

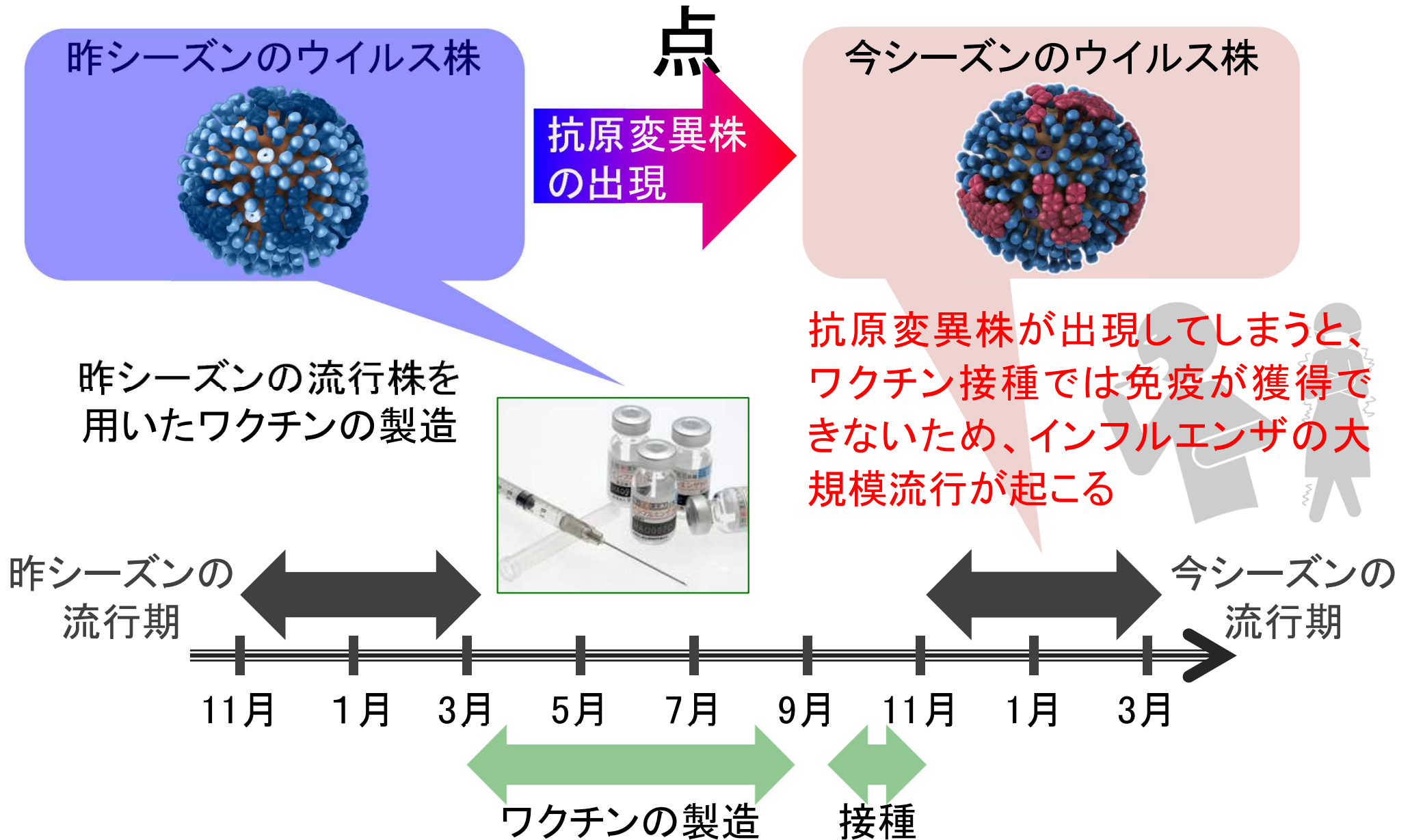
平成30年11月8日

インフルエンザウイルスの未来流行株 予測システムの開発

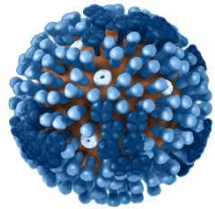
川崎医科大学 医学部 微生物学

助教 内藤 忠相

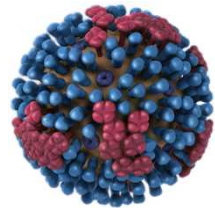
インフルエンザワクチンにおける問題



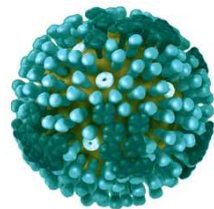
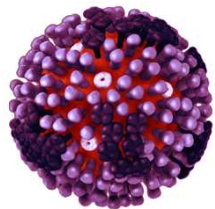
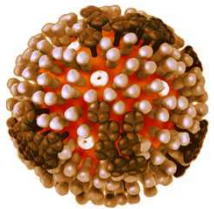
解決策



現在の流行ウイルス株



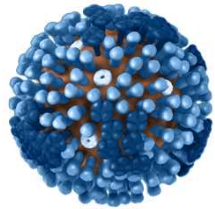
出現の可能性のある新規抗原変異株を単離し、
