新型インフルエンザウイルスの出現を予測し、現流行株の進化方向性と遺伝的多様性を網羅的に解析する（**図３**）。

図3　低忠実性ポリメラーゼによるエピスタシス効果と
新型ウイルスの出現予測



３．研究の方法

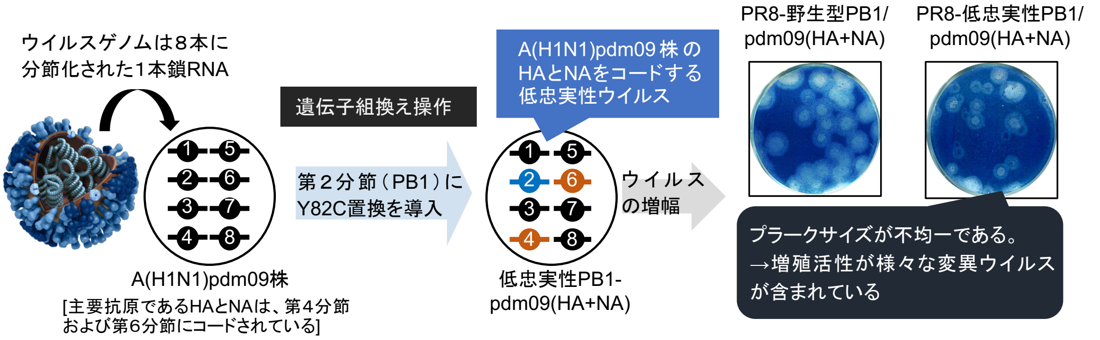
これまでに、遺伝子組換え技術を用いて人為的にインフルエンザウイルス実験室株(A/Puerto Rico/8/1934 株：PR8 株)を改変し、野生株と比較して変異が入りやすい“低忠実性ウイルス株”の単離に成功している。低忠実性ウイルス株は、ゲノム複製を担うウイルスポリメラーゼの PB1 蛋白質の 82 番目を人為的に改変しており、野生株と比較して 2 倍の頻度でウイルス遺伝子に変異が挿入される。この低忠実性ウイルス株を用いれば、現在のインフルエンザ流行株を元株とした変異ウイルスライブラリー（変異ウイルスの集合体）が作製可能である。そのライブラリーの中には、将来流行する新規抗原変異株が含まれる可能性がある。

そこで、現在の市中流行株であるインフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 株から HA 遺伝子および NA 遺伝子をクローニングし、PR8 株を母体とした低忠実性ウイルスに組込むことで、流行株の主要抗原に由来する変異ウイルスライブラリーを作製する。そして、ウイルスライブラリーを用いたプラークアッセイ実験により、主要抗原である HA 蛋白質や NA 蛋白質に変異が導入された新規抗原変異株の単離を試みる。同様に、診断キットのウイルス抗原となる NP 蛋白質にアミノ酸置換が導入された新規変異株が単離できるかどうか検討する。

４．研究成果

市中流行株である A（H1N1）pdm09 株から HA 遺伝子および NA 遺伝子をクローニングし、PR8-低忠実性 PB1 ウイルスに組込むことで、流行株の主要抗原をコードした「PR8-低忠実性 PB1/pdm09（HA+NA）株」を作出した（**図 4**）。続いて、PR8-野生型 PB1/pdm09（HA+NA）株をコントロールとしてウイルスの増幅を行なった結果、低忠実性 PB1 株を種株とすることで“増殖活性が多様なウイルス集団”、すなわち「流行株の主要抗原に由来する変異ウイルスライブラリー」が作製可能であることを明らかにした。

図4　A(H1N1)pdm09株の主要抗原をコードする低忠実性ポリメラーゼ導入ウイルスの作製



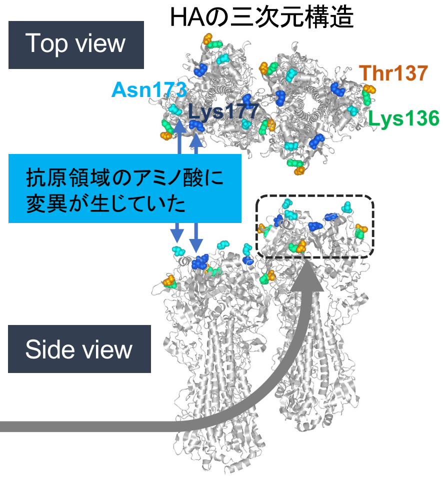
PR8-低忠実性 PB1/pdm09（HA+NA）株を用いたプラークアッセイ実験により 32 個の単一プラークを選択し、プラーク中に含まれるウイルスを単離後、培養細胞を用いてウイルス増幅を行なった。その後、各分離株のウイルス遺伝子解析の結果、免疫選択圧をかけない条件下において増幅させたにも関わらず、変異ウイルスライブラリーの中には多数の「HA 蛋白質の抗原領域にアミノ酸置換が生じた変異株」が含まれていた（**図 5**）。この結果から、低忠実性ポリメラーゼウイルスを利用することで、迅速かつ高率に抗原変異株を単離できるスクリーニングシステムの開発が可能であると考えられた。

