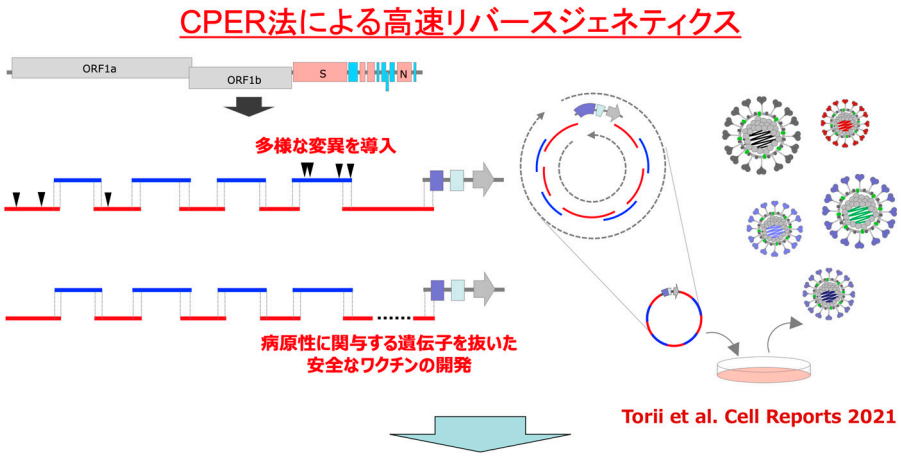
103　病原ウイルスの増殖性および病原性発現機構の解明	福原　崇介

【目的】我々は SARS-CoV-2 の高速リバースジェネティクス系を確立し、組換えウイルスを簡便かつ高速で作製できるようになった（下図）。この Circular Polymerase Extension Reaction（CPER）法と呼ばれる手法は、PCR によってウイルスゲノムを断片的に増幅し精製したのちに、再度の PCR 反応により連結させ環状化し、感受性細胞に直接導入する。導入後 4 日で親株と同等の性状を持つ感染性組換えウイルスが産生される。本研究では、この技術を用いて、次々に出現する変異 SARS-CoV-2 を作製し、変異の意義の解明を行なった。

【方法および結果】本研究内で以下の 4 種類の変異解析を行った。1. 流行株の大規模な配列解析により、HLA-A24 によって認識されるエピトープ部位の変異、Y453F と L452R を同定した。Y453F 変異は、HLA-A24 から逃避し、感染受容体 ACE2 への結合性を高める能力を持つが、この変異を持つ B.1.1.298 系統は、2020 年秋のデンマークでの一過的な流行以降に収束した。一方、L452R 変異は、HLA-A24 から逃避するのみならず、感染受容体 ACE2 への結合性を高め、ウイルスの膜融合活性を高めることによってウイルスの感染力を増強させることを明らかにした。2. デルタ株（B.1.617.2 系統）が、従来株に比べて病原性が高いことを明らかにした。また、デルタ株のスパイクタンパク質の細胞融合活性は、従来株や他の変異株に比べて顕著に高く、その活性は、スパイクタンパク質の P681R 変異によって担われていることを明らかにした。そして、P681R 変異を持つウイルスを CPER 法にて人工合成し、ハムスターを用いた感染実験を実施した結果、P681R 変異の挿入によって、病原性が高まることを明らかにした。3.「オミクロン株（B.1.1.529, BA 系統）」が、従来株に比べて病原性が低いことを明らかにした。また、オミクロン株のスパイクタンパク質の細胞融合活性は、従来株やデルタ株に比べて顕著に低いことを明らかにした。また、数理モデリング解析により、オミクロン株のヒト集団内における増殖速度は、デルタ株に比べて 2〜5 倍高いことが明らかになった。4. オミクロン BA.2 株のヒト集団内における相対的実効再生産数は、オミクロン BA.1 株に比べて 1.4 倍高いことがわかった。また、オミクロン BA.2 株の抗原性が、オミクロン BA.1 株とは異なることを明らかにした。さらに、オミクロン BA.2 株のスパイクタンパク質の合胞体形成活性は、オミクロン BA.1 株に比べて有意に高いことを解明し、オミクロン BA.2 株スパイク蛋白質を持つウイルスは、オミクロン BA.1 株スパイク蛋白質を持つウイルスに比べてハムスターにおける病原性が高いことを明らかにした。

