

博士論文（要約）

Analysis of temporal mutations and changes in the antigenicity of  
H3N2 influenza virus present in clinical specimens.

（臨床検体を用いた H3N2 インフルエンザウイルスの  
経時的な配列変化並びに抗原性の変化の解析）

Daisuke Jubishi

十菱 大介

## 博士論文の要約

論文題目 Analysis of temporal mutations and changes in the antigenicity of H3N2 influenza virus present in clinical specimens.

(臨床検体を用いた H3N2 インフルエンザウイルスの経時的な配列変化並びに抗原性の変化の解析)

氏名 十菱 大介

A 型インフルエンザウイルスはウイルス粒子の表面タンパク質であるヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性の違いにより亜型に分類される。現在は H1N1 亜型と H3N2 亜型のインフルエンザウイルスがヒトの間で流行している。H3N2 インフルエンザウイルス (以下、H3N2 ウイルス) は、1968 年に初めてヒトの間で流行してパンデミックを引き起こした。以来、H3N2 ウイルスは HA と NA の抗原変異を繰り返しながら現在も世界中で流行を続けている。H3N2 ウイルスは HA の遺伝子型に基づいていくつかのサブクレードに分類され、2015 年から 2016 年にかけて出現した HA-N171K、I406V、G484E のアミノ酸変異をもつサブクレード 3C.2A1 (図 1 の黄色い枠) が現在も流行している。特に HA-K92R、N121K、H311Q のアミノ酸変異を持つサブクレード 3C.2A1b (図 1 の橙色の枠) が 2017 年以降優勢となっており、さらに 3C.2A1b のうち、HA-T135K、R142G、E62G のアミノ酸変異を持つウイルスの一群 (以下、3C.2A1b/135K) が 2017-2018 年に最も優勢となっていた (図 1 の赤い枠)。優勢となった群でみられるアミノ酸変異の中には、ウイルスの増殖性を向上させる、あるいは抗原性を変化させるなどの影響を与えているものが含まれている可能性がある。ヒトに感染したウイルスは、生存に有利な変異を得たものがより増殖して割合が増えていくものと考えられるが、実際に感染した患者の中でどのように新たな変異が発生してその変異ウイルスが優勢となっていくのかについては十分に明らかになってはいない。

本研究では、ヒト感染時に H3N2 ウイルスがどのような変異を起こしているのか、その変異の生物学的意義を明らかにするために、次世代シーケンサを用いてヒト臨床検体中に含まれる H3N2 ウイルスの HA および NA 遺伝子に生じたアミノ酸変異を調べ、それらの変異がウイルスの増殖性や抗原性に及ぼす影響について解析した。

