

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461505

研究課題名(和文) インフルエンザ患者から分離されたウイルスの全ゲノム解析によるワクチン効果の検討

研究課題名(英文) The effect of influenza vaccination on whole-genome analysis

研究代表者

鄭湧(Chong, Yong)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60721264

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)：インフルエンザ流行株を全国より収集する体制を確立し、NGSを用いて迅速に全ゲノム遺伝子配列を決定する解析法を確立、2011から15年度の4シーズンにおけるインフルエンザA/H3N2型株 181株(ワクチン接種者 82株、未接種者 99株)の HA遺伝子の解析を行った。我々は各年度で使用されたワクチン株とのアミノ酸(AA)配列を比較する方法を試みた。HA抗原決定領域における AA 変異数及び変異率は、ワクチン接種者からの分離株が未接種者よりも有意に高いことを見だし、インフルエンザ流行株は、HA抗原決定領域において、ワクチン株のAA配列から異なる方向の変異が選択されることが初めて示された。

研究成果の概要(英文)：The effect of vaccination on the dynamics of influenza virus variants remains largely unknown in humans. We compared influenza hemagglutinin (HA) gene sequences isolated from vaccinated and unvaccinated populations with the yearly vaccine strains. In total, 181 influenza A/H3N2 virus samples isolated from 82 vaccinated and 99 unvaccinated patients (2011-15, four Japanese influenza seasons) were genetically analyzed using a NGS. Amino acid (AA) differences from corresponding vaccine strains were found in 74 of 329 HA1 sites. There was a maximum of four AA differences within the epitopes in the former three seasons (2011-14) and fifteen in the latter season (2014-15). Deviation to a greater number of AA differences was found more significantly in the isolates from vaccinated patients as compared to unvaccinated patients. Our data first suggested that in humans, immune pressure induced by vaccination works to select influenza variants genetically distant from vaccine strains.

研究分野：臨床感染症

キーワード：インフルエンザ 抗原変異 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザワクチン接種は、国としての感染症対策上重要であるが、現在のインフルエンザウイルスに対するワクチン戦略は必ずしも成功しているとは言いがたい。インフルエンザウイルスはそのRNAポリメラーゼが校正機能を有さないため、遺伝子の突然変異が高頻度に発生する。このため、HA上の抗原決定領域に抗原変異（抗原連続変異, antigenic drift）が起こり、宿主であるヒトの免疫系からのエスケープがおこるとされている。そのため、流行株におけるHA領域の抗原連続変異に関する情報を収集し、次シーズンの流行株及び抗原変異を予測し、ワクチン株が決定されている。しかしながら、ワクチン株による発症予防効果は年度ごとの差が激しく、年度によっては全く無効であったり、効果が認められる場合でも50%程度であると言われており(Lancet Infect Dis 12,2012; Cochrane Database Syst Rev 2,2010)、現在のワクチン戦略が十分に奏功しているとは言いがたく、インフルエンザワクチンの集団免疫上の戦略には、ヒトでの流行ウイルスの変異とそのワクチン効果への影響に関するデータの収集が必要である。

ヒトでの検討では、ワクチンによる集団免疫後の流行株におけるHA領域の抗原連続変異、抗原性変化の観察を元に、ワクチン接種により抗原性の変化が誘導された(vaccine-induced antigenic drift)と予測されてきた(PNAS 99,2002; Vaccine 26,2008)。しかし、現在まで、ヒトでの個々の検体、つまり、インフルエンザワクチン接種者でインフルエンザウイルスに罹患した患者からの分離株を用いてウイルスの遺伝子解析を行った検討は、我々の知りうる限りにおいて、一例も行われていない。

以上から、インフルエンザウイルスの抗原連続変異を解析する上で、インフルエンザワクチン接種者と未接種者からの罹患株を解析した研究はこれまで存在しない。さらに、患者背景の明らかな検体を用いて、HA上の抗原決定領域のみでなく、HAを含めてすべての分節遺伝子を同時に解析した研究も存在しない。

2. 研究の目的

(1) インフルエンザウイルスにおける全ゲ

ノム解析法を確立する。

数種類のアンプリコンの調整法を検討し(後述)、最も効率的かつ正確な遺伝子配列の決定法を確立する。

(2) HA領域の解析からインフルエンザAH3N2株における変異の動向を明らかにする。

HA上の抗原決定領域の遺伝子変異の解析から、ワクチン接種者、未接種者間での核酸/アミノ酸レベルでの変異の異同を明らかにする。

(3) すべての分節遺伝子領域の解析から新たな変異やそれらの関連性を明らかにする。次に、HA以外の7つの分節遺伝子について、抗原決定領域やエピトープ領域を中心に遺伝子変異の特徴を明らかにし、さらにHAを含めてそれらの関連性を解明する。