CPER 法によるリバースジェネティクスを駆使した SARS-CoV-2 の変異解析



103. 病原ウイルスの増殖性および病原性発現機構の解明

福原　崇介

北海道大学 医学研究院 微生物学免疫学分野 病原微生物学教室

Key words：SARS-CoV-2，リバースジェネティクス，病原性，増殖性

緒　言

2019 年より始まった新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のパンデミックは 2022 年 4 月現在でも続いており、感染者数、死者数がいまだに増え続けている。さらにその経済的ダメージは計り知れない。今回の SARS-CoV-2 感染症の制御のために早期に mRNA をベースとしたワクチンが開発され、早いペースで接種されたにも関わらず、感染のコントロールが難しい大きな理由として、変異株の出現が挙げられる。従来株に対しては 2 回の接種でかなり効率的に感染拡大を制御できていたにも関わらず、現在流行しているオミクロン株の感染においては重症化を予防できるものの、感染拡大に対する抑制は不十分である。また、病原性や伝播性、個体内での増殖性は変異に伴い、大きく変化したこともそれぞれの変異株に引き起こされる感染症の制御法や治療法の決定に難渋することに繋がった。

我々は、2020 年の 8 月に SARS-CoV-2 の高速リバースジェネティクス系を確立し、組換えウイルスを簡便かつ高速で作製できるようになった［1］。この Circular Polymerase Extension Reaction（CPER）法と呼ばれる手法は、PCR によってウイルスゲノムを断片的に増幅し精製したのちに、再度の PCR 反応により連結させ環状化し、感受性細胞に直接導入する。導入後 4 日で親株と同等の性状を持つ感染性組換えウイルスが産生される。本研究では、この技術を用いて、次々に出現する変異 SARS-CoV-2 を作製し、変異の意義の解明を行なった。

方　法

GSAID（Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data）に登録されている SARS-CoV-2 のウイルスゲノム配列を調査し、各国の流行状況の調査を行い、重要と考えられる変異株または変異に着目をした。臨床分離株を用いることが困難な場合は CPER 法による組換えウイルスの作製を行った。具体的にはウイルスゲノムの断片を PCR で増幅後、精製し、全ウイルスゲノムをカバーする 9 本のフラグメントとプロモーターを含むリンカーフラグメントを混和し、再度の PCR 反応により環状にした。精製することなく、トランスフェクションにより細胞に導入することで、およそ 2 週間程度で目的の変異組換えウイルスを得た。*In vitro* のアッセイとしては、Vero-E6-TMPRSS2 細胞、HEK293-ACE2/TMPRSS2 細胞、Calu3 細胞、Huh7 細胞などを用いて、増殖性の評価としては、経時的なウイルス量及び感染性ウイルス力価を計測した。また、スパイクタンパク質の開裂の評価としては、Immunoblotting によって分子量の違いによりその効率を決定した。

in vivo モデルとしてはハムスターへの感染系を用いた。ハムスターでの病原性の評価として、体重の変化と呼吸機能検査、病理解析を行った。体重は感染後 7 日目までは毎日と 10 日目と 14 日目で測定した。呼吸機能検査としては Penh や Rpef、SpO2 の計測を行った。また病理解析としては、HE 染色により炎症の程度を評価し、炎症のスコアリングを行い、各変異株の病原性の違いを解析した。増殖性の評価としては、口腔スワブと肺組織を回収し、ウイルス量の定量と感染性ウイルス力価の計測を行った。また、病理解析にて SARS-CoV-2 の N タンパク質の検出を行った。