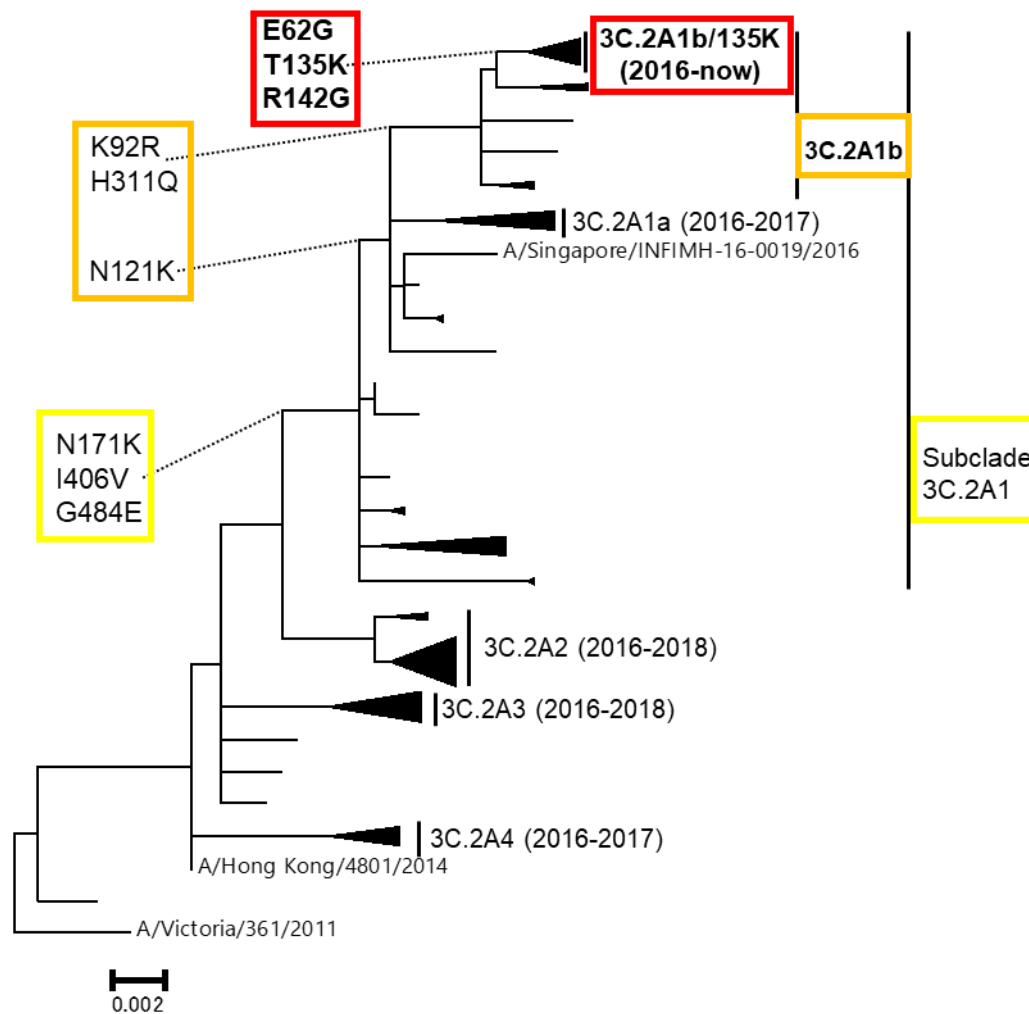


図 1. H3N2 ウイルスの系統樹 (HA)

系統樹の右側に H3N2 ウイルスのサブクレード名と流行していたシーズンを示した。サブクレード 3C.2A1 についてはサブクレードを定義するアミノ酸変異を系統樹の分岐点に示し、サブクレード名とともに黄枠で囲った。同様にサブクレード 3C.2A1b は橙枠、3C.2A1b/135K は赤枠で囲った。

2012-2013、2013-2014、2016-2017 シーズンに採取された 81 の臨床検体に由来する H3N2 ウイルスの HA および NA についてディープシーケンスを行い、それぞれの検体内に存在するウイルスの中でどのような変異がどの程度の割合で起きているのかを明らかにした。あわせて系統樹解析を行い、配列を解析したウイルスが H3N2 ウイルスのどのサブクレードに属するのか確定した。その結果、3C.2A1b/135K に特徴的な HA の変異である HA-N121K、T135K、R142G と同一の変異を持つウイルスが、3C.2A1 に属するウイルス A/Yokohama/123/2017 (H3N2; 以下、Yokohama123) において少数変異株として検出された。また、サブクレード 3C.2A1 に特徴的な変異である HA-N171K、G484E を持つ少

数変異株が、本来このような変異を持っていないサブクレード 3C.2A2 に属するウイルス A/Yokohama/75/2017 (H3N2; 以下、Yokohama75) から検出された。これらの変異のいずれかが免疫回避や増殖性の向上などに関連してウイルスの存続や流行に重要な役割を果たしている可能性があるとして推測し、Yokohama123 と Yokohama75 をもとに、リバーシジェネティクス法でそれぞれの HA に変異を導入したウイルスを作製して増殖性と抗原性の比較解析を行った。

Yokohama75 をベースに HA-N171K、HA-G484E、HA-171K+G484E を導入したウイルス、Yokohama123 をベースに HA-N121K、-T135K、-R142G を様々な組み合わせで導入したウイルスをリバーシジェネティクス法で作出した。これに加えて 2017-2018 シーズンに流行していた 3C.2A1b/135K に特徴的な変異がもたらす影響について明らかにするため、2017-2018 シーズンに分離された 3C.2A1b/135K に属するウイルス A/Yokohama/147/2017 (H3N2; 以下、Yokohama147) をベースに、HA-K121N、K135T、G142R、G62E、R92K、Q311H といった系統樹を遡るような変異を導入したウイルスも併せて作出した。HA 以外のセグメントについて、NA はそれぞれのベースとなった分離株に由来 (Yokohama75 の変異ウイルスであれば Yokohama75 由来) し、そのほかのセグメントは全て A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株に由来している。