加えて、同時に他分節ゲノム（NA 遺伝子や NP 遺伝子）にアミノ酸変異が導入された変異ウイルスも単離されており、具体的には、アミノ酸置換を伴う NP 変異株を 5 株単離した（R19H、E81G、T6A/S314G、Q20P/K470R および Q122K/A286S 変異株）。市販のインフルエンザ診断キットを用いて、それら NP 変異株の検出感度を検討した結果、検出感度は野生株とほぼ同等であった（**図 6**：全変異株で、A 型インフルエンザウイルスの検出を示す「赤いライン」が認められた）。

図5　A(H1N1)pdm09株のHAに導入されたアミノ酸変異

pdm09-HAにおける アミノ酸変異部位	単離株数	注釈
変異なし	7	
Lys136Glu	12	ウイルスの高増殖性化に寄与した可能性がある
Lys136Thr	3	
Thr137Asn	1	
Asn173Asp	7	抗原領域における変異
Lys177Met	1	
Arg269Lys	1	機能未知（ストーク領域）

ウイルス粒子の表面側に多くの変異が導入されていた。
→抗原性やレセプター吸着に影響する可能性が高い。



本研究によって得られたNP変異株に見出されたアミノ酸変異部位は、既存の診断キットに含まれる抗体の結合活性には影響しないことが示唆された。一方で、NP蛋白質の三次元構造は解読されており、変異アミノ酸部位を構造上にプロットすることが可能である（**図7**：例としてQ122K/A286S変異株を示す）。構造モデリング解析の結果、NP蛋白質において「変異が入りやすい領域」および「変異が入りにくい領域」を同定した。本成果は、ウイルス生存において変異を許容するアミノ酸部位を網羅的に調べる新規システムとして応用が可能であり、ウイルス進化を予測する上で重要な基盤情報となる。

また、今回単離したNP変異株の中には、臨床分離株データベースに報告されていない新規のアミノ酸変異も含まれていた。今後は、本研究成果を活用し、未来流行株に導入される変異部位の事前予測システムの確立に取り組む。

〈引用文献〉

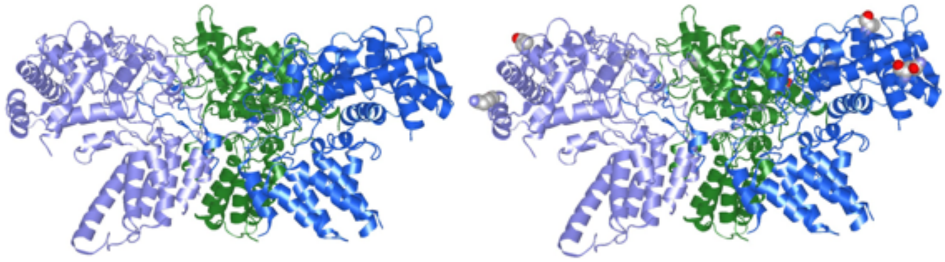
①Li C. *et al.*, Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses, Nature Microbiology, 2016

②Naito T. *et al.*, Tyr82 amino acid mutation in PB1 polymerase induces an influenza virus mutator phenotype, Journal of Virology, 2019