ワクチン開発に必要なウイルス性状情報を得る



さらに将来的な未来流行株を単離する
ことで、ウイルスの進化方向性と変異
多様性を解析し、ワクチン開発に資す
る基盤情報を蓄積する



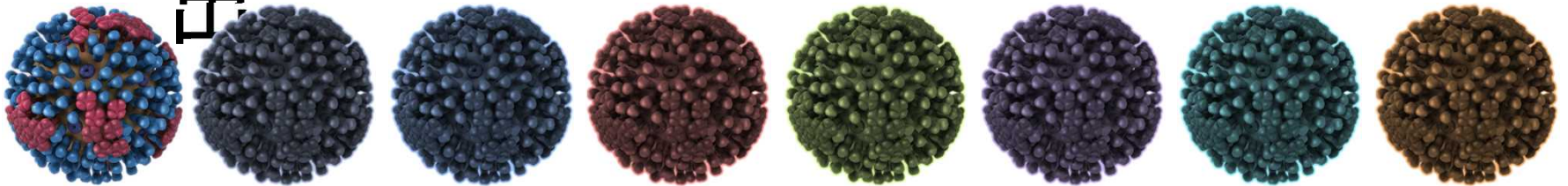
解決に必要な技術



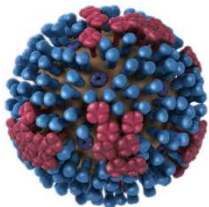
現在の流行ウイルス株



変異ウイルスライブラリーの作
出



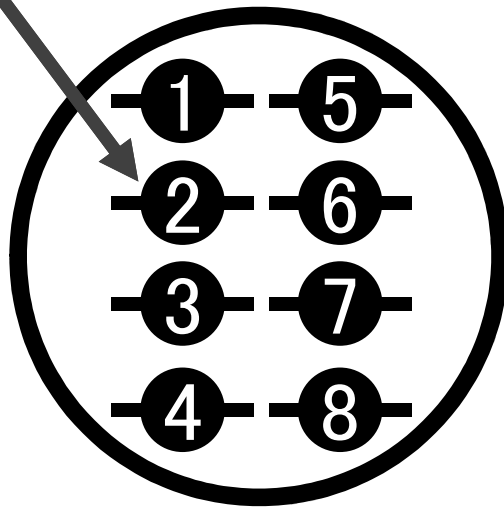
新規抗原変異株のスクリーニング



新技術の特徴

変異ウイルスライブラリーの作出方法を開発した

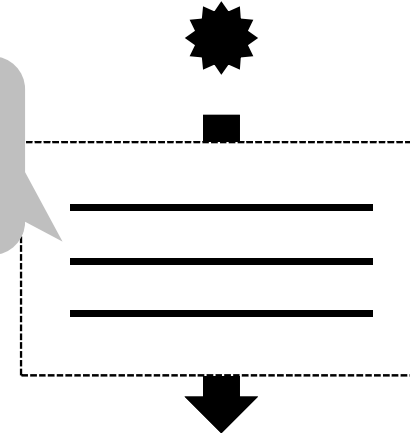
第2分節にPB1ポリメラーゼが
コードされている



ゲノムは8本に分節化された
一本鎖RNA

増殖中に複製した
ウイルスゲノム

野生型PB1ウイルス
(野生株)

