

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：84407

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06358・19K21441

研究課題名（和文）ゲノミクスと計算科学の手法に基づくワクチン抵抗性のA群ロタウイルスのゲノム解析

研究課題名（英文）Genome analysis of vaccine-resistant group A rotavirus based on genomics and computational science methods

研究代表者

池森 亮（ikemori, Ryo）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・研究員

研究者番号：90827255

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：弱毒生ワクチン導入後に流行しているA群ロタウイルス（RVA）が、ワクチン選択圧からの逃避能を有している可能性が示唆されていた。そこで本研究では、ワクチン導入後のRVA感染症の患者の糞便材料を試料として用い、RVA流行株の塩基配列情報を収集、解析し、流行の実態の解明を試みた。その結果、流行は系統学的に単一のRVAにより発生しているものの、流行しているRVAのVP7遺伝子の中和エピトープのドメインに、アミノ酸配列の多様性が確認された。以上の結果より、RVAは抗原性を変化させることによってワクチンによる集団免疫から逃避し、市中で流行を維持している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワクチン導入後のRVA流行株を解析した結果、アミノ酸配列の多様性が、ウイルス粒子の外殻を構成するVP7のエピトープ領域のみならず、内殻を構成するVP6、病原性および感染細胞内での増殖性に寄与するNSP4にも確認された。この成果から、今後、ワクチンの選択圧下で流行株にアミノ酸配列の変異が蓄積することにより、様々な抗原性状および病原性のRVAが流行する可能性が示された。以上より、新規ワクチン開発の計画に必要な、現在流行しているRVAの遺伝学的情報の収集に貢献した。

研究成果の概要（英文）：Recently it is indicated that the group A rotavirus (RVA) has the ability to escape from vaccine selective pressure after the introduction of live attenuated vaccines in Japan. We tried to elucidate the epidemic situation which RVA causes the major leading strain by performing the genome analysis and diversity analysis of RVA epidemic strains from the fecal specimens with acute gastroenteritis patients after vaccination. As a result, although RVA formed mono phylogenetic cluster in this study, the substitution of amino acids accumulated in neutralization epitope sites of VP7. It suggested that RVA was persistent in the community with changing of antigenicity to escape against herd immunity.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：A群ロタウイルス ワクチン ゲノム解析 疫学解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本において、A 群ロタウイルス (RVA) に対する弱毒生ワクチン 2 種類 (Rotarix および RotaTeq) が 2011 年に導入された。それ以降、RVA 感染症の患者数は減少し、2014 年の患者数はワクチン導入前の 29% にまで減少した¹。しかし、その翌年の 2015 年の患者数はワクチン導入前の 39% であり、2014 年からむしろ増加していた¹。また、日本の 3 地域を対象とした調査により、流行している RVA の遺伝子型がワクチンの導入前後で変化したという報告も存在した²。このことから、ワクチン導入後に流行している RVA はワクチン選択圧からの逃避能を有している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上述の背景より、ワクチン導入後に流行している RVA がワクチン選択圧からの逃避能を有するかの検証を、本研究の目的とした。過去の研究で解析されているのは、外殻タンパク質の VP4 および VP7 のみであるため、その他の遺伝子の情報は明らかとなっていない。そのため、流行株が遺伝子再集合によって新生したのかは不明であった。さらに、これまでの諸研究の内容は遺伝子型の決定が主であり、詳細なゲノム解析によって、流行株の特徴を抽出する研究はされていなかった。そこで本研究では、RVA ワクチン導入後の検体を用い、RVA 流行株の塩基配列情報を収集し、これらの情報をもとに近縁系統樹解析、ならびに計算科学的手法を用いた多様性解析を行い、RVA 感染症の流行実態の解明を試みた。

3. 研究の方法

大阪府内の病院において、迅速診断キットによりロタウイルス陽性と診断され本研究所に搬入された糞便材料を、研究試料として用いた。2013 年以前の糞便材料において、患者のロタウイルスワクチン接種歴は不明であった。そのため、2014 年以降の糞便材料を解析対象とすることにした。解析対象とした試料の由来患者のワクチン接種歴は、Rotarix の接種歴ありが 3 検体、RotaTeq の接種歴ありが 2 検体、ワクチンの種類が不明であるものが 3 検体、接種歴なしが 2 検体、ならびに接種歴が不明であるものが 6 検体であった。

