

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17943

研究課題名（和文）N型糖鎖による抗原性多様化が免疫逃避とインフルエンザ流行に及ぼす影響の実験的検証

研究課題名（英文）Experimental study of the effects of N-linked glycans in influenza A hemagglutinin on antigenic diversification and immune escape

研究代表者

後川 潤（Ushirogawa, Hiroshi）

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：00299182

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）：インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）にはアスパラギン結合型（N型）糖鎖結合配列が存在し、N型糖鎖の脱着を伴う抗原性変異はウイルスの免疫逃避に影響を及ぼす一因と考えられる。本研究では、N型糖鎖プロファイル（数と配置）がウイルス性状や中和逃避にどの程度影響しているかを組換えウイルス株を用いて検証した。その結果、N型糖鎖プロファイルはウイルス性状を規定する因子の一つであり、抗体による中和活性に影響することが示唆された。このことから、N型糖鎖に着目した抗原性多様化への対応は、HAワクチンの効果向上の有効な手段である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザワクチンはワクチン株と市中流行株の抗原性が一致せず、効果的な免疫を誘導できない場合が多い。特にA/香港型（H3N2亜型）インフルエンザウイルスは抗原変異頻度が高い性質を持つウイルスであり、2009年の新型インフルエンザウイルスによるパンデミック後に再流行したことを鑑みると、新型コロナウイルスパンデミック後の、インフルエンザに対する集団的な免疫力低下が懸念される状況下で再び大流行することも考えられる。これを阻止し、人々の健康被害拡大や経済的損失を防ぐためには、ワクチン効果の向上が極めて重要な課題であり、本研究成果はその課題解決に寄与する情報基盤として大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：In influenza A virus, the surface glycoprotein hemagglutinin(HA) is known to be the primary target for neutralizing antibodies, in particular a set of canonical antigenic sites on the globular head of the molecule. The ability of influenza A to rapidly accumulate substitutions in HA is vital for its ability to escape from the immunological memory of its host, contributing to its seasonal impact on human health. In this study, we examined to what extent the N-linked glycans (N-glycans) in shielding antigenic sites of HA affect virus properties and neutralization escape using recombinant virus strains. As a result, it was suggested that the N-glycans are important factors that determine the viral properties and affect the neutralizing activity of the antibody. This research shown that focusing on the N-glycans in diversification of antigenicity may be a clue to improve the effect of the HA vaccine.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス ヘマグルチニン N型糖鎖 抗原性多様化 免疫逃避

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは抗原性の違いによってA型、B型およびC型に分類される。このうちA型インフルエンザウイルスは、ウイルス表面タンパク質であるヘマグルチニン (hemagglutinin:HA) とノイラミニダーゼ (neuraminidase:NA) の種類によって、さらに亜型に分類される。現在、季節性インフルエンザウイルスとして流行しているのはA型のパンデミック09型 (H1N1pdm) ウイルス、香港型 (H3N2) ウイルスおよびB型ウイルスであるが、このうちA型ウイルスはHAとNAの遺伝子変異によって抗原性が多様化しやすく、特に香港型ウイルスは遺伝子変異頻度が高い性質をもつウイルスである。人類は20世紀以降、新型インフルエンザウイルスの出現によるパンデミックを複数回経験しているが、1918年のスペインかぜ以降、新型ウイルスはパンデミックから一定期間を経て季節性ウイルスとなった後、次のパンデミック時に新出のウイルスによって駆逐されたかのように消滅している (図1)。ところが、興味深いことに2009年の新型ウイルスによるパンデミックでは、それまで季節性ウイルスとして流行を繰り返していたソ連型ウイルスが消滅した一方で、香港型ウイルスは現在に至るまで生きのびて、季節性ウイルスとなったpdm09 (pandemic 2009) 型ウイルスと隔年で交互に流行を繰り返している (図2)。

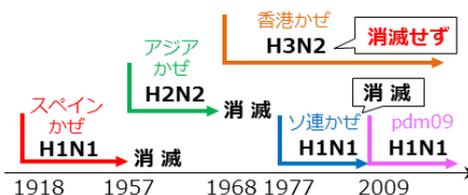


図1.パンデミックによるA型インフルエンザウイルス流行の変遷

このような現象が生じる理由はいくつか考えられるが、ウイルス側の要因の一つにHA球状頭部に存在するアスパラギン (N) 結合型糖鎖の付加・欠損を伴う抗原性多様化が挙げられる。申請者は、HAのN型糖鎖の脱着を伴う抗原連続変異によって香港型ウイルスがパンデミック後に再流行できた可能性を2009年前後の香港型ウイルス臨床分離株を用いて検証した (文献①)。本研究では、香港型ウイルスのHA球状頭部のN型糖鎖修飾に着目してN型糖鎖プロファイル (配置と数) とウイルス性状および病原性との関係を明らかにし、有益性の高いインフルエンザワクチンの開発につながる基盤技術の創出を目指す。