結果及び考察

1. SARS-CoV-2 のスパイクの L452R 変異は免疫からの逃避と細胞への感染性に関与する［2］

SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の一部が、「HLA-A24」という、日本人に多く見られる型の細胞性免疫によってきわめて強く認識されることを、免疫学実験によって実証した。次に、75 万配列以上の SARS-CoV-2 の流行株の大規模な配列解析を行い、スパイクタンパク質の HLA-A24 で認識される部位に、いくつかの重要な変異があることを見出した。2020 年にデンマークで流行した B.1.1.298 系統で見つかった Y453F と、現在世界中で流行拡大している B.1.617 系統（通称「インド株」）と B.1.427/429 系統（通称「カリフォルニア株」）の変異、L452R 変異というアミノ酸変異である。更に免疫学実験により、これらの変異はいずれも、HLA-A24 による細胞性免疫から逃避することを実証したが、これは、“懸念される変異株（Variants of Concern：VOC）”が、細胞性免疫から逃避することを実証した世界で初めての成果である。この研究で見出した Y453F 変異と L452R 変異はどちらも、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の中でも、新型コロナウイルスの感染受容体に結合するモチーフの中の変異であった。そこで次に、これらの変異が、ウイルスの感染と複製効率に与える影響を、ウイルス学実験で検討し、これらの変異は増殖性を増強することも明らかにし、以上の内容を Cell Host Microbe 誌に発表した。

2. SARS-CoV-2 のデルタ株のスパイクの P681R 変異は細胞融合能と病原性を増強する［3］

2020 年の冬以来、SARS-CoV-2 が、その流行の過程において高度に多様化し、さまざまな新たな特性を獲得していることが明らかとなっていた。2020 年末にインドで出現した新型コロナウイルス「デルタ株（B.1.617.2 系統）」は、2021 年春にインドにおいて、1 日の感染者数が 30 万人を超える大規模なアウトブレイクを発生させ、全世界に伝播した。2021 年 10 月頃には、デルタ株は、日本を含めた世界の多数の国々におけるパンデミックの主たる原因変異株となった。

この研究では、デルタ株のウイルス学的特徴を明らかにするために、まず、培養細胞を用いた感染実験を行った。その結果、デルタ株は、従来株や他の VOC／“注目すべき変異株（Variants of Interest：VOI）”よりも、細胞融合活性が高く、デルタ株に感染した細胞は、巨大な合胞体を形成することが明らかになった（図 1A）。次に、ハムスターを用いた感染実験の結果、デルタ株は、従来株と比べ、ウイルスの増殖効率はほぼ同程度であるものの感染の広がり方は早く、肺組織において炎症を示すⅡ型肺胞上皮細胞が増えるなど、従来株よりも高い病原性を示すことを解明した（図 1B）。