上述の、合計 18 検体を試料とし、以下の実験を行った。

(1) 10% 糞便乳剤から RNA を抽出した。逆転写反応により RNA から cDNA を作製し、この cDNA を鋳型として、RVA の VP4、VP6、VP7、ならびに NSP4 遺伝子を PCR 法または nested-PCR 法により特異的に増幅した。サンガーシーケンス法を用い、増幅産物の塩基配列を解読した。得られた塩基配列を用い、ロタウイルスの遺伝子型を鑑定する web サイト RotaC 2.0 (<http://rotac.regatools.be/>) にて遺伝子型別を行った。

(2) (1) にて得られた塩基配列を基に、MEGA7 を用いて最尤法による近縁系統樹を作成した。

(3) (1) にて得られた塩基配列を、MEGA7 を用いてアミノ酸配列に置換し、計算科学的手法を用いたアミノ酸の多様性解析を行った。

なお、2018 年から 2019 年にかけての大阪府における麻疹ウイルスの流行、ならびに 2019 年から 2020 年にかけての新型コロナウイルスの流行に伴い、検査業務がひっ迫し、タンパク質の立体構造解析等のいくつかの解析を行うことができなかった。

4. 研究成果

(1) 糞便材料に含まれていた RVA の検出年度、患者のワクチン接種歴の有無、ならびに遺伝子型の組み合わせを表に示した。2015 年度および 2016 年度の糞便材料から検出された RVA の遺伝子型の組み合わせ(VP7-VP4-VP6-NSP4)は、主に G2-P[4]-I2-E2(以下 G2P[4]型)であった。一方、2017 年以降に検出された RVA の遺伝子型の組み合わせは、主に G3-P[8]-I2-E2 (以下 G3P[8]-DS1 型)であった。その他の遺伝子型の組み合わせとして、G3-P[8]-I1-E1 (以下 G3P[8]-Wa 型)という組み合わせの RVA が 2016 年および 2017 年に各 1 度、G8-P[8]-I2-E2 (以下 G8P[8]型)という組み合わせの RVA が 2017 年に 1 度確認された。

表 糞便材料ごとのワクチン接種歴と遺伝子型の組み合わせ

| 検出年度 | ワクチン 接種状況 | 検体No | VP7 | VP4 | VP6 | NSP4 |
|-------|--------------|---------|------|------|------|------|
| | | | 遺伝子型 | | | |
| 2015 | RotaTeq | 1 | 不明 | 不明 | 不明 | E2 |
| | 無し | 2 | G2 | P[4] | I2 | E2 |
| | Rotarix | 3 | G2 | P[4] | I2 | E2 |
| | 種類不明 | 4 | G2 | P[4] | I2 | E2 |
| | | 5 | G3 | P[8] | I1 | E1 |
| 2016 | | 6 | G2 | P[4] | I2 | E2 |
| | 接種歴不明 | 7 | G2 | P[4] | I2 | E2 |
| | | 8 | G2 | P[4] | I2 | E2 |
| | | 9 | G3 | P[8] | I2 | E2 |
| | 2017 | Rotarix | 10 | G3 | P[8] | I2 |
| | | 11 | G3 | P[8] | I2 | E2 |
| 無し | | 12 | G3 | P[8] | I2 | E2 |
| | | 13 | G3 | P[8] | I1 | E1 |
| 接種歴不明 | | 14 | G8 | P[8] | I2 | E2 |
| 2018 | | 15 | G3 | P[8] | I2 | E2 |
| | RotaTeq | 16 | G3 | P[8] | I2 | E2 |
| 2019 | 接種歴不明 | 17 | G3 | P[8] | I2 | E2 |
| | | 18 | G3 | P[8] | I2 | 不明 |

