

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18907

研究課題名（和文）遺伝子の「挿入/欠失」はB型インフルエンザウイルス特有の進化機構か？

研究課題名（英文）Is "insertion/deletion" of gene an unique mechanism for influenza B viruses evolution？

研究代表者

小田切 崇 (Odagiri, Takashi)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80770221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：B型インフルエンザウイルスがもつ特徴的な進化機構を明らかにするための研究を行った。B型インフルエンザウイルス（野生株）とそのウイルスのHA・160-loopに結合する単クローン抗体を共培養することで、エスケープ変異体を2株作出することに成功した。この変異体のうち1株は160-loop領域内にアミノ酸の欠失があることをシーケンス解析で明らかにした。得られたエスケープ変異体のウイルス増殖能を野生株と比較し、ウイルス増殖能に差がないことを確認した。本研究結果から遺伝子の欠失はB型インフルエンザウイルスがもつ特徴的な進化機構の1つである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染症の制御は大きな社会的課題である。A型インフルエンザウイルス（A型ウイルス）同様、B型インフルエンザウイルス（B型ウイルス）も毎年流行が確認されている。しかし、毎年一定規模の流行が世界各地で確認されるA型ウイルスに比べ、B型ウイルスの流行規模は地域によって様々である。そのため、ウイルス学的特徴（進化機構、進化速度など）の見解を得るための研究はA型ウイルスに比べ、後れをとっている。本研究は、B型ウイルスの生存戦略の解明を試みた基礎研究である。本研究では、その解明の一端となる有用な成績が得られた。

研究成果の概要（英文）：The study aim to reveal the unique mechanism for influenza B viruses evolution. In this study, we succeeded to generate two escape mutants by co-infected with wild type influenza B virus and monoclonal antibody which bind to 160-loop region in HA segment. We found that one of these escape mutants possessed amino acid deletion in 160-loop region by sequence analysis of HA segment. Furthermore, the viral growth capacities of these escape mutants were no different, compare with wild type virus. These results suggest that the deletion of gene is one of unique mechanisms for influenza B viruses evolution.

研究分野：感染症学

キーワード：インフルエンザウイルス 変異株 遺伝子 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスの遺伝子には、長年にわたる宿主免疫との攻防の歴史が刻まれている。インフルエンザウイルスの進化様式の1つに点突然変異を繰り返す抗原連続変異がある。A型インフルエンザウイルス(A型ウイルス)はワクチンの標的となるHAタンパクの性状を決める遺伝子上で抗原連続変異を起こすことで宿主免疫を逃れ、絶えず流行を繰り返してきた。B型インフルエンザウイルス(B型ウイルス)の構造はA型ウイルスと酷似しており、B型ウイルスもHAの抗原連続変異により宿主の免疫を逃れ、流行し続けていると考えられている。

しかし、2016年に予想外の出来事がB型ウイルスで生じた。HA遺伝子のアミノ酸を一部欠失したウイルスの出現である。HAの抗原決定領域の1つである160-loop(アミノ酸:162~167位)に2アミノ酸欠失(162~163位)をもつB型ウイルス(Victoria系統株)が出現し、その後3アミノ酸(162~164位)欠失株も出現した。これらのアミノ酸欠失株のHAの抗原性は野生株(欠失のない株)とは異なっており、現在の主要な流行株となっている。そこで研究代表者はB型ウイルス出現時まで遡って配列を調べ、過去にもアミノ酸の「挿入/欠失」という変化を起こしていたことを確認した。一方で、毎年ヒトの間で流行しているA型ウイルスにおけるHAの抗原決定領域では「挿入/欠失」という現象はこれまで確認されていない。

このことから「B型ウイルスは抗原連続変異だけでなく、時折アミノ酸の「挿入/欠失」を織り交ぜるユニークな進化様式をもつことで生存を図っている」という仮説を研究代表者は立てた。

毎年一定規模の流行が世界各地で確認されているA型ウイルスに対し、B型ウイルスの流行規模は地域によって様々である。なかにはインフルエンザシーズン中にB型ウイルスが検出されない地域もある。そのため、ウイルス学的特徴の解明はA型ウイルスに比べ後れをとっている。

研究代表者はB型ウイルスの進化機構が明らかになれば、今後のB型ウイルスの進化予測も可能となり、公衆衛生対策の強化につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、B型ウイルスの進化様式における特徴の1つとして「アミノ酸の「挿入/欠失」を起こすことで生存を図る」という仮説を検証することを目的とした。

B型ウイルスとそのHAタンパクに対する単クローン抗体で共培養を繰り返し、単クローン抗体による感染阻止を回避するような変異ウイルス体(エスケープ変異体)を作出する。エスケープ変異体のHA遺伝子性状を解析する。仮説が正しければ、HA遺伝子に挿入や欠失を持つエスケープ変異体が得られると考えられる。