(4) 複数年度にわたる解析を通じてワクチンの低い有効性の原因の一端を明らかにする。

毎年のインフルエンザ流行株に経年的な関連性があるのかを明らかにするため、ワクチン株の年度毎の変異も考慮し、複数年に渡る検討を行うことによりインフルエンザワクチンの有効性の低さの原因について、より詳細な検討が可能となる。

3. 研究の方法

ワクチン接種者と未接種者からのインフルエンザ罹患株を分離培養し、RNA抽出後、8つすべての分節遺伝子のアンプリコンを複数の方法で調整し、次世代シーケンサーにて最も効率的かつ正確な塩基配列の同定法(インフルエンザウイルスにおける全ゲノム解析法)を確立した。決定された塩基配列については、HA領域の解析を通じて、H3N2株における変異の動向を明らかにした。さらにHAを含むすべての分節遺伝子上の抗原決定領域やエピトープ領域を中心に変異解析を行い、それらの関連性も併せて検討した。これらの解析を複数年度にわたり施行し、インフルエンザワクチンの低い有効性に対する機序について詳細な検討を行った。

(1) インフルエンザウイルスにおける全ゲノム解析法の確立

1-1:ウイルス分離

今回の研究では、すべてインフルエンザA/H3N2型株について検討した。日本臨床内科医会インフルエンザ研究班より得られ

たワクチン接種者、未接種者による罹患 H3N2 株を用いて解析を行った。通常通り MDCK 細胞を用いて培養を行い、培養上清から市販キットを用いて RNA を抽出した。

1-2: アンプリコンの調整

次世代シーケンサーにて塩基配列を決定した。3 種類のアンプリコン調整法を検討した。(Multisegment RT-PCR 法によりアンプリコンを調整; Multisegment RT 法で RT 後、8 分節ごとに PCR を施行しアンプリコンを調整; ランダムプライマーを用いて RT 後、cDNA を使用(メタゲノム解析))

1-3: 遺伝子配列の決定

シーケンサーはイルミナ社の MiSeq を使用した。アンプリコンの濃度調整後、トランスポゾンによる断片化、タグメンテーションにより、DNA 断片ライブラリーを作成、MiSeq によるシーケンス、データ解析により塩基配列を決定した。

(2) データ解析

2-1: HA 遺伝子領域の解析 / インフルエンザ AH3N2 株における変異の動向

Reference 株を元に alignment 解析を行い、neighbor-joining 法(NJ 法)を用いて系統樹作成を行った。これを元に、近年における H3N2 株の日本及び世界での分離株との比較を行った。また、該当する年度のワクチン株との比較を行った。次に、これまで指摘されている抗原決定領域を中心に、核酸、アミノ酸レベルでの変異解析を行った。変異置換の解析から antigenic pressure を受ける領域について詳細に検討した。以上の検討をワクチン接種者、未接種者からの罹患株で行い、両株間での比較も併せて施行した。

2-2: HA 以外の 7 つの分節遺伝子領域の解析 / 変異の関連性

次に残りの 7 つの分節遺伝子領域 (PB1, PB2, PA, NP, NA, M1/2, NS1/2) の解析を行った。これまでに指摘されている抗原決定領域やエピトープ領域について HA と同様な変異解析を行った。さらに HA 領域を含めて個々の変異に関連性がないかを検討した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルスにおける全ゲノム解析法の確立

3 種類のアンプリコン調整法を検討した結果、Multisegment RT-PCR 法 (Zhou B. J.

Virology 2009 83 (19) : 10309) を採用した。RT 後、Universal primer (Univ-12, Univ-13) を用いて 8 分節の PCR を同時に施行し、その産物をアンプリコンとしてシーケンスに使用する方法が最も高率かつ正確に配列決定を行えると判断し、以後この方法に統一しシーケンスを施行した。これによって、我々はインフルエンザ流行株検体を全国より相当数収集し、次世代シーケンサーを用いて、効率的かつ迅速に全ゲノム遺伝子配列を決定する解析法を確立できた。