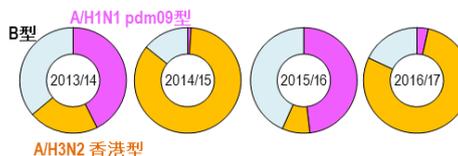


図2. ウイルス検出数からみたH1N1pdm09型、H3N2香港型およびB型インフルエンザウイルスのシーズンごとの流行の推移 (国立感染症研究所病原微生物検出情報をもとに作成) '13/'14と'15/'16シーズンはpdm09型、'14/'15と'16/'17シーズンは香港型の検出数が多く、隔年ごとに主流株が入れ替わる傾向が認められた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HA球状頭部のN型糖鎖付加・欠損変異がインフルエンザウイルスの性状やウイルス感染に対する宿主免疫応答、特に抗体による防御に及ぼす影響を明らかにし、インフルエンザワクチンの有益性を向上させることによって、適切な感染予防対策を可能にする知見と基盤技術を確認することである。

3. 研究の方法

タンパク質は生合成の過程において、Asn-X-thrもしくはAsn-X-Ser (XはPro以外のアミノ酸) の配列にN型糖鎖修飾が起こることが知られている。近年の香港型ウイルス市中流行株のHA球状頭部には6箇所の糖鎖結合部位が存在し、シーズンごとに異なる糖鎖プロファイルをもつウイルス株が流行している (図3)。本研究では、データベースを用いた情報解析結果に基づいて、国内での検出頻度の高い香港型ウイルスのHA遺伝子を組み込んだ組換えウイルスを作製した。作出した組換えウイルスを用いて赤血球凝集試験、細胞感染実験および動物感染実験を行い、N型糖鎖プロファイルとウイルスの性状 (増殖性や病原性) との関係性を比較検証した。さらに組換えウイルス株からHAタンパク質を抽出してHAスプリット抗原を作製し、複数種類のHAタンパク質を混合したカクテルHA抗原をモルモットに免疫して抗血清 (抗体) の作製を試みた。得られた抗血清を用いて赤血球凝集抑制試験およびプラーク形成抑制試験を行い、抗血清の性能を比較検証した。

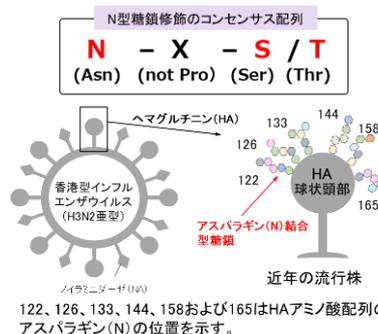
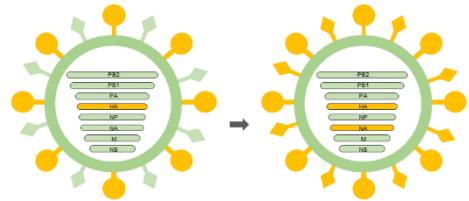


図3. N型糖鎖結合配列と近年の香港型ウイルスHAのN型糖鎖結合部位

4. 研究成果

① 変異導入法による HA 遺伝子の改変および組換えウイルスの作製

既知の塩基配列情報を基に人工合成した香港型インフルエンザウイルス HA 遺伝子を鋳型にして、HA-N 型糖鎖プロファイルが異なるように設計したプライマーセットを用いて変異を導入し、HA 遺伝子をクローニングした。これらの HA 遺伝子を用いて逆遺伝学的ウイルス作製法により、WSN 株を母体とした組換えウイルスを 10 株作出した。一部の組換えウイルス株は培養細胞での増殖率が著しく低かった為、組換えウイルス作製方法の再検討を行った。その結果 NA 遺伝子を Aichi/68 (H3N2) 由来の NA に変えることで改善された (図 4)。培養上清から子孫ウイルスの RNA を抽出して cDNA を作製し、塩基配列をサンガー法で解読した。その結果、すべての組換えウイルス株において、目的とする変異が導入されていることが確認できた。



HAのみを香港型(H3)に組換えたウイルス株の一部は培養細胞での増殖率が著しく低かった。 HAとNAを香港型(H3N2)に組換えることで、増殖率が改善された。

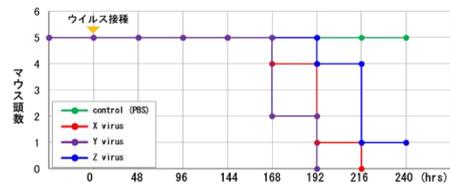
図 4. HA-N 型糖鎖プロファイルを改変した香港型 (H3N2)-WSN 組換えウイルス