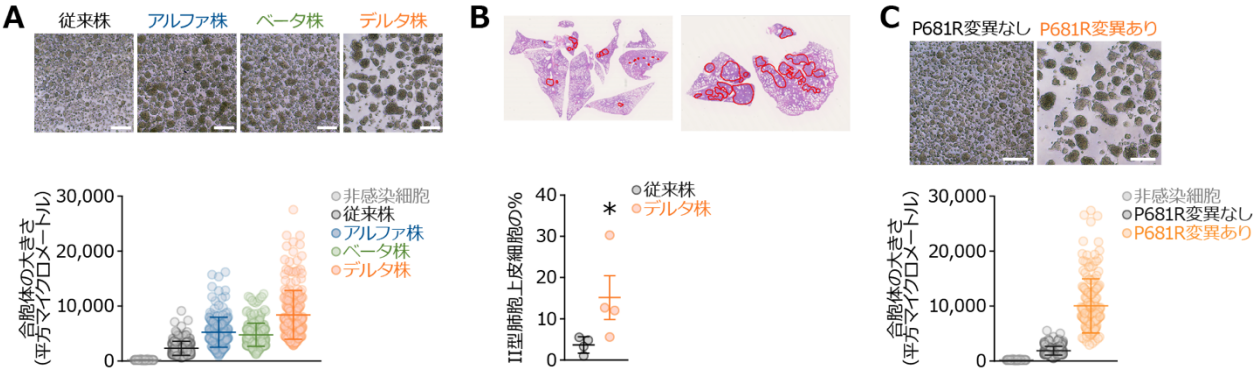


図 1. SARS-CoV-2 のデルタ株は P681R 変異を介して高い細胞融合能と高い病原性を示す

A） 従来株、アルファ株、ベータ株、デルタ株の細胞融合能、VeoE6/TMPRSS2 に各ウイルスを感染後 72 時間の細胞を撮影し、合胞体のサイズを測定した。スケールバー：100μm。

B） 従来株、デルタ株の感染ハムスターの肺における 2 型肺胞細胞の誘導、各ウイルス感染後 5 日の肺組織の HE 染色における 2 型肺胞上皮細胞の割合を測定した。：*$p<0.05$（Student's T 検定）。

C） P681R 変異による合胞体の形成効率の違い、CPER 法で作製した P681R 変異ウイルスを感染させた際の合胞体のサイズの変化を検討した。スケールバー：100μm。

次に、我々は、デルタ株のスパイクタンパク質に特徴的な変異のひとつである、P681R という変異に着目した。まず、P681R 変異を挿入したスパイクタンパク質は、従来株のスパイクタンパク質よりも、高い細胞融合活性を示すことがわかった。これは、P681R 変異が、デルタ株の高い細胞融合活性の要因となっていることと関連していると予想された。次に、従来株に P681R 変異を挿入した SARS-CoV-2 を CPER 法により人工合成し、培養細胞を用いた感染実験を行った。その結果、デルタ株と同様に、P681R 変異を有する変異ウイルスは、親株のウイルスに比べて、より大きな合胞体を形成した（図 1C）。そして、この P681R 変異を有する変異ウイルスをハムスターに感染させた結果、親株に比べ、顕著な肺機能の低下と、肺における炎症応答の増悪という、高い病原性を示すことが明らかになった。このことから、デルタ株の高い病原性には P681R というスパイクの変異による高い細胞融合能が関連することが明らかになった。この研究は Nature 誌に発表した。

3. SARS-CoV-2 のオミクロン株（BA.1）株は細胞融合能が低く、病原性も低い［4］

2021 年末に南アフリカで出現した新型コロナウイルス「オミクロン株（B.1.1.529：BA 系統）」は、11 月 26 日に WHO から VOC として命名されて以降、またたく間に全世界に伝播した。2022 年 1 月には、オミクロン株は、日本を含めた世界の多数の国々におけるパンデミックの主たる原因変異株となり、4 月現在も感染者数は世界中で多いままである。

この研究では、オミクロン株のウイルス学的特徴を明らかにするために、まず、培養細胞を用いた感染実験を行った。その結果、オミクロン株は、従来株やデルタ株よりも、細胞融合活性が低く、新型コロナウイルスに感染した細胞が示す合胞体をほとんど形成しないことが明らかになった（図 2A）。次に、ハムスターを用いた感染実験の結果、オミクロン株は、従来株やデルタ株に比べ、体重減少や呼吸機能の異常という病徴が顕著に低いことが明らかになった（図 2B）。