3. 研究の方法

本研究はB型ウイルス(Victoria系統株)の抗原決定領域の1つである160-loopに焦点をあて、2つのステップに分けて遂行する。(1)160-loopに特異的に結合する単クローン抗体の作製および(2)単クローン抗体とVictoria系統株との共培養によるエスケープ変異体の作出である。

(1) B型ウイルス(Victoria系統株)の160-loopに結合する単クローン抗体の作製

アミノ酸の欠失がない、かつ近年まで流行していた株であるB/Iwate/34/2017株(Victoria系統株)の160-loopを構成するアミノ酸配列を含むペプチドを人工合成し、マウスへ複数回投与する。ペプチド投与マウスから脾臓リンパ球を分離し、抗体を産生するハイブリドーマ細胞を樹立することで160-loopに結合する単クローン抗体を作製する。

(2) 160-loopに結合する単クローン抗体とVictoria系統株(野生株)との共培養によるエスケープ変異体の作出と変異体のウイルス性状解析

単クローン抗体と野生株との共培養を繰り返し行うことで、抗体による感染阻止を回避するエスケープ変異体を作成する。野生株の感染を阻止できる抗体量の8倍量存在下でも増殖するウイルスをエスケープ変異体とし、そのアミノ酸配列を決定することで変異の有無を確認した。併せてエスケープ変異体のウイルス増殖能を野生株と比較した。

4. 研究成果

(1) B型ウイルス (Victoria 系統株) の 160-loop に結合する単クローン抗体の作製

160-loop を構成するアミノ酸配列を含むペプチドを人工合成し、アジュバントと共にマウスへ複数回投与した。ペプチド投与マウスから分離した脾臓リンパ球とミエローマ細胞を融合させることで 160-loop に結合する単クローン抗体を産生するハイブリドーマ細胞を樹立し、以下の結果を得た。

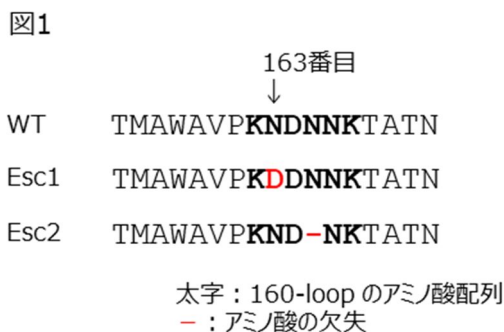
樹立したハイブリドーマ細胞をシングルセル化し、培養後の上清を B/Iwate/34/2017 株を固相化した ELISA でスクリーニングしたところ、B/Iwate/34/2017 株と結合する抗体を得ることに成功した。免疫に用いた抗原が 160-loop を構成するアミノ酸を含んだペプチドであるため、得られた抗体は 160-loop (またはその近傍) に結合する抗体であると考えられた。この抗体のアイソタイプを調べた結果、IgG ではなく IgM であることが判明した。

次にこの得られた IgM 抗体の B/Iwate/34/2017 株に対する中和能を中和試験で評価したところ、得られた IgM 抗体は中和能を示さなかった。これらの一連の結果は、合成ペプチドを免疫原に用いた単クローン抗体の作製が困難であることを示唆するものであった。

(2) 160-loop に結合する単クローン抗体と Victoria 系統株 (野生株) との共培養によるエスケープ変異体の作出と変異体のウイルス性状解析

B/Iwate/34/2017 株の 160-loop に結合する単クローン抗体の作製が難航したため、既存の単クローン抗体を用いたエスケープ変異体の作出を試みた。抗体は 1990 年代まで流行した Victoria 系統株の 160-loop (およびその近傍) に結合するとされている抗体を用いて、以下の結果を得た。

B/Shandong/7/97 (Victoria 系統株、WT) を親株として共培養を繰り返したところ、2 株のエスケープ変異体 (Esc1、Esc2) を得ることに成功した。変異体作出に用いた抗体が親株に対して中和能を示すのに対し、得られた 2 株に対しては中和能を示さなかった。これは、これら 2 株が親株の抗原性とは異なっていることを意味している。この 2 株の HA・160-loop 領域のアミノ酸配列を親株と比較したところ、1 株は 163 位のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸 (N → D) へ変化し、もう 1 株の方では 165 位のアスパラギンが欠失した株へと変化していた。(図 1)

