

論文の内容の要旨

論文題目 A humanized MDCK cell line for the efficient isolation and propagation of human influenza viruses

(季節性 A/H3N2 インフルエンザウイルスが効率よく増殖するヒト化 MDCK (hCK)細胞株の樹立)

氏名 高田 光輔

冬季にヒトの間で流行する季節性インフルエンザウイルスは、その性状が頻繁に変化する。中でも A/H3N2 亜型の季節性ウイルスは、他の季節性ウイルス〔2009 年にパンデミックを起こした A/H1N1 亜型ウイルス (A/H1N1pdm) と B 型ウイルス〕に比べて抗原性が変化しやすいため、流行頻度が高く、時に大規模な流行を引き起こすことがある。世界各国のサーベイランス機関は、毎冬流行する季節性ウイルスの抗原性状や抗インフルエンザ薬に対する感受性を把握し、その性状変化を監視するために、毎年膨大な数のウイルス株を分析している。

インフルエンザウイルスは、その粒子表面に存在するヘマグルチニン (HA) を使って宿主細胞表面のレセプターに結合し感染を開始する。季節性ウイルスの HA はシアル酸がガラクトースに $\alpha 2,6$ 結合した糖鎖 (ヒト型レセプター) を、鳥から分離されたウイルスの HA はシアル酸がガラクトースに $\alpha 2,3$ 結合した糖鎖 (鳥型レセプター) を、特異的に認識することが知られている。インフルエンザウイルスの分離と増殖には、両レセプターを発現するイヌ腎由来の MDCK 細胞が広く使用されている。しかし、最近の A/H3N2 流行株は MDCK 細胞では効率よく増えないこと、さらに、同細胞で A/H3N2 流行株を分離・継代すると、ウイルスの主要抗原である HA や抗インフルエンザ薬の標的蛋白質であるノイラミニダーゼ (NA) に変異が生じることが報告されている。また、 $\alpha 2,6$ シアル酸を高発現する MDCK (MDCK-SIAT1 や AX4) を用いて A/H3N2 株を分離しても同様の変異が起きることが示されている。したがって、このような培養細胞への馴化に関わる変異を持ったウイルスでは、抗原性状や抗インフルエンザ薬に対する感受性を正確に評価することができない。

季節性ウイルスが感染増殖するヒトの上気道では、 $\alpha 2,6$ シアル酸が主に発現していることが明らかにされている。そこで本研究では、ヒト上気道上皮細胞のシアル酸レセプター発現パターンを模範したヒト化 MDCK 細胞を樹立し、その季節性ウイルス感染に対する感受性を解析した。

MDCK 細胞は糖鎖末端に $\alpha 2,3$ シアル酸を付加する 7 種類の $\alpha 2,3$ シアル酸転移酵素遺伝子を有している。CRISPR-Cas9 システムを用いて、これらの遺伝子をノックアウトした細胞の作出を試みた。はじめに各遺伝子を標的とするガイド RNA と Cas9ヌクレアーゼを発現するプラスミドを MDCK 細胞に導入した。さらに、この細胞にヒト由来の $\alpha 2,6$ シアル酸転

移酵素遺伝子発現プラスミドを導入した後、薬剤選別により変異 MDCK 細胞 (hCK) を単離した。

hCK 細胞表面のシアル酸発現量を調べるために、 α 2,3 シアル酸糖鎖に特異的に結合するレクチン(MALII)と α 2,6 シアル酸糖鎖に特異的に結合するレクチン(SNA) を用いて、フローサイトメトリーにより分析した。hCK 細胞表面上の α 2,3 シアル酸量は元の MDCK 細胞や AX4 細胞に比べて顕著に低かったが、 α 2,6 シアル酸量は MDCK 細胞よりも高かった(図 1)。

hCK 細胞における季節性ウイルス (A/H1N1pdm、A/H3N2、B 型) の増殖効率を MDCK 並びに AX4 細胞と比較した。hCK 細胞における A/H1N1pdm と B 型ウイルスの増殖効率は MDCK 及び AX4 細胞とほぼ同程度であったが、A/H3N2 ウイルスの増殖効率は MDCK と AX4 細胞に比べて顕著に高かった (図 2)。さらに、インフルエンザ患者から採取した臨床検体を用いて、hCK 細胞の季節性ウイルス感染に対する感受性を AX4 細胞と比較した。その結果、A/H1N1pdm と B 型ウイルス感染に対する hCK 細胞の感受性は AX4 細胞と同じであったが、A/H3N2 ウイルス感染に対する hCK 細胞の感受性は AX4 細胞よりも顕著に高いことがわかった (図 3)。さらに、hCK 細胞を用いて臨床検体から分離した A/H3N2 ウイルスの HA と NA 遺伝子には、変異がほぼ認められなかったのに対し、MDCK あるいは AX4 細胞で分離したウイルスには高い頻度で変異が見つかった。