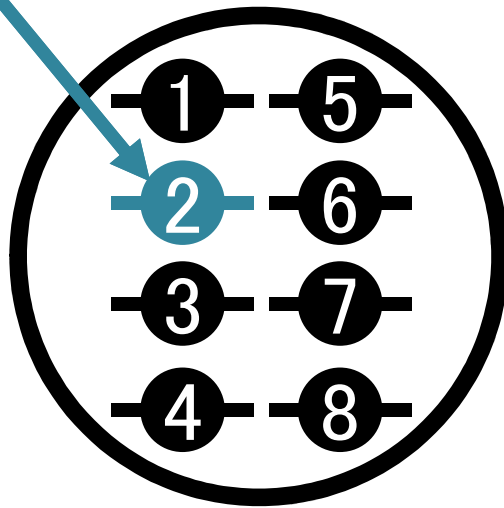


培養細胞を用いた感染実験では
変異ウイルスは作られない

新技術の特徴

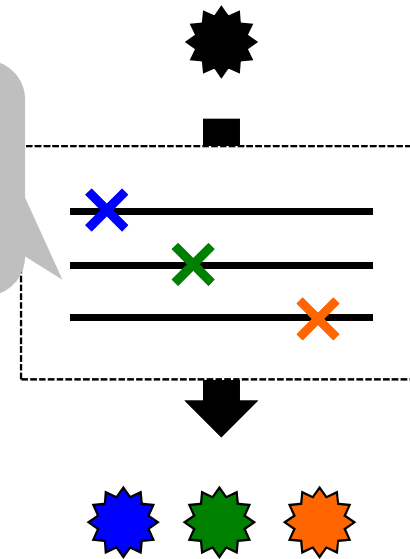
変異ウイルスライブラリーの作出方法を開発した

遺伝子組換え操作による
PB1-K471H置換の導入



PB1-K471Hウイルス
(本発明ウイルス)