(2) 2011 年以降に日本でヒトから検出された RVA の遺伝子配列を Genbank から抽出し、本研究で得られた RVA の遺伝子配列と合わせて、VP7、VP4、VP6 および NSP4 遺伝子の近縁系統樹を作成した。VP7 遺伝子の系統樹において(図 1)、本研究で確認された G2P[8]型の RVA はひとかたまりのクラスターを形成した。G3P[8]-DS1 型の RVA も同様にクラスターを形成した。また、G2P[4]型および G3P[8]-DS1 型がそれぞれクラスターを形成するという傾向が、その他の 3 遺伝子の近縁系統樹においても確認された。

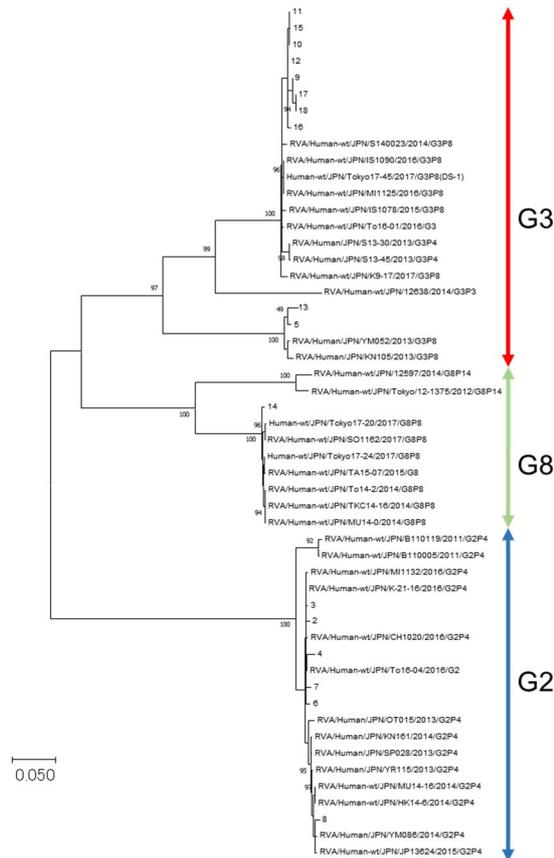


図1 2011~2019年において日本で検出されたヒト由来RVAのVP7遺伝子を基にした系統樹

(3) 各遺伝子型 (G2、G3、P[4]、P[8]、I2 および E2) ごとにアミノ酸の多様性解析を行い、多様性が高い (エントロピーが 0.8 以上) 座位をプロットした (図 2)。アミノ酸の多様性が高い座位は、VP7 遺伝子の G3 遺伝子型に 2 か所 (aa30、146)、VP4 遺伝子の P[4] 遺伝子型に 1 か所 (aa513)、P[8] 遺伝子型に 1 か所 (aa651)、VP6 遺伝子の I2 遺伝子型に 2 か所 (a38、330) ならびに NSP4 遺伝子の E2 遺伝子型に 7 か所 (aa72、135、136、137、139、140、163) 確認された。