hCK 細胞で継代培養した A/H3N2 ウイルスの遺伝的安定性を調べるために、同細胞で 10 回継代した A/H3N2 ウイルスの HA および NA のアミノ酸配列を臨床検体中のウイルスと比較した。hCK 細胞で 10 回継代した 3 株について解析したところ、1 株で HA の幹部領域に変異がみられたが、残りの 2 株は変異が認められなかった (図 4)。HA 分子は立体構造上、球状頭部領域と幹部領域に分けられ、このうち球状頭部領域には、宿主の中和抗体が認識する主要な抗原決定基が存在する。AX4 細胞で継代したウイルス 2 株において、HA の球状頭部領域あるいは NA のシアリダーゼ活性部位に変異が認められた。このように hCK 細胞で継代培養した A/H3N2 ウイルスは高い遺伝的安定性を示した。

本研究において、変異が入ることなく季節性インフルエンザウイルスを効率よく分離培養できる培養細胞株 (hCK) を作出した。hCK 細胞で分離培養した流行株を解析することで、その抗原性状や抗インフルエンザ薬に対する感受性の変化を正確に把握することが可能になった。

以上の成績は、hCK 細胞がインフルエンザウイルス研究並びにワクチン製造にとって、非常に有用な細胞であることを示している。

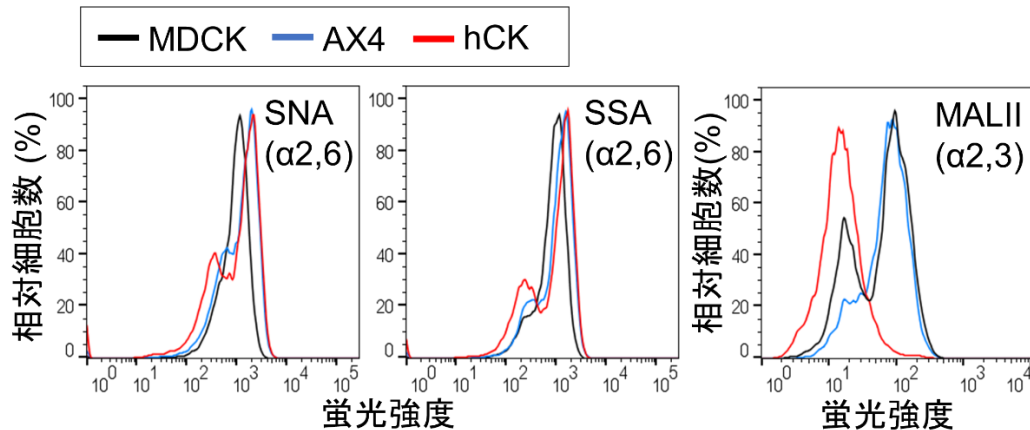


図1 hCK 細胞表面におけるシアル酸発現量

シアル酸糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いて、MDCK、AX4、および hCK 細胞の表面に発現するシアル酸量を測定した。細胞を α 2,6 シアル酸特異的レクチン(SNA、SSA) または α 2,3 シアル酸特異的レクチン(MALII)とインキュベートした後、フローサイトメトリーにより分析した。

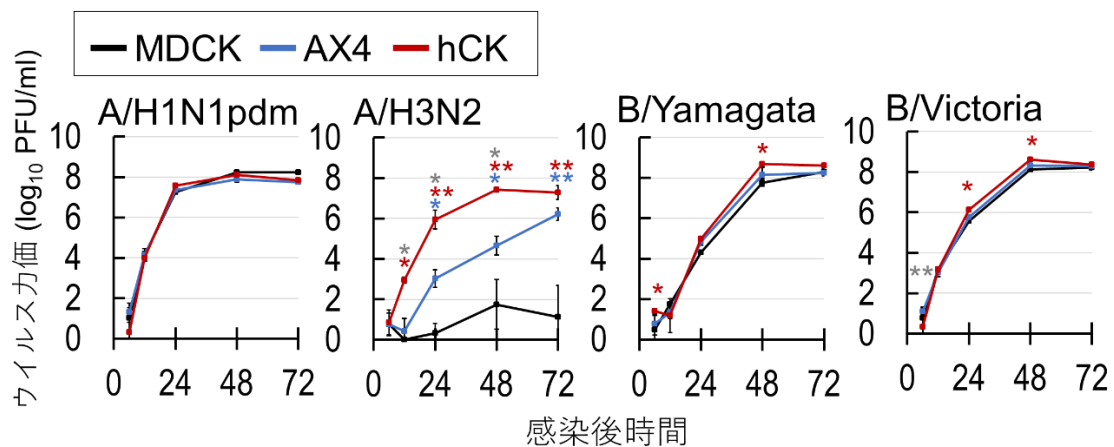


図2 hCK 細胞における季節性ウイルスの増殖効率

MDCK、AX4、および hCK 細胞に季節性ウイルス[A/Tokyo/UT001-1/2018 (H1N1pdm)、A/Tokyo/UT-DA30/2018 (H3N2)、B/Tokyo/UT-HP70-2/2018 (Yamagata 系統)、B/Tokyo/UT-WD28/2018 (Victoria 系統)]を接種した(MOI=0.002)。接種後、継時的に培養上清を回収して、上清中のウイルス力価をプラークアッセイにて測定した。赤色の*はhCK と MDCK との比較を、青色の*は AX4 と MDCK との比較を、灰色の*は AX4 と hCK との比較をそれぞれ示す (* P < 0.05; ** P < 0.01)。

