

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07139

研究課題名(和文) 鶏卵での増殖過程に抗原性が変化しないインフルエンザウイルスの作出とワクチン応用

研究課題名(英文) Neuraminidase-mediated influenza virus egg growth without hemagglutinin antigenic changes

研究代表者

山田 晋弥 (Yamada, Shinya)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90466839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザワクチンは、インフルエンザに対する有効な防御手段であるが、近年のH3N2ウイルスはワクチン製造過程でHAの抗原性が変わり、流行株に対する効果的な免疫を誘導できない問題が生じている。本研究では、HAの主要抗原部位に変異を起こさずに鶏卵で効率よく増殖するNA変異ウイルスを作出した。変異NAは血球凝集能を示し、レセプター結合を担っている可能性が示唆された。更に、鶏卵継代過程でHAの主要抗原部位に変異を生じないことからワクチン株として利用できる可能性が示唆された。以上から、本研究は流行株と抗原性の一一致した効果の高いワクチン製造のための新しいアプローチであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のインフルエンザワクチンは流行株に対する効果的な免疫を誘導できないことが大きな社会問題となっているが、本研究はその問題の解決策になりえるものであり、社会的意義は大きいものとする。

研究成果の概要(英文)：Vaccination is one of the major strategies to control influenza. However, upon repeated passaging during vaccine production, H3N2 viruses acquire hemagglutinin (HA) mutations that allow them to recognize egg receptors, resulting in changes in antigenicity. Consequently, the effectiveness of the vaccine is appreciably reduced. Here, we show that mutations in neuraminidase (NA) confer efficient replication in eggs to recent human H3N2 viruses without the acquisition of egg-adaptive HA mutations at the major antigenic sites. The mutant NA allowed viruses to aggregate chicken red blood cells, suggesting the mutant NA serves as a receptor-binding protein in place of HA. The amino acid residues located in major antigenic sites remain unchanged during passages in eggs, demonstrating the potential to generate H3N2 vaccine viruses that would not change HA antigenicity during vaccine production, suggesting a potential new approach for the development of high-efficacy influenza vaccines.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ ワクチン 抗原性 H3N2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザワクチンは、インフルエンザに対する有効な防御手段である。通常、インフルエンザワクチンは、ワクチン候補株を鶏卵で培養し製造される。しかし、近年の季節性H3N2 ウイルスは発育鶏卵での増殖性が著しく低いため、ワクチン製造効率を上げるためにワクチン株は卵で継代される。その継代過程で主要抗原であるHA タンパク質に多くの変異が入り、抗原性が変わってしまう。そのため、ワクチン効果が低下し大きな問題となっている。従って、もしHA に変異を起こさずに発育鶏卵で効率よく増殖するウイルスの作出ができれば、それは現在のインフルエンザワクチンが抱える大きな問題点の解決策となりうる。申請者は、これまでに、臨床分離株であるA/Yokohama/2017/2003(H3N2) (以下、Y2017 株) について、HA に変異を生じずに発育鶏卵で効率よく増殖するNA 変異ウイルスを得ている。発育鶏卵で7 回継代(羊膜腔で3 回、更に漿尿膜腔で4 回)したウイルス(Y2017 羊膜/漿尿膜継代株)は、HA に変異を獲得せずに親株に比べて100 万倍以上高い増殖性を示した(107~108PFU/ml)。更に、Y2017 羊膜/漿尿膜継代株の高い増殖性は、ウイルスの膜表面タンパク質の1つであるノイラミニダーゼ(NA)の変異(5か所変異あり)に依存していることを明らかにした。このことから近年の流行株やワクチン株についても、NA に変異を獲得することでHA 抗原変異を生じずに発育鶏卵で効率よく増殖するウイルスの作出が可能であると考えた。

2. 研究の目的

NA の変異獲得により、発育鶏卵での増殖過程で、感染防御に重要なHA タンパク質に変異が起きないメカニズムを解明し、ワクチン製造に応用できる抗原性の変化しないH3N2 インフルエンザウイルスを作出する。

3. 研究の方法

I. Y2017 羊膜/漿尿膜継代株の重要なNA 変異を特定し、ワクチン株や流行株に導入する。

(1) Y2017羊膜/漿尿膜継代株の変異NAには、5つの変異が認められる。その変異を様々な組み合わせで有するウイルスをリバースジェネティクス法で人工合成し、鶏卵での増殖性を比較することで5つの変異のうち、どれが重要であるかを特定する。

