

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21723

研究課題名（和文）代償性変化の実証によるパンデミックインフルエンザのリスク予測

研究課題名（英文）Pandemic influenza risk prediction based on searching compensatory mechanism

研究代表者

渡邊 洋平（Watanabe, Yohei）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：50452462

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）： インフルエンザウイルスを対象に、過去にパンデミック化した群（H1N1/H3N2亜型）と高病原性ながら未だにパンデミック化していない群（H5N1亜型）間で宿主適応変異を導入する前後でHA特性変化を比較した。その結果、H1N1/H3N2-HAにおいては、変異導入によるヒト型レセプター結合特異性の獲得が膜融合pH閾値とHA構造安定性の代償性変化を伴わず、その特性がH5N1-HAと大きく異なることが明らかとなった。またPB2とNAの変異群について解析した結果、ヒト増殖性を高めるだけでなく抑制する変異も存在しており、パンデミックは複数遺伝子の変異による協調やtune-upも重要であると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「高病原性インフルエンザウイルスがパンデミック化するのか」という問いに対する科学的根拠は少ない。本研究の遂行によって、宿主適応過程におけるH5N1-HAの特性変化が過去にパンデミックを起こしたH1N1/H3N2-HAとは異なる可能性が示された。得られた知見はパンデミックインフルエンザに対するさらなる理解と今後のパンデミック対策へのより効果的な施策に役立つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： We compared changes in HA property before and after introducing host-adaptive mutations between influenza viruses that historically caused pandemics in the past (H1N1/H3N2 subtypes) and those that are highly pathogenic but have not yet become pandemics (H5N1 subtype). The results showed that, in H1N1/H3N2-HA, acquisition of human-type receptor binding specificity by mutagenesis is not accompanied by compensatory changes in membrane fusion pH threshold and HA structural stability, and its characteristics are significantly different from those in H5N1-HA. Additional analyses of mutation groups for PB2 and NA genes showed that some mutations enhance replicative advantage and remaining others reduce it, suggesting that coordination and tune-up by multiple gene mutations are important for pandemics emergence.

研究分野：ウイルス学

キーワード：国際感染症 新興ウイルス インフルエンザ 宿主適応

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高病原性インフルエンザウイルス (H5N1/H7N9 亜型) は鳥からヒトに直接伝播して重度の呼吸器疾患を引き起こす。高病原性ウイルスが変異獲得によってパンデミックウイルスとなった場合、人類に与える影響は甚大と予測されている。一方で、高病原性インフルエンザウイルスはその出現以来、10-20年間も野外で継続的に伝播しているにも関わらず、未だにヒト間での飛沫伝播力を獲得していない。「高病原性インフルエンザウイルスは本当にパンデミック化するのか」という核心的な問いに対する科学的根拠は実は極めて乏しく、パンデミックインフルエンザ対策を効果的に施策する上で根本的な障壁となっている。

(2) 申請者はこれまで、ビッグデータ解析を利用して高病原性インフルエンザウイルスが感染患者内で獲得した適応変異群を先駆的に同定してきた (Watanabe Y. *et al*, PLoS Pathogens 2019, 2016, 2011 & mBio 2015 ほか)。これらの変異を導入したウイルスは、ヒト細胞やマウスでの増殖性を高めており、インフルエンザウイルスのヒト適応化やパンデミック化を検証する有用なモデルウイルスとして活用できる。

(3) さらに申請者は、高病原性インフルエンザウイルスが適応変異を獲得してヒト呼吸器に対する感染性を獲得する代償性に飛沫伝播性を低下する特性があることを見出した (Watanabe Y. *et al*, Journal of Virology 2018)。このことは、インフルエンザウイルスのヒト適応過程で個体内での「感染性」と個体間の「伝播性」が必ずしも一致しないことを示している (Watanabe Y. *et al*, Virus 2015)。また、高病原性ウイルスのパンデミック潜在性は過去のパンデミックウイルスと異なる可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

(1) 上記の背景を踏まえ、本研究の目的は「200種以上の亜型が自然界に存在するインフルエンザウイルスにおいて、潜在的にパンデミック化しやすい群 (亜型) としにくい群 (亜型) が存在する」という新しい仮説を実証することである。

(2) 具体的には、高病原性インフルエンザウイルスにおいて確認された「感染性」と「飛沫伝播性」の代償性変化が過去のパンデミックウイルスには存在しないことを確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) 概要

