

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15228

研究課題名(和文) ノロウイルスVLPワクチンに関する基礎研究と異種抗原キャリアとしての応用

研究課題名(英文) Studies on norovirus vaccines and the use of norovirus-like particles as antigen carriers

研究代表者

染谷 雄一 (SOMEYA, YUICHI)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：50283809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ノロウイルスのワクチン開発に有用な情報を得るために、いくつかの遺伝子型に属する株に由来するウイルス様中空粒子(VLP)を調製し、ラットを免疫した。得られた血清は免疫に用いたVLPに対して反応したが、それ以外のVLPにはほとんど反応しなかった。多様な遺伝子型が存在するノロウイルスを効率よくワクチンで制御することが今後の課題である。また、ノロウイルスVLPを異種抗原キャリアとして利用できるか、単鎖ペプチドの挿入を試みたが、組換えVLPの発現がほとんど見られず、目的を遂げることができなかった。タンパク質内の相互作用がVLP形成に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To get useful information for development of norovirus vaccine, virus-like particles (VLPs) derived from several strains of norovirus were prepared and used to immunize rats. Rats sera reacted with VLPs used as antigens, but did not react with VLPs from other strains. It will be important to develop effective vaccines which can control wide variety of norovirus strains.

I tested whether norovirus VLPs could be used as exogenous antigen carriers. Although recombinant baculoviruses including the gene encoding a VP1 protein with a short peptide antigen inserted, no or extremely low expression of recombinant VLPs were found. It is suggested that the interaction between domains in the VP1 protein is important for the formation of a VLP.

研究分野：ウイルス生化学

キーワード：ノロウイルス ウイルス様中空粒子 VLP ワクチン

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスによる急性胃腸炎(嘔吐下痢症)は毎冬大流行を見せ、世界的な問題となっているが、治療薬、予防薬(ワクチン)はない。厚生労働省厚生科学審議会平成25年度予防接種・ワクチン分科会研究開発及び生産流通部会において、開発優先度の高いワクチンのひとつとされた。当時、武田薬品工業やUMNファーマが開発していたノロウイルス様中空粒子(VLP)を抗原とするワクチンは、数多いノロウイルス遺伝子型の極一部(遺伝子群 Genogroup I の9つの遺伝子型 Genotypeのうち1つと、Genogroup II の22の遺伝子型のうち1つ)を抗原としているに過ぎず、多種の遺伝子型(これがそのまま血清型に対応するといわれている)によるノロウイルス胃腸炎の大流行に対応できるか疑問であった。そこで、限られた遺伝子型のVLPを接種して得られた血清中に含まれる抗ノロウイルス抗体がどのような性質(特異性、交叉反応性)を持つかを明らかにし、また、どの遺伝子型のVLPをワクチンに含めればより広範囲の遺伝子型のノロウイルス感染を予防できるかを明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

ノロウイルスワクチンは開発優先度の高いワクチンのひとつとして認識されており、現にいくつかのワクチンメーカーによりノロウイルス様中空粒子(VLP)を抗原とするワクチンの開発が進められている。本研究では、種々の遺伝子型のノロウイルスVLPを作成して小動物を免疫し、得られた抗体の性質(特に、抗原の遺伝子型とは異なる遺伝子型のVLPを認識するかといった交叉反応性の問題)を明らかにする。これによりワクチンにどの遺伝子型のVLPを混合すればより効率的にノロウイルスによる急性胃腸炎(嘔吐下痢症)を予防できるか、基礎的な情報を提供できると考えている。また、ノロウイルスVLPの抗原性保持領域を全く異種の抗原に置き換え、あるいは、それら異種抗原を挿入して、ノロウイルスVLPが抗原キャリアとして機能しうるか、その可能性を示したい。

3. 研究の方法

(1)VLPの調製:ノロウイルス粒子を構成するVP1タンパク質をコードするORF2遺伝子をバキュロウイルストランスファクター(pORB)にサブクロニングし、バキュロウイルスDNA(flashBAC DNA)と共にSf9昆虫細胞に導入し、ノロウイルスORF2遺伝子を含む組換えバキュロウイルスを調製する。次いで、組換えバキュロウイルスをT.ni昆虫細胞に感染させ、1~2週間後培地中に放出されるVLPを超遠心で沈殿させ、適当な緩衝液あるいは蒸留水で懸濁後、塩化セシウム密度勾配遠心、ショ糖密度勾配遠心等を行い、精

製する。得られたVLPは、電子顕微鏡で観察し、VLPの形態に異常がないこと、夾雑物がないことを確認する。また、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により、タンパク質のバンドを確認する。

(2)小動物の免疫:得られた精製VLPでラット(Slc:Wistar、8週齢、メス)を免疫した。免疫は1回とし、VLP試料(0.2mg)を後肢筋肉内に接種した。3週間後に麻酔下心臓より採血し、血清を調製した。

(3)ELISA:抗原として用いたVLP(250ng/well)を96ウェルマイクロプレートに固定し、ラット血清を様々な濃度で作用させた。次いで、HRP標識抗体(抗ラットIgGヤギ抗体)を作用させ、ABTSで発色させ、吸光度(測定波長405nm、参照波長630nm)を測定した。得られた抗体の反応性を確認すると共に、抗体の力価を測定した。