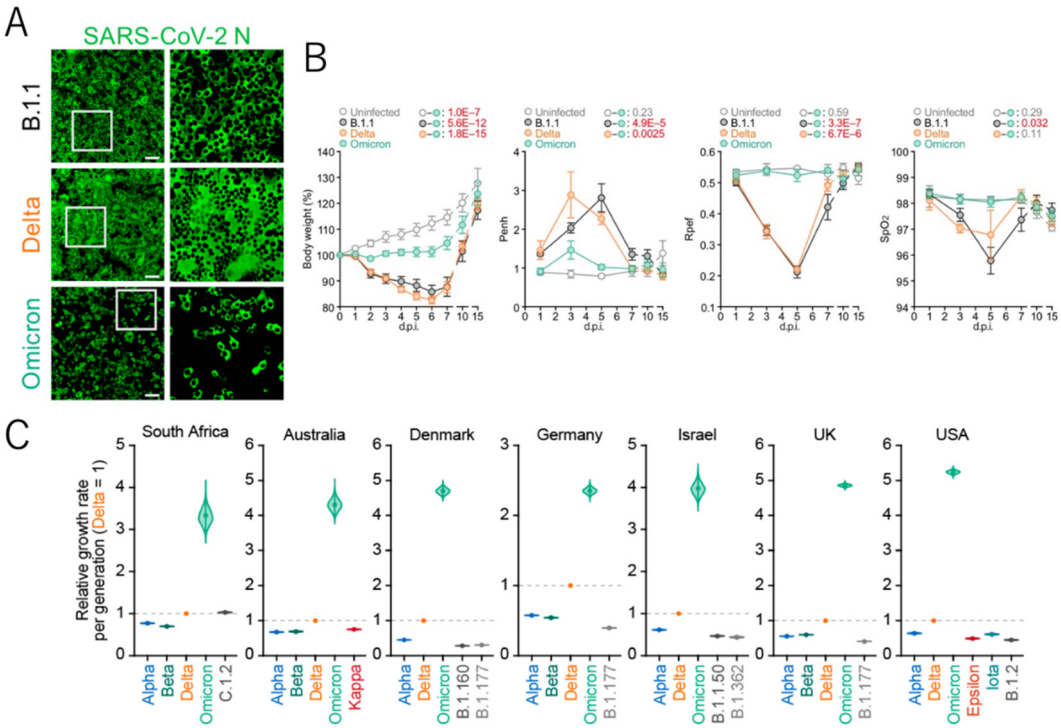


図 2. オミクロン株は従来株や他の VOC よりも細胞融合能が弱く、弱毒化している

A) 従来株、デルタ株、オミクロン株の細胞融合能、VeroE6/TMPRSS2 に各種ウイルスを感染させ、24 時間後に感染細胞を染色している。スケールバー：100 μm。

B) 従来株、デルタ株、オミクロン株のハムスターにおける病原性、左から体重変化、呼吸機能検査として PenH、Rpef、SpO2 を測定。$p<0.05$（Student's T 検定）。

C) オミクロン株と他の VOC のヒト集団内の増殖効率の比較。

次に、我々は、世界各国のウイルスゲノム取得情報を基に、ヒト集団内におけるオミクロン株の増殖率を推定したところ、オミクロン株のヒト集団での増殖速度は、デルタ株に比べて 2～5 倍高いことが明らかになった（図 2C）。

この研究により、オミクロン株は、従来株やデルタ株よりも病原性が低いことが明らかになったが、仮に弱毒化していたとしても、オミクロン株の感染による有症化・重症化のリスクはゼロではなく、加速的な流行拡大によって、また第 5 波のような医療逼迫が起きてしまう恐れもあり、引き続き感染対策を続けることが肝要だと考えられた。この研究成果は Nature 誌に発表した。

4. SARS-CoV-2 の BA.2 株のスパイクタンパク質は細胞融合能と病原性が BA.1 株よりも高い［5］

2021 年末に南アフリカで出現した新型コロナウイルス「オミクロン BA.1 株」は、11 月 26 日に命名されて以降、またたく間に全世界に伝播した。その後、2022 年 3 月から世界各国で、オミクロン株の派生株である「オミクロン BA.2 株」が検出され、日本を含めた世界の多数の国々において、オミクロン BA.1 株からオミクロン BA.2 株への置き換わりが進んできた。

