

平成30年4月10日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19135

研究課題名(和文)新規遺伝子型RSウイルスが従来型RSウイルスを凌駕した分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular Mechanisms a Novel Genotype of Respiratory Syncytial Virus Replaced Old One

研究代表者

古瀬 祐気 (Furuse, Yuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定助教

研究者番号：50740940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：RSウイルスは、感染すると主に細気管支炎を引き起こす。本研究課題では、近年出現したON1型と呼ばれる新たな遺伝子型をもつRSウイルスについて解析を行った。ON1型RSウイルスがもつ遺伝子学的特徴を全ゲノムレベルで明らかし、系統学的解析によってON1型が出現した進化過程を考察した。さらに、数理モデルによる検討の結果、季節性の有無や免疫学的差異が新しい遺伝子型をもつウイルスの流行拡大に寄与していることがわかった。さらに、培養細胞を用いた感染実験によって、ON1型RSウイルスが従来型ウイルスとは異なる形質を示すことがわかったため、今後その分子生物学的メカニズムをさらに詳細に検討する必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of bronchiolitis among young children. In the study project, we analyzed a new genotype of the virus, ON1. We identified genetic signature of the ON1 RSV by whole genome sequencing. Phylogenetic analysis with the sequence data revealed evolutionary pathway that the ON1 RSV had generated. Mathematical modelling found immunological difference and seasonality as factors responsible for replacement of circulating genotypes of the virus. We also found a phenotypic difference between the ON1 and a former genotype of the virus in infection model with isolated virus and human airway-derived cells. Further study would unveil molecular mechanisms underlying difference between the genotypes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RSウイルス 感染症 呼吸器感染 進化 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

RS ウイルスは、感染すると主に小児において細気管支炎を引き起こし、免疫能が未熟であったり医療資源の乏しい環境であったりすると致死的となりうる。このウイルス感染症は主に冬季に流行し、年間で 3000 万人以上の小児が感染し、6 万人ほどがこれによって病院で死亡していると推計されている [1]。また、さらに多くの小児が病院に行くことなく死亡していると考えられている。

この RS ウイルスは 2 つのグループ（サブグループ A とサブグループ B）にわけられ、さらに複数の遺伝子型へと細分化される。サブグループ A に属する RS ウイルスから、ON1 型と呼ばれる新たな遺伝子型の出現が 2012 年にカナダから報告された [2]。その後、この ON1 遺伝子型をもつウイルスは世界中へと拡がり、それまでに流行していた遺伝子型と置き換わり主要な割合を占めるようになった。

2. 研究の目的

ON1 型の RS ウイルスが、1) どのように発生したのか、2) どのように感染が拡大したのか、3) 従来の遺伝子型をもつ RS ウイルスとどのように異なるのかを、遺伝学的・分子系統学的・分子生物学的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) フィリピンにおいて行われている小児呼吸器感染症のコホート研究に参加している小児から、下気道症状を呈した際に咽頭ぬぐい液を採取した。これを培養細胞に接種し、RS ウイルスの分離を試みた。分離に成功した場合、ウイルスを含んでいる細胞培養液上清から核酸を抽出し、逆転写反応後に PCR を行い、塩基配列をサンガー法によって解読

した。

ON1 型がもつ遺伝子学的特徴を明らかにするため、上述した解析によって明らかになった塩基配列を、ON1 型が出現する以前の RS ウイルスの世界中から報告されている塩基配列と比較した。さらに、ON1 型が出現した進化過程を検討するため、これらの塩基配列をもとに最尤法を用いて系統樹を作成した。

2) 新しい遺伝子型が出現した際に、古い遺伝子型と置き換わるようにして流行が拡大するためにはどのような要因が必要なのかを数理モデルによって検討した。古い遺伝子型を持つウイルスと新しい遺伝子型をもつウイルスによる 2 階層の SIR モデルを構築した。RS ウイルスの感染に関するモデルやパラメータは未知の部分が多いため、RS ウイルスと同じく小児に感染し冬季に流行する呼吸器感染症であるインフルエンザをモデルとして用いた。