変異導入効率が
3.5倍向上する



高頻度で変異株が出現することで
変異ウイルスライブラリーが作出される

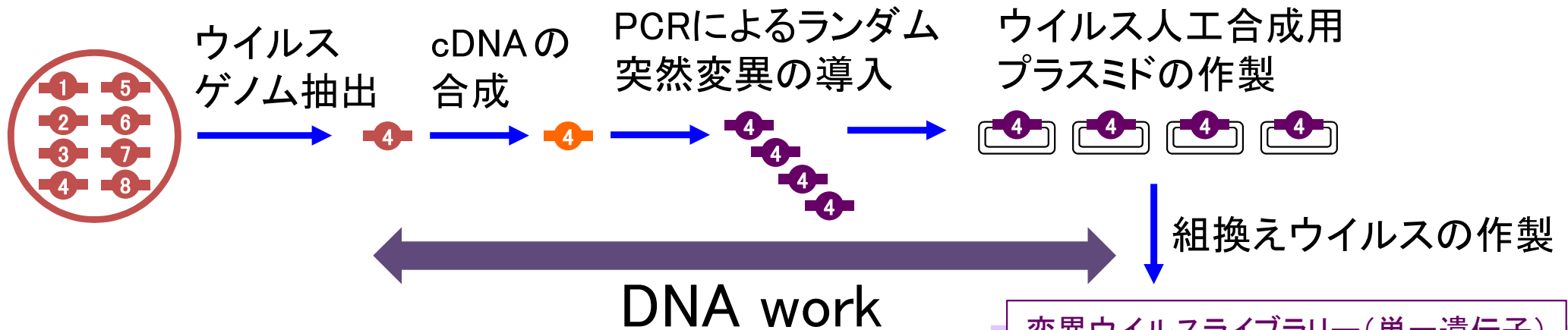
従来技術との比較

本発明ウイルスを用いて**ウイルスライブラリー**を作製する際の優位な点

比較項目	従来技術	本発明ウイルス
変異を導入する酵素源と方法	市販のDNAポリメラーゼを用いたPCR反応	ウイルス自身のRNAポリメラーゼを用いたゲノム複製反応
標的ウイルスゲノム	1つのウイルスタンパク質に限定	全ウイルスタンパク質の全アミノ酸領域に変異導入が可能
アミノ酸変異を伴う塩基置換の割合	低い	高い (非同義置換が高頻度で起こる)
ウイルスライブラリーの安全性	低い	高い (37°Cでは増殖できない)

比較項目	従来技術	本発明ウイルス
変異を導入する酵素源と方法	市販のDNAポリメラーゼを用いたPCR反応	ウイルス自身のRNAポリメラーゼを用いたゲノム複製反応

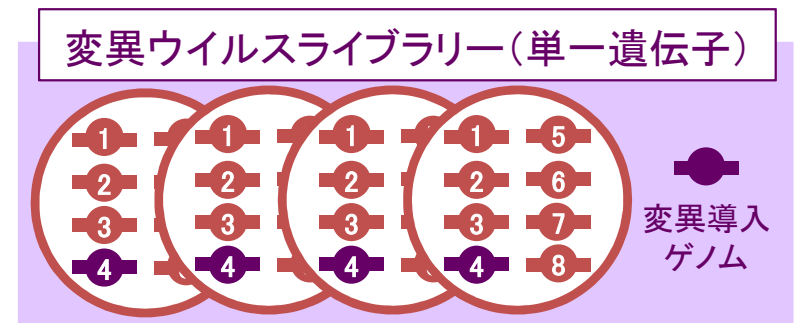
従来法による変異ウイルスライブラリーの作製方法



従来法では、

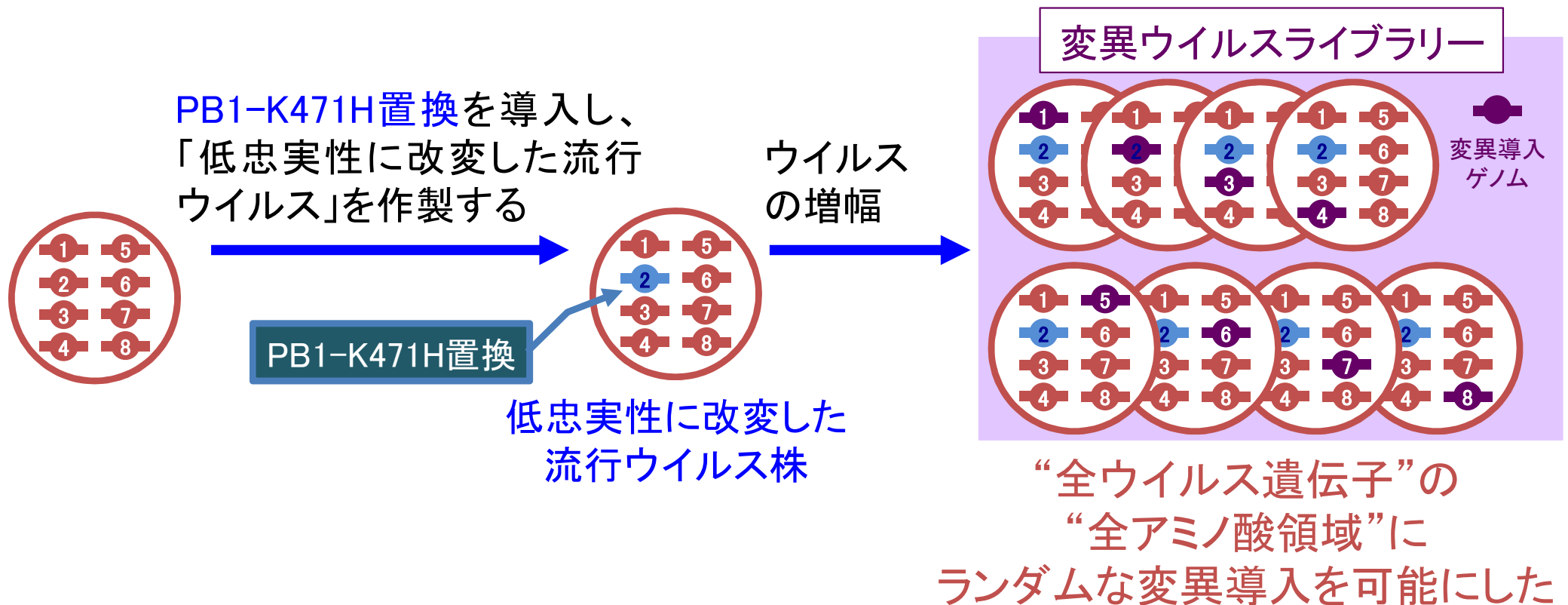
(1)ランダム突然変異をDNAポリメラーゼによって導入させるため、作業工程が多段階となる