過去にパンデミックを起こして季節性ウイルスへと変化した H1N1 ウイルスと H3N2 ウイルスを対象に、適応変異が起こったアミノ酸位をパンデミック前に戻したリバータントウイルスを作製した。逆向きの適応変異を導入する前後で高病原性インフルエンザウイルスに確認された「感染性」と「飛沫伝播性」の間に代償性変化が観察されるのかについて観察した。

### (2) 過去のパンデミックウイルスのリバータントの作製

適応変異が起こったアミノ酸位をパンデミック前に戻した H1N1/H3N2 リバータントウイルスを作成した。これまでに、過去のパンデミックウイルス (香港かぜ、H1N1pdm) の出現に重要な

適応変異が報告されている。そこで季節流行性の H1N1 ウイルスと H3N2 ウイルスの遺伝子バックボーンに基づくリバースジェネティクス法によって、これらの適応変異が起こったアミノ酸位をパンデミック前に戻したリバータントウイルスを作製した。

具体的には過去の論文 (Shi Y. *et al.*, Nat Rev Microbiol 2014 など) を参考に以下の逆向き変異を導入したリバータントウイルスを作製した。

HA 遺伝子

季節性 H1N1 ウイルス : D190E 及び D225G

季節性 H3N2 ウイルス : L226Q 及び L228G

### (3) 過去のパンデミックウイルスの感染性変化の特性化

培養細胞におけるウイルス増殖性を野生型ウイルスとペアとなるリバータント間で比較した。具体的には、MDCK 細胞を用いた Focus-forming assay にてウイルス力価を測定後、MOI=0.01 にてヒト気道上皮細胞由来 1A5 細胞に 37 °C で 1 時間吸着した。その後、ウイルス液を吸引して PBS にて 2 回細胞を洗浄後にトリプシン含有 DMEM/F12 にて培養した。吸着後 12、24、48、72、96 時間において、培養上清中に放出された感染性子孫ウイルス量を Focus-forming assay にて経時的に定量した。

### (4) 過去のパンデミックウイルスの膜融合 pH 閾値変化の特性化

H5N1 亜型インフルエンザウイルスがフェレット間で飛沫伝播性を獲得するか評価した過去の論文では、ウイルスがヒト細胞への感染能を高めるために僅かな endosomal pH 低下で膜融合できる特性を獲得したと報告されている。そこで野生型ウイルスとペアとなるリバータント間で、融合 pH 閾値を比較した。具体的には、Vero 細胞に野生型 HA またはリバータント HA 発現プラスミドを導入後、pH 5.2~5.9 に 3 分間暴露後に形成される多核巨細胞を観察することで、膜融合を惹起する pH 閾値を測定した。

### (5) 過去のパンデミックウイルスの HA 構造安定性変化の特性化

HA 構造の安定化は H5N1 亜型インフルエンザウイルスが飛沫伝播性を獲得するために重要であると報告されている。また、HA 構造の安定度は熱安定性を指標に代替測定されている。そこで、野生型ウイルスとペアとなるリバータントウイルス間で 54 °C における熱安定性を比較した。

### (6) H9N2 亜型鳥インフルエンザウイルスが進化動態で獲得した変異を導入したウイルスの作製

近年、中国において鳥類間で伝播する H9N2 亜型インフルエンザウイルスが PB2-627K/V に加えて複数の PB2 変異を獲得しており、ヒト感染の散発事例の増加と同期している。そこでインフルエンザウイルスの代表的なヒト適応変異である PB2-627 変異が導入後に付随的に導入された PB2 変異群が宿主適応の tune-up に与える影響を評価した。その目的のために、中国で流行する H9N2 G1 lineage の祖先的ウイルスを遺伝子バックボーンとするリバースジェネティクス法を構築して、PB2 変異導入 H9N2 ウイルスを作製した。

### (7) PB2 変異が H9N2 ウイルスのポリメラーゼ活性に与える影響評価

中国で流行する H9N2 G1 lineage の祖先的ウイルスを遺伝子バックボーンとする Minigenome

assay を構築した。PB2 変異を導入してヒト細胞におけるポリメラーゼ活性変化を評価した。

(8)PB2 変異 H9N2 ウイルスのヒト細胞における増殖性評価

上記組み換え H9N2 ウイルスをヒト由来 Calu-3 細胞に MOI = 0.001 で感染させて子孫ウイルス量を Focus-forming assay にて評価した。