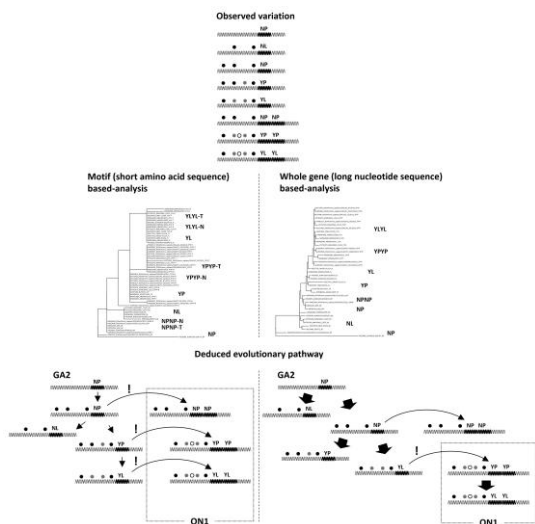
3) 培養細胞に従来の古い遺伝子型をもつ RS ウイルスと ON1 型の RS ウイルスをそれぞれ感染させ、ウイルスの増殖や細胞死の様子に違いがあるかを検討した。また、呼吸器症状を呈した小児から得られた臨床検体である咽頭ぬぐい液において、RS ウイルスの遺伝子型によってウイルス量に差があるのかを定量 PCR 法によって検討した。さらに、ウイルス遺伝子の機能的な差異を明らかにするため、RS ウイルスの各遺伝子を発現するプラスミドの構築を行った。このプラスミドを培養細胞に導入し、各遺伝子の形質に従来の古い遺伝子型と ON1 型の間で表現型に違いがみられるのかを検討した。

4. 研究成果

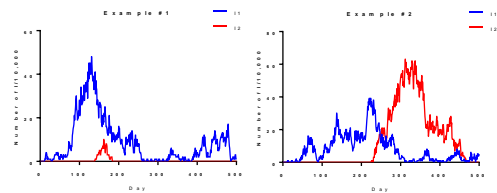
1) 2012～2013 年に収集された検体から RS

ウイルスを分離し、そのうち 13 件のサンプルを抽出し本研究に用いた。7 件の ON1 型 RS ウイルスと 6 件の従来の古い遺伝子型をもつ RS ウイルスの全ゲノムの塩基配列を決定することができた。解析の結果、ON1 型をもつ RS ウイルスは、P 遺伝子 (92 位)・G 遺伝子 (126, 130, 232, 237, 253, 314 位)・F 遺伝子 (104 位)・L 遺伝子 (598, 835 位) に特徴的なアミノ酸変異をもつことがわかった。ON1 型 RS ウイルスの特徴として、G 遺伝子に塩基配列の部分的な重複をもつことが出現時より報告されていたが [1]、それ以外の部位にも複数の特徴的な変異があり、これらがウイルスの増殖あるいは伝播効率を高めることで流行の拡大に寄与している可能性が示された。

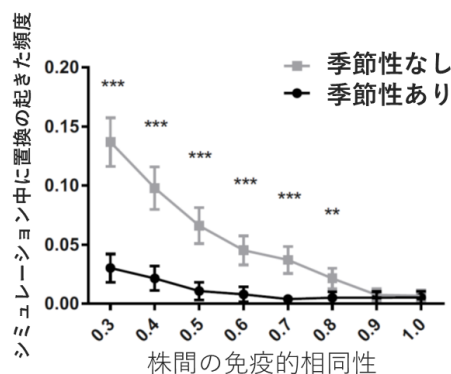
さらに、世界中から報告されている RS ウイルスのゲノムと比較したところ、G 遺伝子の重複は過去に 2 回起きており、重複の前後で同様の遺伝子多様性が保持されているという進化過程が明らかとなった。



2) 2 階層の SIR モデルを構築し、新しい遺伝子型をもつウイルスが古い遺伝子型をもつウイルスを凌駕するように流行できるときと、できないときをシミュレーション上で作り出すことに成功した。