(2) 特定した変異を最近のワクチン株および流行株のNAに導入し、鶏卵でよく増えるようになるか否かを調べる。

II. 近年のワクチン株や流行株において、HAに変異が起きることなく鶏卵で効率よく増殖するウイルスを作出し、その変異を解析する。

(1) 近年のワクチン株や流行株を発育鶏卵で継代(羊膜腔継代 漿尿膜腔継代)し、HAに変異が起きることなく鶏卵で効率よく増殖するウイルスを作出する。

(2) 同定した変異を様々な組み合わせで有するウイルスをリバースジェネティクス法で人工合成し、鶏卵での増殖性を比較し、どの変異が重要であるか明らかにする。

III. NAの変異が鶏卵での効率の良い増殖に関与するメカニズムを明らかにする。

(1) 変異NAがレセプター結合するかについて血球凝集能を調べることで検証する。

IV. ウイルスの抗原性がワクチン製造過程で維持されるか調べる。

(1) ワクチン株および現在の流行株のHAおよび変異NAを有し、HAに変異が起きることなく鶏卵で効率よく増殖するウイルス(高増殖型PR8バックボーン)を作製し、鶏卵での継代によりHAに変異が起きないか検証する。

4. 研究成果

I. Y2017 羊膜/漿尿膜継代株の重要なNA 変異を特定し、ワクチン株や流行株に応用する。

Y2017羊膜/漿尿膜継代株の認められる5つの変異NAを様々な組み合わせで有するウイルスをリバースジェネティクス法で人工合成し、鶏卵での増殖性を比較した。その結果、3つの変異が鶏卵での効率の良い増殖に重要であることを明らかにした。次に、3つのアミノ酸変異を最近のワクチン株および流行株のNAに導入し鶏卵での増殖性を調べた。その結果、いずれのウイルスも鶏卵における高い増殖性を示さないことが分かった。

II. 近年のワクチン株や流行株において、HAに変異が起きることなく鶏卵で効率よく増殖するウイルスを作出し、その変異を解析する。

近年の流行株2株を発育鶏卵で継代(羊膜腔継代 漿尿膜腔継代)し、HAに変異が起きることなく鶏卵で効率よく増殖するウイルスの作出を試みた。その結果、いずれの株においてもHAの主要抗原部位(160番目、194番目など)に変異を生じていた。そこで、最近のワクチン株NAをもとに、研究成果Iで同定したアミノ酸変異と同位置にランダム変異を導入し、鶏卵で継代することで、NAにさらに変異が生じ鶏卵で効率よく増殖する変異ウイルスの作出を試みた。その結果、鶏卵での継代過程で、NAにさらに数個の変異が生じ、HA主要抗原部位に変異を生じずに鶏卵でよく増えるウイルスを得ることに成功した。

III. NAの変異が鶏卵での効率の良い増殖に関するメカニズムを明らかにする。

IIで同定した変異NAを有するウイルスについて、モルモット血球を用いたHA試験を行った。親株のNAを有するウイルスは血球を凝集しなかったが、変異NAを有するウイルスは血球凝集能を獲得していたことから、NA変異によりレセプター結合能を獲得している可能性が示唆された。その結果から、変異NA ウイルスは、NAがレセプター結合を担いということが示唆された。

IV. NA変異ウイルスの抗原性が鶏卵での増殖過程で維持されるか否かの解析

IIで作出したNA 変異ウイルスについて、鶏卵継代過程でHA 主要抗原部位に変異が生じないか調べるために鶏卵にて10回継代を行い、生じた変異を解析した。その結果、HA に複数の変異が生じたものの、主要抗原部位には変異は生じないことが明らかになった。

本研究により、HA の主要抗原部位に変異を生じることなく、鶏卵で効率よく増殖するH3N2 ウイルスを作出した。作出したNA 変異ウイルスを鶏卵で10回継代後もHA の主要抗原部位に変異が生じなかったことから、変異NA を有することで、HA の主要抗原部位には変異が生じにくいことが明らかになった。また、変異NA を有することで、血球凝集を起こすようになったことから、変異NA がレセプター結合している可能性が示唆された。以上のことから本研究にて同定したNA 変異ウイルスは、ワクチン製造に応用できる可能性が示された。今後、本研究で同定したNA 変異が抗原性に影響しないことを確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田晋弥、安原敦洋、高田光輔、柳本周、千葉志穂、Ryan McBride、Charli Worth、Andrew J. Thompson、Tiago J.S. Lopes、山吉誠也、James C. Paulson、河岡義裕
2. 発表標題 鶏卵での増殖過程でHAの抗原性変化を伴わないH3N2インフルエンザウイルスの作出
3. 学会等名 9th Negative strand virus-Japan
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 RECOMBINANT INFLUENZA VIRUSES WITH STABILIZED HA FOR REPLICATION IN EGGS	発明者 河岡義裕、山田晋弥、千葉志穂	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/US18/57576	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 発育鶏卵での増殖過程で抗原性の変化しないインフルエンザウイルスの作出	発明者 河岡義裕、山田晋弥、千葉志穂	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/US18/57576	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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