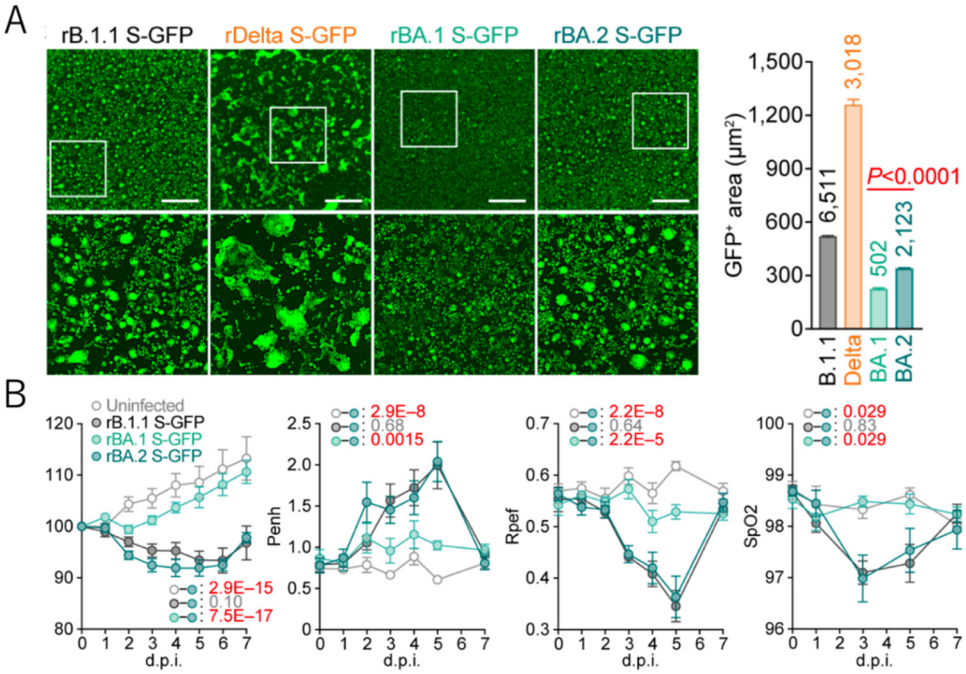


図 3. BA.2 株のスパイクタンパク質は BA.1 株と比べて a 高い細胞融合能と高い病原性を持つ

A) 従来株、デルタ株、BA.1 株、BA.2 株の細胞融合能、VeroE6/TMPRSS2 に各種ウイルスを感染させ、24 時間後に感染細胞を染色している。スケールバー：100 μm。$p<0.05$（マンホイットニーの U 検定）。

B) 従来株、BA.1 株、BA.2 株のハムスターにおける病原性、左から体重変化、呼吸機能検査として PenH、Rpef、SpO2 を測定。$p<0.05$（Student's T 検定）。

この研究では、オミクロン BA.2 株のウイルス学的特徴を明らかにするために、まず、世界各国のウイルスゲノム取得情報を基に、ヒト集団内におけるオミクロン株の実効再生産数を推定した。その結果、オミクロン株 BA.2 株のヒト集団での増殖速度は、オミクロン BA.1 株に比べて 1.4 倍高いことが明らかになった。また、オミクロン BA.2 株はオミクロン BA.1 株同様、感染やワクチンによって誘導される中和抗体に抵抗性を示すこと、さらに、オミクロン BA.1 株感染者やオミクロン BA.1 株免疫動物の検体を用いた解析の結果、オミクロン BA.1 株単独によって誘導される抗体は、オミクロン BA.2 株への中和活性が低下していること、つまり、オミクロン BA.1 株とオミクロン BA.2 株では抗原性が異なることを明らかにした。さらに、培養細胞を用いた感染実験の結果、オミクロン株 BA.2 株は、オミクロン BA.1 株よりも、合胞体形成活性が高いことを明らかにした（図 3A）。最後に、ハムスターを用いた感染実験の結果、オミクロン BA.2 株スパイク蛋白質を持つウイルスは、オミクロン BA.1 株スパイク蛋白質を持つウイルスに比べ、体