(2)同時に複数のウイルス遺伝子を標的とした変異ウイルスライブラリーは作製できない



比較項目	従来技術	本発明ウイルス
標的ウイルスゲノム	1つのウイルスタンパク質に限定	全ウイルスタンパク質の全アミノ酸領域に変異導入が可能

低忠実性ポリメラーゼ導入による変異ウイルスライブラリーの作製



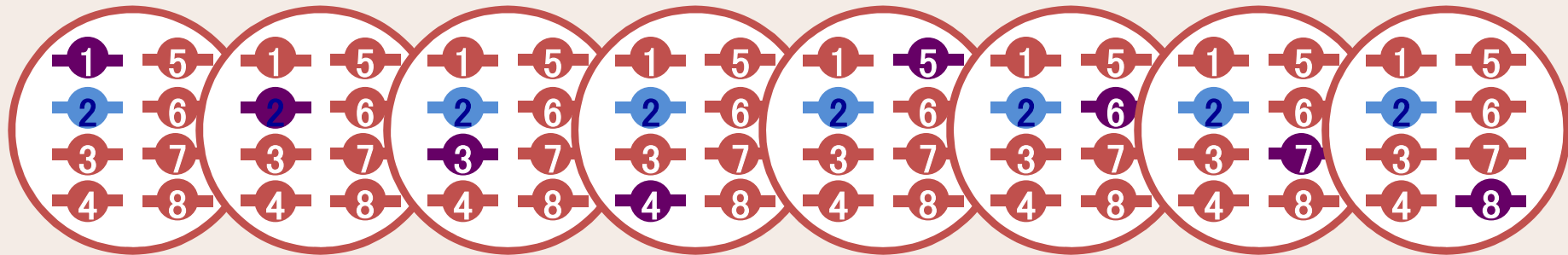
従来技術との比較

本発明ウイルスを用いて**ウイルスライブラリー**を作製する際の優位な点

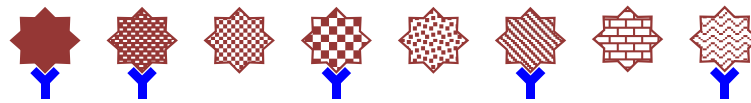
比較項目	従来技術	本発明ウイルス
変異を導入する酵素源と方法	市販のDNAポリメラーゼを用いたPCR反応	ウイルス自身のRNAポリメラーゼを用いたゲノム複製反応
標的ウイルスゲノム	1つのウイルスタンパク質に限定	全ウイルスタンパク質の全アミノ酸領域に変異導入が可能
アミノ酸変異を伴う塩基置換の割合	低い	高い (非同義置換が高頻度で起こる)
ウイルスライブラリーの安全性	低い	高い (37°Cでは増殖できない)