② 組換えウイルス株の性状解析

赤血球凝集試験およびプラークアッセイ実験により組換えウイルスの *in vitro* における性状を検証した。その結果、HA-N 型糖鎖のみが異なるウイルス株間で赤血球凝集能やプラーク形成能に差が認められた。次にプラークアッセイの実験結果から各組換えウイルスの感染粒子数を算出して感染価を揃えたウイルス懸濁液を調整し、浅麻酔可下で C57BL/6 マウスに経鼻接種して感染させた。感染後のマウスの体重変動および動態変化を指標としてマウスに対するウイルスの病原性を比較した。その結果、感染マウス全個体が致死に至る時間にわずかながら差が認められた (図 5)。



感染価調整した3種類のウイルス液を C57BL/6マウス(♀, 4w)5頭ずつに浅麻酔可下で感染させ、体重測定・動態観察により病原性を評価した。

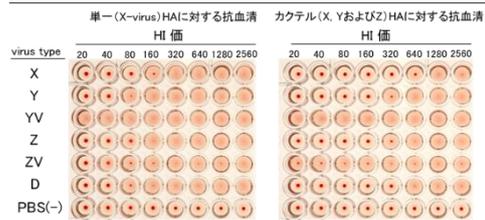


HAのN型糖鎖プロファイルのみが異なるウイルス株のマウスに対する病原性はわずかに異なっており、Y virusが最も病原性が高く、Z virusを接種したマウスは1頭が発症後に回復した。X virusはYとZの中間的な病原性を示した。

図 5. マウスに対する各組換えインフルエンザウイルス株の病原性

③ HA スプリット抗原の作製および抗血清の作製

培養細胞を用いて各組換えウイルス株を大量増殖させ、超遠心法によってウイルスを濃縮した。濃縮ウイルス液を HA スプリット抗原作製プロトコルに従って分画し、HA タンパク質を濃縮して HA スプリット抗原を作製した。一部のウイルス株では十分なタンパク量が得られなかった為、リコンビナントタンパク質発現系を用いた方法などを検討し、同時進行で実験を進めた。必要量の HA タンパク質が得られた株については、単一 HA 抗原あるいは複数種類を混ぜたカクテル HA 抗原としてモルモットに免疫した。2 週間隔で 2 回接種した後に採血し、抗血清を分離した。単一 HA 抗原およびカクテル HA 抗原由来の抗血清を用いて赤血球凝集抑制試験およびプラーク形成抑制実験を行い、それぞれの抗血清の中和活性を比較検証した。その結果、カクテル HA 抗原由来の抗血清は単一 HA 抗原由来のものよりも強い中和活性を示す傾向が認められた (図 6)。



段階希釈した抗血清で処理したウイルス液と1%モルモット赤血球を用いて赤血球凝集抑制試験(hemagglutination inhibition test: HI test)を行った結果、カクテルHA抗原に対する抗血清は単一HA抗原由来抗血清よりも高いHI価を示し、さらにN型糖鎖プロファイルが異なるウイルス株(D-virus)に対しても強い抑制効果が認められた。

図 6. HA スプリット抗原を用いて作製した抗血清による赤血球凝集抑制試験

以上の成績から、HA 球状部の N 型糖鎖プロファイルはインフルエンザウイルスの性状や抗原性を規定する因子の一つであり、香港型ウイルスの抗原性多様化や免疫逃避に干渉する要因であることが示唆された。また、複数の N 型糖鎖プロファイルが異なる HA を混ぜる「抗原カクテル化」は、N 型糖鎖の脱着による抗原性多様化に対応する手段として有効である可能性が示された。海外の研究では、香港型ウイルスの HA 不活化ワクチンを用いた実験において、同一抗原を 4 回接種した場合と比較して、異なる 2 種の抗原を 2 回接種した方が高い抗体価が得られることが報告されており (文献 ②)、この結果は、複数種の抗原を用いることでワクチン効果が高まることを示唆している。今後は本研究成果を活用し、抗原カクテル化の有効性を詳細に検証するとともに、効率的なカクテル抗原作製方法の確立を目指す。

〈引用文献〉

- ① Ushirogawa H, *et al.*, Re-emergence of H3N2 strains carrying potential neutralizing mutations at the N-linked glycosylation site at the hemagglutinin head, post the 2009 H1N1 pandemic, *BMC Infect Dis.* 2016
- ② Kavian N, *et al.*, Repeated influenza vaccination provides cumulative protection from distinct H3N2 viruses, *Clin Transl Immunology.* 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学微生物学教室ホームページ
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/>

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
研究協力者	齊藤 峰輝 (Saito Mineki)	川崎医科大学微生物学教室・教授	

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