図6　既存の診断キットを用いた新規NP変異株の検出感度の測定

NP変異株表記の説明（例：R19Hの意味）
NP蛋白質の19番目のアミノ酸残基であるアルギニン（一文字表記：R）が、
ヒスチジン（一文字表記：H）に変異している

図7　NP蛋白質の三次元構造および変異導入部位



NP変異体構造図において、変異した各アミノ酸部位をボール構造で示す

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　5件）

1．著者名	4．巻
Naito Tadasuke、Shirai Kazumasa、Mori Kotaro、Muratsu Hidetaka、Ushirogawa Hiroshi、Ohniwa Ryosuke L.、Hanada Kousuke、Saito Mineki	93
2．論文標題	**5．発行年**
Tyr82 Amino Acid Mutation in PB1 Polymerase Induces an Influenza Virus Mutator Phenotype	2019年
3．雑誌名	**6．最初と最後の頁**
Journal of Virology	e00834-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	**査読の有無**
doi:10.1128/JVI.00834-19	有
オープンアクセス	**国際共著**
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
Naito Tadasuke、Ushirogawa Hiroshi、Fukushima Takuya、Tanaka Yuetsu、Saito Mineki	16
2．論文標題	**5．発行年**
EOS, an Ikaros family zinc finger transcription factor, interacts with the HTLV-1 oncoprotein Tax and is downregulated in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1-infected individuals, irrespective of clinical statuses	2019年
3．雑誌名	**6．最初と最後の頁**
Virology Journal	160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	**査読の有無**
10.1186/s12985-019-1270-1	有
オープンアクセス	**国際共著**
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
Naito Tadasuke、Yasunaga Jun-ichirou、Mitobe Yuichi、Shirai Kazumasa、Sejima Hiroe、Ushirogawa Hiroshi、Tanaka Yuetsu、Nakamura Tatsufumi、Hanada Kousuke、Fujii Masahiro、Matsuoka Masao、Saito Mineki	15
2．論文標題	**5．発行年**
Distinct gene expression signatures induced by viral transactivators of different HTLV-1 subgroups that confer a different risk of HAM/TSP	2018年
3．雑誌名	**6．最初と最後の頁**
Retrovirology	72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	**査読の有無**
10.1186/s12977-018-0454-x	有
オープンアクセス	**国際共著**
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名 Saito Mineki、Sejima Hiroe、Naito Tadasuke、Ushirogawa Hiroshi、Matsuzaki Toshio、Matsuura Eiji、Tanaka Yuetsu、Nakamura Tatsufumi、Takashima Hiroshi	4．巻 14
2．論文標題 The CC chemokine ligand (CCL) 1, upregulated by the viral transactivator Tax, can be downregulated by minocycline: possible implications for long-term treatment of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Virology Journal	6．最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1186/s12985-017-0902-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Shiohama Yasuo、Naito Tadasuke、Matsuzaki Toshio、Tanaka Reiko、Tomoyose Takeaki、Takashima Hiroshi、Fukushima Takuya、Tanaka Yuetsu、Saito Mineki	4．巻 14
2．論文標題 Prevalence of plasma autoantibody against cancer testis antigen NY-ESO-1 in HTLV-1 infected individuals with different clinical status	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Virology Journal	6．最初と最後の頁 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1186/s12985-017-0802-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計10件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

1．発表者名 内藤 忠相、齊藤 峰輝
2．発表標題 低忠実性インフルエンザ株の性状解析とワクチン開発研究への応用
3．学会等名 9th Negative Strand Virus-Japan
4．発表年 2020年

1．発表者名 内藤 忠相
2．発表標題 新規インフルエンザウイルスMutator株を用いた変異ウイルスライブラリー作出技術の開発
3．学会等名 BioJapan2019
4．発表年 2019年

１．発表者名
内藤 忠相、齊藤 峰輝

２．発表標題
低忠実性ポリメラーゼ導入ウイルスが生み出すインフルエンザウイルスゲノムの不均質性

３．学会等名
8th Negative Strand Virus-Japan

４．発表年
2019年

１．発表者名
内藤 忠相

２．発表標題
インフルエンザウイルスの未来流行株予測システムの開発

３．学会等名
科学技術振興機構　ライフサイエンス　新技術説明会

４．発表年
2018年

１．発表者名
瀬島 寛恵、内藤 忠相、齊藤 峰輝

２．発表標題
免疫老化を制御するMenin-Bach2経路にHTLV-1が及ぼす影響の解析

３．学会等名
第5回日本HTLV-1学会学術集会

４．発表年
2018年

１．発表者名
内藤 忠相、齊藤 峰輝

２．発表標題
複製エラーが入りやすい低忠実性インフルエンザウイルス変異株の単離と性状解析

３．学会等名
第33回中国四国ウイルス研究会

４．発表年
2018年

１．発表者名
内藤 忠相、齊藤 峰輝

２．発表標題
インフルエンザウイルスのゲノム複製忠実度を制御するポリメラーゼ機能部位の同定

３．学会等名
7th Negative Strand Virus-Japan

４．発表年
2018年

１．発表者名
内藤 忠相、齊藤 峰輝

２．発表標題
HAM発症リスクに関連するHTLV-1遺伝子型特異的な宿主遺伝子の発現制御メカニズムの解析

３．学会等名
第４回日本HTLV-1学会学術集会

４．発表年
2017年

１．発表者名
Tadasuke Naito, Hiroshi Ushirogawa, Mineki Saito

２．発表標題
Development of high-fidelity influenza A virus vaccine strain

３．学会等名
17th International Congress of Virology（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
後川 潤、内藤 忠相、齊藤 峰輝

２．発表標題
抗原性が異なるインフルエンザに対する交叉防御能を担う細胞の解析

３．学会等名
第32回中国四国ウイルス研究会

４．発表年
2017年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの変異型PB1	内藤 忠相、齊藤 峰輝	学校法人　川崎学園
産業財産権の種類、番号	**出願年**	**国内・外国の別**
特許、特願2017-214983	2017年	国内

〔取得〕　計0件

〔その他〕

川崎医科大学　微生物学教室　ホームページ
http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考