流行株に由来する変異ウイルスライブラリー

● 変異導入ゲノム



中和抗体を用いた免疫逃避変異株の単離



感染患者由来の
抗ウイルス抗体
(γ)と反応させる

抗体と反応しない免疫逃避ウイルスを
プラークアッセイにより単離する



未来流行株の候補ウイルス

→新規な抗原変異株になりうるかどうかの解析を行う

実用化の例

既存の診断キットでは検出できない新規抗原変異株が単離できる
 ➔ 未来流行株を検出する新規診断キットの開発が可能になる

インフルエンザ診断キットの一例



診断キットの問題点

抗原変異株が出現するとインフルエンザ陽性患者が陰性と診断され、早期治療の機会を失い流行規模が拡大する

解決方法

抗原変異株を高感度に検出できる抗NP抗体を取得し、新型株の流行に備える

③色素標識抗体が“抗NP抗体と結合する抗体”に捕捉される

②拡散した抗原抗体複合体は、線状配置してある抗NP抗体に捕捉される

採取したウイルス

抗原抗体複合体

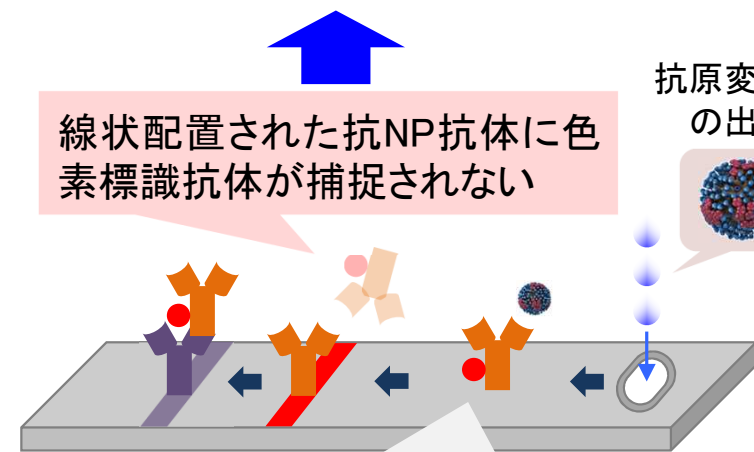
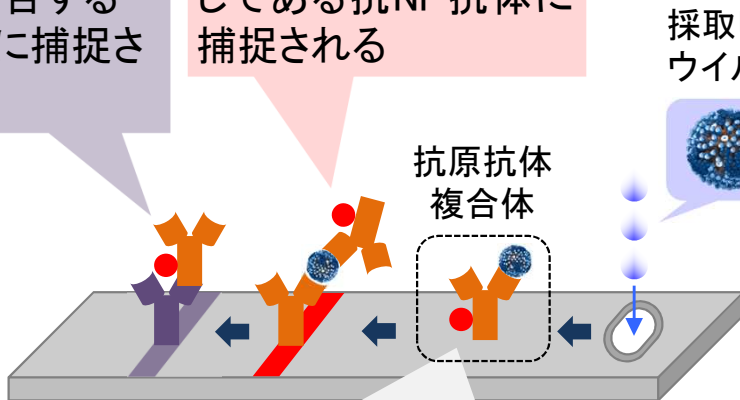
①クロマト内の抗体がウイルス抗原と抗原抗体複合体を形成し拡散する