作出したウイルスについて、各変異ウイルスの細胞内での増殖性を調べるため、hCK 細胞を用いて感染実験を行った。hCK 細胞はインフルエンザウイルスの培養細胞として頻用されている MDCK 細胞をベースに改良された細胞で、MDCK 細胞に比較して特に最近の H3N2 ウイルスが感染、増殖しやすい。この hCK 細胞に各変異ウイルスを感染させ、12、24、48、72 時間後に細胞上清を回収してウイルスの力価を測定し、ウイルスの増殖性の比較解析を行った。Yokohama123 の変異ウイルスのうち、HA-T135K、HA-N121K+T135K、HA-N121K+T135K+R142G を持つ 3 つの変異ウイルスにおいて、野生型 HA をもつウイルスに比較して感染 12 時間後および 24 時間後に有意かつ顕著な増殖性の向上が認められた。さらに、Yokohama123 の変異ウイルスについて、患者体内で出現した変異ウイルスが野生型 HA を持つウイルスを圧倒して優勢となるポテンシャルを持っているのか調べるため、2 つのウイルス (HA 野生型のウイルスと HA の変異を持つウイルスの組み合わせ) を 1:1 で混合して同時に hCK 細胞に感染させ、48 時間後に上清を回収してウイルスの力価を測定し、増殖性の競合比較解析を行った。競合試験では、HA-T135K および、-N121K+T135K+R142G は HA 野生型に対して優勢にはならなかったが、HA-N121K+T135K を有するウイルスは感染 48 時間後に HA 野生型より優勢になっていた。次に、変異ウイルスの抗原性を解析するため、2009 年、2016-2018 年に採取されたヒト血清 29 検体を用いて、変異ウイルスに対する中和実験を行い、それぞれのウイルスが持つ HA 変異による抗原性への影響を解析した。Yokohama123 の変異ウイルスを用いた中和実験では、HA-T135K あるいは HA-N121K+T135K を導入したウイルスは、より多くのヒト血清抗体で中和されやすくなっていたが、HA-N121K+T135K+R142G の

ウイルスは野生型とほぼ同程度に中和されていた。また、系統樹上の変異を遡るような変異を導入した Yokohama147 の変異ウイルスを用いた中和実験では、HA-K135T のウイルスは中和されにくくなっており、HA-K121N+K135T+G142R のウイルスは野生型とほぼ同程度に中和されていた。Yokohama75 の変異ウイルスを用いた実験では、増殖性、抗原性ともに野生型に比較して顕著な差は認められなかった。

解析の結果をまとめると、HA-T135K および-N121K+T135K のウイルスは増殖性が向上しており、特に HA-N121K+T135K は競合試験でも野生型ウイルスを圧倒していたが、いずれのウイルスも集団の持つ抗体に中和されやすいことから、集団の間で流行するには至らなかったと考えられた。それに対して、HA-N121K+T135K+R142G は、増殖性は向上しているが特に中和されやすくなるのではないので、集団内で存続しやすいと考えられる。この変異を持つサブクレード 3C.2A1b/135K が翌シーズンに優勢になった理由の一部を示していると考えられた。

過去の流行株の配列を確認したところ、1993-1997 年には HA-135K をもつ H3N2 ウイルスが流行していた。そのため、1997 年までに生まれた人の中では HA-135K を持つウイルスに有効な抗体を持つ割合が多いと考えられる。これらの結果より、HA-T135K の変異が起こると増殖性は向上するが競合優位を示すほどではなく抗原性が変化して一部の人の有する血清抗体に中和されやすくなり、変異を起こす前と比較して集団免疫率が上昇するため単独でこの変異を持つウイルスは集団内で存続しにくくなることと、HA-N121K+T135K+R142G の変異が起こると抗原性は大きく変わらないが増殖性を向上させることで存続しやすくなることが推察された。Yokohama75 の変異ウイルスを用いた実験では増殖性、抗原性ともに顕著な違いは認められず、HA-N171K と HA-G484E の変異がもたらす影響については、今回の研究では十分に明らかにすることはできなかった。

本研究により、実際に流行しなかったクレードに属する H3N2 ウイルスの中にも、その後流行した株の持つ変異と同様の変異を持つウイルスが少数ながら存在していることが分かった。これらのウイルスは一定数存在するが、抗原性や増殖性などの問題により、その全てが流行株として存続するわけではないと考えられた。また、2017 年以降に流行している 3C.2A1b/135K に属するウイルスで見られる HA-T135K のアミノ酸変異はウイルスの増殖性を向上させるが、HA-T135K 単独で発生した場合は、ウイルスの抗原性を変化させることでウイルスがヒト抗体に中和されやすくなることがわかった。しかしながら、同様に 3C.2A1b/135K でみられる HA-N121K と HA-R142G のアミノ酸変異を同時に得ることで増殖性を向上させつつヒト抗体に中和されにくくなることもわかり、この変異を持っているウイルスの生存可能性は向上していると推察された。今後の研究で H3N2 ウイルスの流行に関わるメカニズムを解明するにあたり、本研究で示された結果がその一助になるものと思われる。