(9)H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスが患者内で獲得した変異を導入したウイルスの作製

HA 蛋白質と NA 蛋白質はウイルス粒子の結合と解離の相反する機能を有することから HA - NA の機能バランスは宿主適応に重要と考えられる。そこで患者内で獲得したと推定される NA 変異をマスケノムサーチに基づいて探索した。

(10)患者内で選択された NA 変異を導入した H5N1 ウイルスの作製

近年ヒト感染事例が世界で最多である H5N1 エジプト流行株を遺伝子バックボーンとするリバースジェネティクス法を構築して、上記の NA 変異を導入した組み換え H5N1 ウイルスを作製した。

(11)NA 変異がシアリダーゼ活性に与える影響の評価

NA-XTD( ThermoFisher 社 )を用いて NA 変異導入 H5N1 ウイルスのシアリダーゼ活性を測定した。

(12)NA 変異導入 H5N1 ウイルスのヒト細胞における増殖性評価

上記組み換え H5N1 ウイルスをヒト由来 1A5 細胞に MOI = 0.01 で感染させて子孫ウイルス量を Focus-forming assay にて評価した。

#### 4 . 研究成果

(1) H1N1 や H3N2 ウイルスを由来とする HA ( H1N1/H3N2-HA ) は、野生型において膜融合 pH 閾値が 5.5 付近と H5N1 エジプト株よりやや低い程度であった。一方で H1N1/H3N2-HA の熱安定性はと H5N1-HA では顕著に異なり、54 に 960 分暴露させても HA 構造が僅かにしか変化しなかった。このことは、過去にパンデミック化した H1N1 や H3N2 ウイルスと高病原性だが未だパンデミック化しない H5N1 ウイルス間で HA の構造安定性と膜融合特性に大きな相違があることを示唆した。

(2)この野生型 H1N1/H3N2-HA に逆向き変異を導入したところ、野生型ウイルスと比較して 1A5 細胞における増殖性を低下させたことから、既報にあるように HA レセプター指向性を a2,6Sia に傾けることでヒト適応性を高める役割あると考えられた。対照的に、逆向き変異は HA 構造安定性と膜融合 pH 閾値を変化させてなかった。このことは、H1N1/H3N2-HA ではパンデミック前後で a2,6 Sia 結合特異性の獲得は HA 構造の不安定化を伴わなかった可能性を示唆する。H5N1-HA では a2,6 Sia 結合特異性の獲得が HA 構造不安定化と同時に起こったことから対照的な変化であった。

(3)PB2 変異導入 H9N2 ウイルス群を用いた解析においては、PB2-A588V, K526R が E627K/V と協調的にポリメラーゼ活性を高めたが、K61R, K702R, A717T などの一部変異は逆に低下させた。このことは H9N2 ウイルスの進化動態において、E627K/V と協調的にヒト細胞における複製能を高める変異だけではなく、過度の複製能を抑える相補変異も導入されて宿主適応が tune-up さ

れる可能性を示した。

(4)NA 変異導入 H5N1 ウイルス群を用いた解析においては、NA 変異導入によってシアリダーゼ活性が低下していることを示すデータが得られた。一方で H5N1 ウイルス感染患者の多くが NA 阻害剤(オセルタミビルなど)による治療を受けているため、この変化が宿主適応によるものか NA 阻害剤に対するエスケープによるものなのか判別が必要と考えられた。

(5)以上の成果は、過去にパンデミックを起こした H1N1/H3N2 ウイルスと H5M1 ウイルスの間において、少なくとも HA 構造特性に大きな相違が存在することを示した。但し本研究においては、HA のレセプター結合特異性、膜融合活性と HA 構造安定性の関係性とさらにそれらの要素がウイルス増殖性(ヒト適応性)に与える影響についてのみを評価しているため、本研究の仮説をさらに裏付けるためにはさらに詳細な解析が必要であると考えられる。

また PB2 変異においてはヒト適応に協調的に作用する変異だけではなく過度の複製能を抑える相補変異が存在する可能性が示唆された。さらに NA 変異については、HA 変異による結合性の変化に付随してシアリダーゼ活性を低下させて HA-NA バランスを動的に変化させる可能性が示された。これらの知見は、インフルエンザウイルスによるパンデミックが予想以上に複数のウイルス遺伝子の変異による協調的かつ複雑な特性変化によって引き起こされている可能性を示した。