(2) ワクチン接種者、未接種者におけるインフルエンザ A/H3N2 HA 領域の複数年解析によるワクチン接種の影響の検出

2011 から 15 年度の 4 シーズンにおけるインフルエンザ A/H3N2 型株 181 株 (ワクチン接種者 82 株、未接種者 99 株) の HA 遺伝子の解析を行った。現在、変異株の同定は系統樹分類に基づいてなされているが、我々は各年度で使用されたワクチン株とのアミノ酸 (AA) 配列を比較する方法を試みた。その結果、HA 抗原決定領域における AA 変異数及び変異率は、ワクチン接種者からの分離株が未接種者よりも有意に高かった。4 シーズンの変異率の比較では、HA 非抗原決定領域では、ワクチン接種者/未接種者間で差がなかったのに対して (81/16154AAs, 0.501% vs. 102/19503AAs, 0.523%)、HA 抗原決定領域では、ワクチン接種者の分離株の方が有意に高かった (435/10824AAs, 4.019% vs. 456/13068AAs, 3.489%)。2011-14 年度の 3 シーズンは、AA 48、128、142、145、278 部位のわずか 5 部位の内、4 部位の変異の変遷で、これらの部位での変異が優勢となる流行株が形成されていた。一方、ワクチン未接種者における罹患株では、ワクチン株と遺伝子配列のほぼ相同なウイルス株が有意に多く検出された。これらの結果から、インフルエンザ流行株は、HA 抗原決定領域において、ワクチン株の AA 配列から異なる方向の変異が選択され、さらにその後の流行株形成に影響していることが示唆された。これらの知見は、ワクチン株配列との変異比較が流行株の中核をなす変異の検出に有用であることを意味していた。ヒトでのインフルエンザ流行株形成に対するワクチン接種の影響を示唆する研究はこれまでになく初めてであった (Vaccine 35, 2017)。

(3) 日本/US で異なる選択となった 2014-15 年シーズンインフルエンザ A/H3N2 ワクチン株の流行株 HA 変異に及ぼす影響の検討

次に、我々は日本と US で異なるワクチン株が選択された 2014-15 年シーズンに着目し、2013-14, 2014-15 年度の日本と US における流行分離株 (日本 85 株; US 113 株) における HA 配列の比較をおこなった。日本と US で選択された 2014-15 年度 A/H3N2 ワクチン株では、HA AA128 (epitope B), 142 (A), 145 (A), 198 (B) の 4 箇所 AA が異なっていた。この内、日本では、2013-14 年度流行分離株と 2014-15 年度ワクチン株が一致した AA145S と 198S は、2014-15 年に有意にその頻度が減少した (57.6% vs. 5.8% for 145S, $P < 0.0001$; 100.0% vs. 75.0% for 198S, $P = 0.0012$)。一方、2014-15 年度ワクチン株が 145N と 198P であった US では、2014-15 年度流行分離株は、145S, 198S のまま維持された。これらの知見は、前述のインフルエンザ流行株は、HA 抗原決定領域において、ワクチン株の AA 配列から異なる方向の変異が選択されていることをさらに裏付ける結果となった。これらの知見について現在論文投稿中である (Differences in the hemagglutinin amino acids of Japanese and US influenza A/H3N2 viral isolates and their relationship with vaccine strain differences)。以上の (2) (3) の結果は、ヒトにおけるインフルエンザワクチンによる免疫圧が HA 変異に影響を及ぼす可能性を示した初めての知見となった。

(4) インフルエンザ分離株における HA, NA 間 co-mutation 株の流行優位性の検出

NGS による全ゲノム解析の有用性を生かし、我々は、HA 分節の解析のみでなく、他分節の解析を併せて行い、中でも HA-NA 間の AA 変異の連動に注目し解析を行った。2011-12 年度から 2014-15 年度の 4 シーズンの解析を行った結果、2011-12 年度において、HA-NA 間の co-mutation が検出された。具体的には、HA 278K (epitopeC) - NA 93G (stalk region) の連動変異株が 50.0% (24/48 株) で検出されたが、これらの株は、2012-13 年シーズンには、日本における流行株の 95.8% (846/48 株) を占めるに至った。ヒトインフルエンザウイルス罹患株における分節間の AA 変異の連動については、網羅的解析は報告されているが

(Nature 437, 2005)、その意義については分かっていない。この HA 278K-NA 93G 株の検出はこれまでになく、さらに翌年に流行の中核をなす株として選択されていた。これは、ヒトインフルエンザウイルスの HA-NA 間の co-mutation 株が流行の優位性を有することを見いだした初めての報告となった。これらの知見について現在論文投稿中である (Evolutionary advantage of neuraminidase and hemagglutinin co-mutations in the influenza A/H3N2 virus genome)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

鄭 湧、池松 秀之、Effect of seasonal vaccination on the selection of influenza A/H3N2 epidemic variants、Vaccine、査読有、35、2017、255-263

DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.11.084

[学会発表](計 2 件)

(1) 鄭 湧、池松 秀之: 2011/12 及び 2012/13 年流行期に患者より分離されたインフルエンザ A/H3N2 型ウイルス 96 株の HA 遺伝子の検討 第 89 回日本感染症学会総会・学術講演会 2015 年 4 月 京都

(2) 鄭 湧、池松 秀之: 2011/12, 2012/13 年流行期に患者より分離されたインフルエンザ A/H3N2 型 96 株の NA 遺伝子における HA 遺伝子との関連性についての検討 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会 2016 年 4 月 仙台

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

鄭 湧 (Chong, Yong)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：60721264

(2)研究分担者

池松 秀之 (Ikematsu, Hideyuki)
九州大学・大学病院・学術研究員
研究者番号：30521182

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()