偽陰性と判定される

線状配置された抗NP抗体に色素標識抗体が捕捉されない

抗原変異株の出現

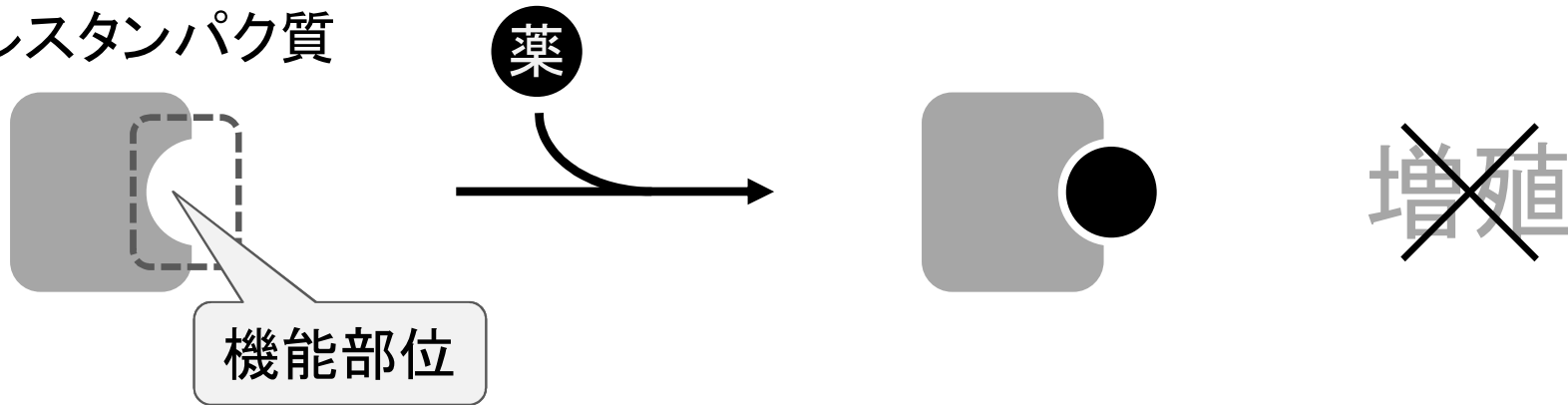
抗原変異株は抗NP抗体と結合せず抗原抗体複合体を形成しない



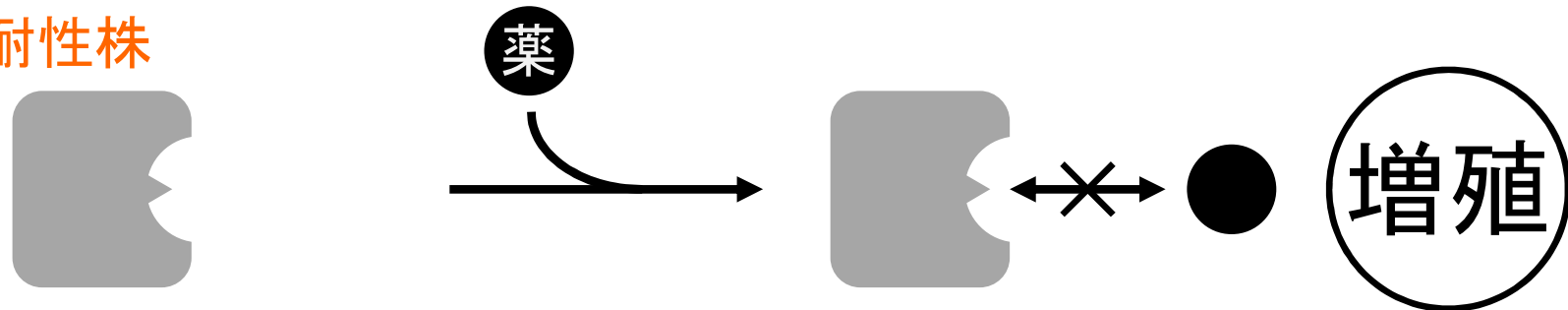
実用化の例

➡薬剤耐性ウイルスが出現しづらい抗ウイルス剤の開発に応用

ウイルスタンパク質

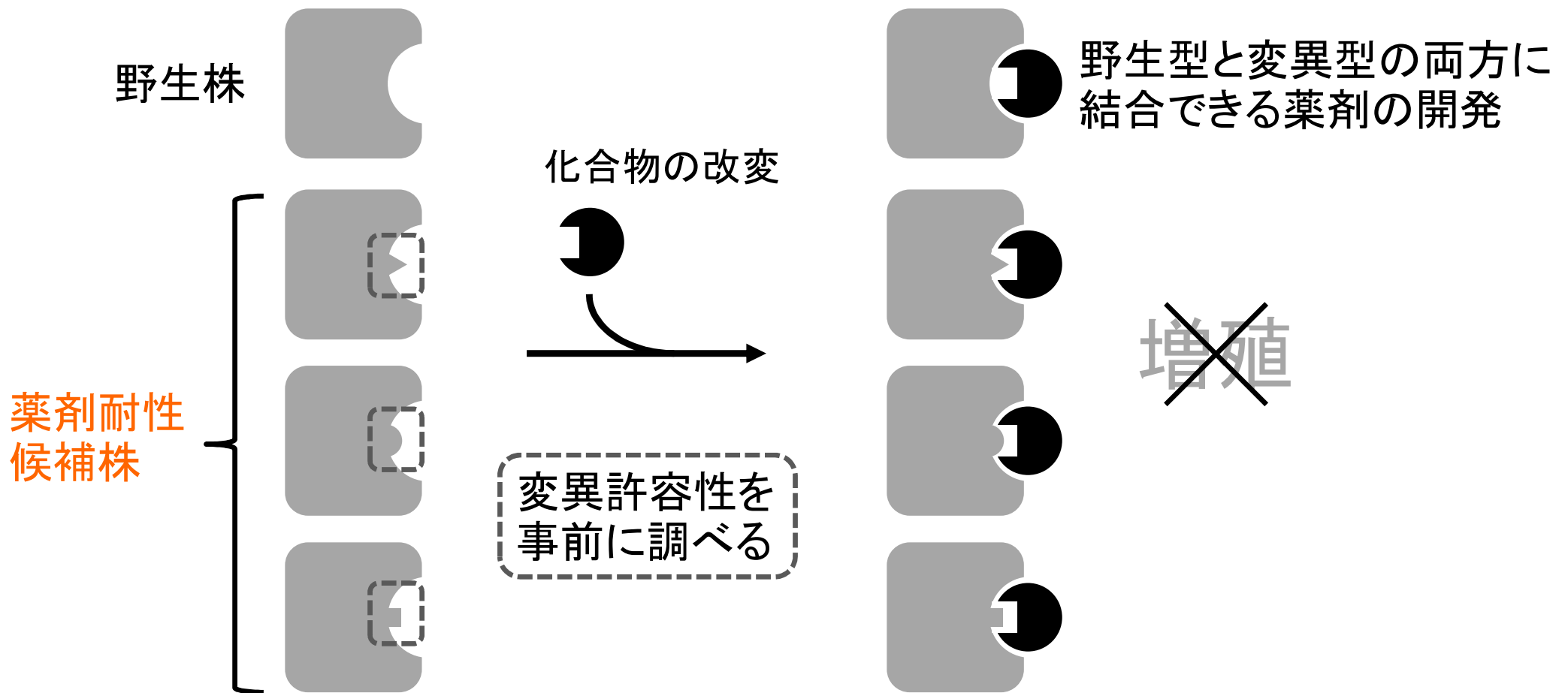


薬剤耐性株



実用化の例

➡薬剤耐性ウイルスが出現しづらい抗ウイルス剤の開発に応用
変異ウイルスライブラリーを応用することで、開発段階で
薬剤耐性獲得に関わる変異許容性を網羅的に予測



本技術に関する知的財産権

発明の名称：インフルエンザウイルスRNA
ポリメラーゼの変異型PB1

出願番号：特願2017-214983

出願人：川崎学園

発明者：内藤忠相、齊藤峰輝

問い合わせ先

学校法人川崎学園 川崎医科大学
産学連携知的財産管理室

Tel: 086-462-1111 (内線: 26049)

Fax: 086-464-1073

e-mail: s-renkei@med.kawasaki-m.ac.jp

〒701-0192 岡山県倉敷市松島577番地

謝辞

インフルエンザウイルスの逆遺伝学システムを
分与していただいた東京大学・医科学研究所・
河岡 義裕教授に感謝申し上げます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究
開発機構(AMED)の橋渡し研究戦略的推進プロ
グラムの支援によって行われました。