このモデルを解析した結果、免疫学的な違いが大きいことと、季節による伝播能の変動がない状況において、新しい遺伝子型をもつウイルスが古い遺伝子型をもつウイルスと置き換わるようにして流行できることがわかった。



3) ヒトの気道上皮に由来する培養細胞に ON1 型 RS ウイルスを感染させたところ、古い遺伝子型をもつウイルスに比べて増殖が若干遅い様子が観察された。このとき、細胞の様子を観察すると、ウイルス感染による細胞融合が ON1 型ウイルス感染細胞において小さかった。さらに、臨床検体においても ON1 型 RS ウイルスに感染した患者ではウイルス量が古い遺伝子型をもつウイルスに比べて少なかった。

これらのことから、遺伝子型間での増殖の違いは、細胞内での複製効率よりも細胞間での伝播能の違いによるものである可能性が考えられた。

そこで、細胞内での複製に関わる L 遺伝子、細胞間でのウイルス伝播に関わる F 遺伝子を

組み込んだ発現プラスミドを構築した。しかしながら、これらを培養細胞に導入したところ、それぞれの機能を検出することができなかった。ウェスタンブロット法によって検討した結果、導入された遺伝子の発現自体がほとんどされていないことがわかった。近年流行している ON1 型の RS ウイルスやその直前に見られた古い遺伝子型をもつウイルスでなく、古典的に研究に用いられている実験室株の RS ウイルスに由来する遺伝子を用いて同様の実験を行ったところ、この場合には問題がないことが確認された。

以上のことより、近年流行している RS ウイルスをもつ遺伝子ではプラスミドと培養細胞を用いた実験系に適さないことがわかったため、今後コドンの最適化などの条件検討を行っていく必要があると考えられた。

<引用文献>

- [1] T. Shi *et al.*, “Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study,” *Lancet*, vol. 390, no. 10098, pp. 946–958, Sep. 2017.
- [2] A. R. Eshaghi *et al.*, “Genetic variability of human respiratory syncytial virus a strains circulating in Ontario: A novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, 2012.

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 4 件)

Multiple or Single Duplication Events Leading to the Emergence of a Novel Genotype of Respiratory Syncytial Virus.

Furuse Y.

Journal of Infectious Diseases; 2018 Mar 19 (受理済み).

doi: 10.1093/infdis/jiy154.

Complete Genome Sequences of 13 Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A Strains of Genotypes NA1 and ON1 Isolated in the Philippines.

Malasao R, **Furuse Y.**, Okamoto M, Dapat C, Saito M, Saito-Obata M, Tamaki R, Segubre-Mercado E, Lupisan S, Oshitani H.

Genome Announcements; 2018 Mar 8;6(10).

doi: 10.1128/genomeA.00151-18.

Mechanisms of replacement of circulating viruses by seasonal and pandemic influenza A viruses.

Furuse Y., Oshitani H.

International Journal of Infectious Diseases; 2016 Aug 25;51:6-14.

doi: 10.1016/j.ijid.2016.08.012.

Differences in viral load among human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children with severe acute respiratory infections in the Philippines.

Kadji FM, Okamoto M, **Furuse Y.**, Tamaki R, Suzuki A, Lirio I, Dapat C, Malasao R, Saito M, Pedrera-Rico GA, Tallo V, Lupisan S, Saito M, Oshitani H.

Virology Journal; 2016 Jun 27;13:113.

doi: 10.1186/s12985-016-0565-8.

[学会発表] (計 2 件)

Furuse Y, Oshitani H.

Mechanisms of replacement of circulating viruses by new variants of influenza A virus.

Options IX for the control of influenza; P-397; Chicago; U.S.; (August 2016)

古瀬祐気

抗原変異株が旧型の株を置換するようにして流行するメカニズム

第 30 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム; No. 9; 山形; 2016 年 6 月

[その他]

ホームページ等

<http://furuse-lab.strikingly.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古瀬 祐気 (Yuki Furuse)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
特定助教

研究者番号：50740940

(2)研究協力者

押谷 仁 (Hitoshi Oshitnai)

岡本 道子 (Michiko Okamoto)