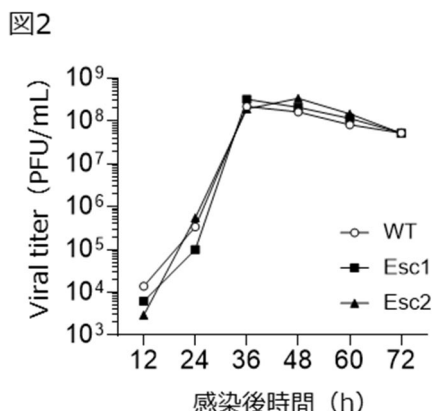


次に得られたエスケープ変異体のウイ

ルス増殖能を親株 (WT) と比較した。WT、Esc1 および Esc2 株をそれぞれ MDCK 細胞に MOI = 0.001 で感染させ、培養した。感染後 12、24、36、48、60、72 時間後の培養上清を回収し、プラーク法にてウイルス定量を行った。のエスケープ変異体ともウイルス増殖能は親株と差はなく、同等のウイルス増殖能を示した。(図 2)

本研究で得られたエスケープ変異体の HA 遺伝子アミノ酸配列と同じ配列を持つ株が実際の流行株のなかにも存在しているかをインフルエンザウイルス遺伝子データベース・GISAID に登録されている配列と比較して調べた。アミノ酸配列が完全一致している株は見つからなかったが、163 位にアスパラギン (D) をもつ株は 2001 年以降散発的に検出されていた。

本研究結果から、B 型ウイルスに抗体で Pressure を与えると、アミノ酸を欠失させたウイルスが得られた。これはアミノ酸の「挿入/欠失」による変化が B 型ウイルスにおける進化機構の 1 つであるという仮説を支持できるものであると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Utsunomiya Takeshi, Hibino Akinobu, Taniguchi Kiyosu, Nagai Takao, Saito Naruo, Tanabe Ikumi, Odagiri Takashi, Shobugawa Yugo, Kaneko Akira, Saito Reiko, for the Japanese HRSV Collaborative Study Group	4. 巻 39
2. 論文標題 Factors Contributing to Symptom Duration and Viral Reduction in Outpatient Children With Respiratory Syncytial Virus Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Infectious Disease Journal	6. 最初と最後の頁 678 ~ 683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000002626	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 Yoshino Naoto, Kawamura Hanae, Sugiyama Ikumi, Sasaki Yutaka, Odagiri Takashi, Sadzuka Yasuyuki, Muraki Yasushi	4. 巻 165
2. 論文標題 A systematic assessment of the relationship between synthetic surfactants and mucosal adjuvanticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	6. 最初と最後の頁 113 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejpb.2021.05.010	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 Sasaki Yutaka, Yoshino Naoto, Okuwa Takako, Odagiri Takashi, Satoh Takashi, Muraki Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 A mouse monoclonal antibody against influenza C virus attenuates acetaminophen-induced liver injury in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91251-x	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 Hayashi Yuko, Odagiri Takashi, Echizenya Taketora, Dewa Koji, Muraki Yasushi	4. 巻 64
2. 論文標題 Isolation of human parechovirus type 3 from an infant with sudden death	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 e15305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.15305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Hanae, Yoshino Naoto, Murakami Kazuyuki, Kawamura Hideki, Sugiyama Ikumi, Sasaki Yutaka, Odagiri Takashi, Sadzuka Yasuyuki, Muraki Yasushi	4. 巻 182
2. 論文標題 The relationship between the chemical structure, physicochemical properties, and mucosal adjuvanticity of sugar-based surfactants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejpb.2022.11.023	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 Yoshino Naoto, Yokoyama Takuya, Sakai Hironori, Sugiyama Ikumi, Odagiri Takashi, Kimura Masahiro, Hojo Wataru, Saino Tomoyuki, Muraki Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Suitability of Polymyxin B as a Mucosal Adjuvant for Intranasal Influenza and COVID-19 Vaccines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 1727~1727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines11111727	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小田切崇、吉野直人、佐々木裕、村木靖
2. 発表標題 ポリミキシンBを用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発
3. 学会等名 東北乳酸菌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小田切崇、吉野直人、木村将大、村木靖
2. 発表標題 全粒子不活化 A型インフルエンザウイルスに対するポリミキシンBの粘膜アジュバント効果
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田切崇、吉野直人、木村将大、村木靖
2. 発表標題 PMBの粘膜アジュバント作用：全粒子不活化インフルエンザウイルスを用いた検討
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田切崇、石川静麻、吉野直人、村木靖
2. 発表標題 B型インフルエンザウイルス特異的免疫逃避機構解明にむけた抗HA単クローン抗体の作製
3. 学会等名 2023年度東北乳酸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川静麻、小田切崇、吉野直人、村木靖
2. 発表標題 B型インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するIgMの取得と機能評価
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉野直人、横山拓矢、酒井博則、杉山育美、小田切崇、木村将大、北條渉、齋野朝幸、村木靖
2. 発表標題 ウイルスタンパクに対するポリミキシンBの粘膜アジュバント作用の検討
3. 学会等名 第75回日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手医科大学 医学部 微生物学講座 感染症学・免疫学分野
<http://www.iwate-med-micro.org/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------