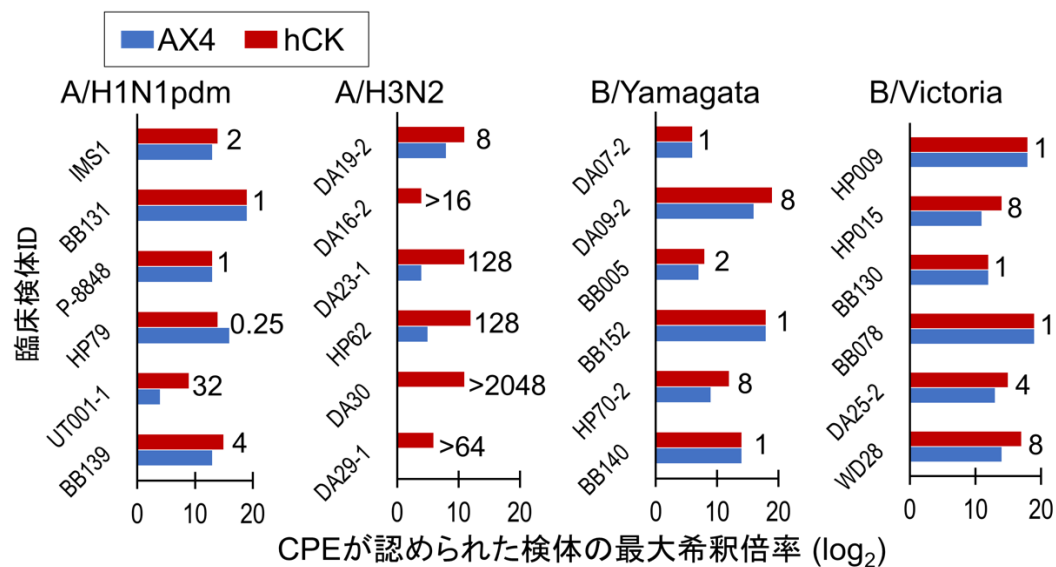


図3 hCK細胞の季節性ウイルス感染に対する感受性

AX4 および hCK 細胞に、2 倍階段 ($2^1 \sim 2^{20}$) 希釈した臨床検体を接種した。感染後 7 日目において CPE の有無を観察した。CPE が認められた検体の最大希釈倍率を細胞間で比較した。各棒グラフの横の数字は、CPE が認められた AX4 細胞での最大希釈倍率に対する hCK での最大希釈倍率の比を示す。

hCKまたはAX4細胞で継代した A/H3N2ウイルスの遺伝的安定性

臨床検体	アミノ酸変異 (10回継代後)	
	AX4	hCK
DA30	HA-N158K	—
DA29-1	NA-T148K	HA-D408D/N
DA23-1	—	—

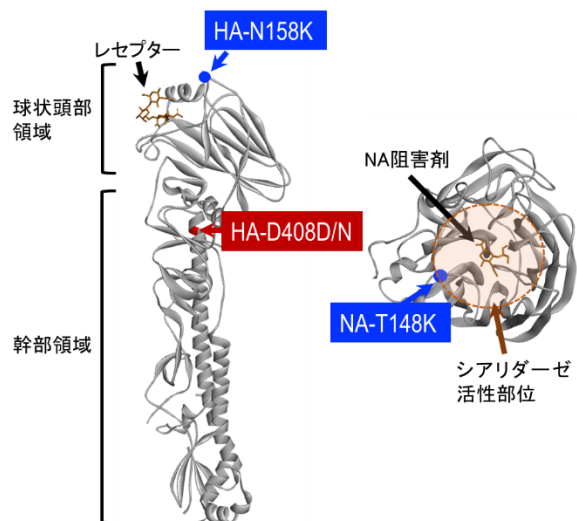


図4 hCK細胞で継代したA/H3N2季節性ウイルスの遺伝的安定性

A/H3N2 ウイルスを hCK および AX4 細胞で 10 代継代した。継代後のウイルスの HA および NA のアミノ酸配列を臨床検体中のウイルスと比較した。“—” 臨床検体中のウイルスと一致していたことを示す。HA-N158K は球状頭部領域に位置する。NA-T148K はシアリダーゼ活性部位付近に位置する。HA-D408D/N は幹部領域に位置する。