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 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Arai Y, Yamanaka I, Okamoto T, Isobe A, Nakai N, Kamimura N, Suzuki T, Daidoji T, Ono T, Nakaya T, Katsumoto K, Watanabe Y	4. 巻 26(1)
2. 論文標題 Stimulation of IFN- $\beta$ responses by aberrant SARS-CoV-2 small viral RNAs acting as retinoic acid-inducible gene-1 agonists	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105742	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 Isobe A, Arai Y, Kuroda D, Okumura N, Ono T, Ushiba S, Nakakita S, Daidoji T, Suzuki Y, Nakaya T, Matsumoto K, Watanabe Y	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 ACE2 N-glycosylation modulates interactions with SARS-CoV-2 spike protein in a site-specific manner	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04170-6	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 Elgendy EM, Arai Y, Kawashita N, Isobe A, Daidoji T, Ibrahim MS, Ono T, Takagi T, Nakaya T, Matsumoto K, Watanabe Y	4. 巻 102
2. 論文標題 Double mutations in the H9N2 avian influenza virus PB2 gene act cooperatively to increase viral host adaptation and replication for human infections	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001612	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 該当する
1. 著者名 Arai Yasuha, Elgendy Emad Mohamed, Daidoji Tomo, Ibrahim Madiha Salah, Ono Takao, Sriwilaijaroen Nongluk, Suzuki Yasuo, Nakaya Takaaki, Matsumoto Kazuhiko, Watanabe Yohei	4. 巻 94
2. 論文標題 H9N2 Influenza Virus Infections in Human Cells Require a Balance between Neuraminidase Sialidase Activity and Hemagglutinin Receptor Affinity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01210-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01210-20	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 該当する

1. 著者名 Arai Yasuha, Kawashita Norihito, Elgendy Emad Mohamed, Ibrahim Madiha Salah, Daidoji Tomo, Ono Takao, Takagi Tatsuya, Nakaya Takaaki, Matsumoto Kazuhiko, Watanabe Yohei	4. 巻 95
2. 論文標題 PA Mutations Inherited during Viral Evolution Act Cooperatively To Increase Replication of Contemporary H5N1 Influenza Virus with an Expanded Host Range	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01582-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01582-20	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 該当する

1. 著者名 Arai Yasuha, Watanabe Yohei	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 "Genetic tuning" of avian influenza virus host adaptation from birds to humans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosafety and Health	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bsheat.2020.11.006	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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Watanabe Y
2. 発表標題 Adaptive dynamics of emerging viruses at interfaces between animals and humans
3. 学会等名 帯広畜産大学大学院特別セミナー (英語発表) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Isobe A, Arai Y, Okumura N, Ono T, Nakakita S, Daidoji T, Suzuki Y, Nakaya T, Matsumoto K, Watanabe Y
2. 発表標題 ACE2 N-glycosylation modulates interactions with SARS-CoV-2 spike protein in a site-specific manner
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 Arai Y, Yamanaka I, Okamoto T, Isobe A, Nakai N, Kamimura N, Suzuki T, Daidoj T, Nakaya T, Okuzaki D, Watanabe Y
2. 発表標題 Stimulation of IFN-beta responses by aberrant SARS-CoV-2 small viral RNAs
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会（英語発表）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井泰葉、Emad M. Elgendy, 川下理日人、磯邊綾菜、大道寺智、中屋隆明、渡邊洋平
2. 発表標題 近年中国で優勢に流行するH9N2亜型鳥インフルエンザウイルスのPB2遺伝子に選択された同時変異群はヒト適応性を高く変化させている
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊洋平
2. 発表標題 インフルエンザウイルス 鳥類との共生と宿主適応
3. 学会等名 第61回日本臨床ウイルス学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都府立医科大学 感染症態学HP  <a href="http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/did/">http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/did/</a>          京都府立医科大学プレスリリース <a href="https://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2022/20221209.html">https://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2022/20221209.html</a>          マイナビニュースなどで紹介 <a href="https://news.mynavi.jp/techplus/article/20221209-2534081/2">https://news.mynavi.jp/techplus/article/20221209-2534081/2</a></p>
--



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
連携研究者	荒井 泰葉  (Arai Yasuha)  (80793182)	京都府立医科大学・医学研究科・研究員    (24303)	

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