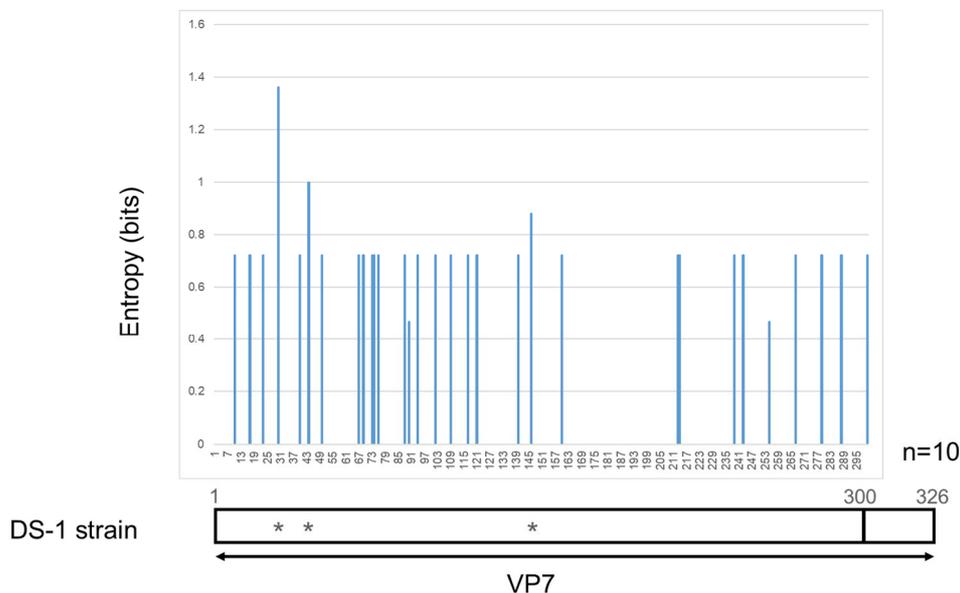


図2 VP7遺伝子 (G3遺伝子型) におけるアミノ酸の多様性解析

まとめ

2016 年以前、G2P[4]型の RVA がワクチンの接種歴に関係なく広く検出された。一方、2017 年以降は G3P[8]-DS1 型の RVA が主に検出された。つまり、患者から検出される RVA の遺伝子型は、ワクチン接種歴よりも、その年の流行に左右されることが示唆された。

近縁系統樹において、本研究で検出された RVA は、G2P[4]型、G3P[8]-DS1 型でそれぞれクラスターを形成した。この結果から、大阪府において、単一の型の RVA が流行の原因となっていたことが明らかとなった。一方、G3P[8]-Wa 型および G8P[8]型の RVA も少数確認されたことから、流行の主となる RVA (G2P[4]型および G3P[8]-DS1 型) 以外の型の RVA も、散発的に感染性胃腸炎の原因となっていることが示された。

近縁系統樹上では、G2P[4]型および G3P[8]-DS1 型の RVA はそれぞれ単一のクラスターを形成していたが、多様性解析により、両 RVA のアミノ酸配列には多様性が存在することが明らかとなった。多様性が高い座位のうち、VP7 遺伝子 (G3 遺伝子型) の aa146 は、中和抗体のエピトープ領域 7-2 (aa143-148) の中に位置していた³。そのため、流行している RVA はエピトープ領域にアミノ酸の多様性を獲得し、ワクチンの選択圧から逃避している可能性がある。またその他の多様性が高い座位として、NSP4 遺伝子の aa135、163 が確認された。aa135 は NSP4 のエンテロトキシン活性のドメイン (aa114-135) に位置していた⁴。NSP4 の末端 (aa161-175) には、RVA の細胞内の増殖過程において、ウイルス粒子の内殻タンパク質 (VP6) と結合するドメインが存在し⁴、aa163 はこの中に位置する。つまり本研究において、RVA のウイルス粒子の外殻 (VP7) の中和エピトープだけでなく、その他のウイルスタンパク質の機能的なドメインにもアミノ酸の多様性が確認された。そのため、流行株の RVA には、細胞内での増殖性や病原性にも多様性が生じている可能性がある。

以上より、本研究では、大阪府における RVA の流行の実態の一部を明らかにすることができた。今後、ワクチンの選択圧下でアミノ酸配列が多様化することにより、様々な病原性の RVA が出現し、それによって新たな流行が起こる可能性が示された。今後も同様の研究を行い、流行の変遷を察知し、ワクチンの効果を検討し続ける必要がある。

引用文献

1. Kobayashi, M., Adachi, N., Miyazaki, M. & Tatsumi, M. Decline of rotavirus-coded hospitalizations in children under 5 years: A report from Japan where rotavirus vaccines are self-financed. *Vaccine* **36**, 2727–2732 (2018).
2. Tanaka, T. *et al.* Changes in rotavirus genotypes before and after vaccine introduction: A multicenter, prospective observational study in three areas of Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **70**, 448–452 (2017).
3. Zeller, M. *et al.* Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 966–976 (2012).
4. Hyser, J. M., Zeng, C. Q. Y., Beharry, Z., Palzkill, T. & Estes, M. K. Epitope mapping and use of epitope-specific antisera to characterize the VP5* binding site in rotavirus SA11 NSP4. *Virology* **373**, 211–228 (2008).

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〕

-

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|