重減少や呼吸機能の異常という病徴が有意に高いことを明らかにした（図 3B）。

本研究は全長 BA.2 株を用いた検討ではなく、スパイクだけを BA.2 株に変えたキメラウイルスであるため、スパイク以外のタンパク質が病原性や増殖性に何らか関与している可能性があり、今後の詳細な検討が必要である。この研究成果は Cell 誌に発表された。

CPER 法を用いることによって、様々な変異組換えウイルスを迅速に作製することができ、次々に出現する変異株の性状解析に応用することができた。今後、このような高速リバースジェネティクスを様々な新興再興ウイルスに応用することで、変異解析のみならず、創薬やワクチン開発にも大きく貢献できると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学医科学研究所の佐藤佳先生が主宰する The Genotype to Phenotype Japan（G2P-Japan）コンソーシアムのメンバーとの共同研究で行われた。また、CPER 法の確立は大阪大学微生物病研究所の鳥居志保博士と松浦善治教授との共同研究で行われた。

文　献

1) Torii S, Ono C, Suzuki R, Morioka Y, Anzai I, Fauzyah Y, Maeda Y, Kamitani W, **Fukuhara T** (Corresponding author) and Matsuura Y. A novel reverse genetics system for SARS-CoV-2 by using circular polymerase extension reaction. **Cell Rep**. 35(3): 109014, 2021

2) Motozono C, Toyoda M, Zahradnik J, Saito A, Nasser H, Tan TS, Ngare I, Kimura I, Uriu K, Kosugi Y, Yue Y, Shimizu R, Ito J, Torii S, Yonekawa A, Shimono N, Nagasaki Y, Minami R, Toya T, Sekiya N, **Fukuhara T**, Matsuura Y, Schreiber G; Genotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Ikeda T, Nakagawa S, Ueno T and Sato K. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. **Cell Host Microbe**. 29(7): 1124-36, 2021.

3) Saito A, Irie T, Suzuki R, Maemura T, Nasser H, Uriu K, Kosugi Y, Shirakawa K, Sadamasu K, Kimura I, Ito J, Wu J, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Yamayoshi S, Loeber S, Tsuda M, Wang L, Ozono S, Butlertanaka EP, Tanaka YL, Shimizu R, Shimizu K, Yoshimatsu K, Kawabata R, Sakaguchi T, Tokunaga K, Yoshida I, Asakura H, Nagashima M, Kazuma Y, Nomura R, Horisawa Y, Yoshimura K, Takaori-Kondo A, Imai M; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Tanaka S, Nakagawa S, Ikeda T, **Fukuhara T** (Corresponding author), Kawaoka Y, Sato K. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. **Nature**. 602(7896): 300-306, 2022

4) Suzuki R, Yamasoba D, Kimura I, Wang L, Kishimoto M, Ito J, Morioka Y, Nao N, Nasser H, Uriu K, Kosugi Y, Tsuda M, Orba Y, Sasaki M, Shimizu R, Kawabata R, Yoshimatsu K, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Sawa H, Ikeda T, Irie T, Matsuno K, Tanaka S, **Fukuhara T** (Corresponding author), Sato K. Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. **Nature**. 603(7902): 700-705, 2022

5) Yamasoba D, Kimura I, Nasser H, Morioka Y, Nao N, Ito J, Uriu K, Tsuda M, Zahradnik J, Shirakawa K, Suzuki R, Kishimoto M, Kosugi Y, Kobiyama K, Hara T, Toyoda M, Tanaka YL, Butlertanaka EP, Shimizu R, Ito H, Wang L, Oda Y, Orba Y, Sasaki M, Nagata K, Yoshimatsu K, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Kuramochi J, Seki M, Fujiki R, Kaneda A, Shimada T, Nakada T, Sakao S, Suzuki T, Ueno T, Takaori-Kondo A, Ishii KJ, Schreiber G, The Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Sawa H, Saito A, Irie T, Tanaka S, Matsuno K, **Fukuhara T** (Corresponding author), Ikeda T, Sato K. Virological Characteristics of SARS-CoV-2 BA.2 variant. **Cell**. In press