(4)単鎖ペプチド挿入VLP遺伝子の調製:HAタグ、c-Mycタグ、Strepタグ、B型肝炎ウイルスS抗原ペプチドに対応する合成遺伝子をVancouver株VP1タンパク質のP2ドメインに相当する領域に挿入した。方法(1)に示される方法と同様に、組換えバキュロウイルスを作成し、VLP発現を試みた。

(5)キメラVLP遺伝子の調製:VP1タンパク質はS(shell)ドメインとP(protuding)ドメインに分けることができる。Pドメインは更にP1ドメインとP2ドメインに分けられる。P2ドメインはアミノ酸配列の変化が最も大きい領域で、抗原性に影響していると考えられている。GI.4(GI.4はGenogroup I, Genotype 4を意味する。他も同様)Chiba株のPドメイン領域をGI.9のVancouver株のSドメインに融合させた遺伝子、また、GI.4 Chiba株のP2ドメイン領域をGI.9のVancouver株と入れ替えた遺伝子を作成した。更に、GIIに属するGII.1のHawaii株、GII.4のNarita株のPドメイン、あるいは、P2ドメインをGI.4 Chiba株の対応する領域と入れ替えた遺伝子も作成した。方法(1)に示される方法と同様に、組換えバキュロウイルスを作成し、VLP発現を試みた。

4. 研究成果

(1)VLPの生産:ノロウイルス遺伝子群(Genogroup)Iに属する9つの遺伝子型(Genotype)について、VP1タンパク質(キャプシドタンパク質)をコードするORF2遺伝子を研究室のストックから、あるいは、人工合成遺伝子から調製し、バキュロウイルストランスファクターにクロニングした。用いたノロウイルス株を以下に示す。

- GI.1 Seto 株
- GI.2 Funabashi 株
- GI.3 Kashiwa 株
- GI.4 Chiba 株
- GI.5 SzUG1 株
- GI.6 WUG1 株
- GI.7 Winchester 株
- GI.8 KY531 株
- GI.9 Vancouver 株

次いで、Sf9 昆虫細胞を用いて、それぞれの遺伝子型の VP1 タンパク質を発現する組換えバキュロウイルスを作成した。作成した組換えバキュロウイルスを Sf9 昆虫細胞で増幅した後、T. ni 昆虫細胞に感染させ、1 週間後回収した培地から VLP を塩化セシウム等密度勾配遠心で分離、精製した。上記 9 つの遺伝子型のうち、GI.2 のフナバシ株、GI.3 のカシワ株、GI.4 のチバ株、GI.6 の WUG1 株、GI.8 の KY531 株、GI.9 の Vancouver 株で VLP を得ることができた。GI.1 のセト株、GI.5 の SzUG1 株、GI.7 の Winchester 株は良質な VLP を得ることができなかった。VLP が得られた株のなかで、GI.3 のカシワ株と GI.6 の WUG1 株、GI.8 の KY531 株の VLP は生産量が少なく、また、安定して得ることができなかったため、以後は主に、GI.4 のチバ株と GI.9 の Vancouver 株の VLP を用いることにした。

(2) ラットの免疫と抗血清の性質：GI.4 のチバ株、GI.6 の WUG1 株、GI.9 の Vancouver 株それぞれの VLP でラットを免疫した。得られた抗血清は抗原として用いた VLP に反応性を示し、他の遺伝子型の VLP には反応しなかった。GI.4 のチバ株と GI.9 の Vancouver 株の VLP を混合してラットを免疫したところ、得られた抗血清は抗原の 2 株に対しては反応性を示すものの、単一抗原での免疫の場合と同様、他の遺伝子型の VLP には反応しなかった。この作業を実施している間に、ワクチンメーカーが関与する論文(a)により単独の遺伝子型の VLP をヒトに接種することで他の遺伝子型に対する抗体がある程度産生されることが明らかになった。このような交叉反応性を実験動物を用いて検証することを本研究の課題のひとつとして掲げていたが、ヒトに関して交叉反応性の可能性が示されたため、本研究課題でこの実験を継続することを断念した。

(3) ノロウイルス VLP の異種抗原キャリアとしての応用：VLP 発現が良好な GI.9 の Vancouver 株の VP1 タンパク質に、HA タグ、c-Myc タグ、Strep タグ、B 型肝炎ウイルス S 抗原ペプチドを挿入することを試みることにした。VP1 タンパク質の立体構造モデルを作成し、挿入部位を決定した。上記のいずれかの挿入配列を有する組換え VP1 タンパク質を発現するバキュロウイルスを作成し、定法通り、T. ni 昆虫細胞に感染させて異種抗原

挿入型 VLP 発現を試みた。しかしながら、目的とする VLP を得ることはできなかった。

(4) キメラ VLP の生産：GI.4 チバ株の抗原性領域(P ドメイン)あるいは、P2 ドメインを GI.9 Vancouver 株の対応する領域と入れ替えたキメラ VLP の作成を試みたところ、2 種のキメラ VLP の発現は認められるものの、著しく産生量が減少した。さらに、異なる遺伝子群(Genogroup II)に属する GII.1 の Hawaii 株、GII.4 の Narita 株の抗原性領域で GI.4 チバ株の VP1 タンパク質を置換した場合には、VLP 生産がほとんど認められなかった。一方で、GI.9 Vancouver 株の S ドメイン(殻ドメイン)のみで粒子を形成することが認められた。本実験により、VLP 形成には S ドメイン同士の相互作用が重要であること、また、それぞれの遺伝子型に特有の S ドメインと P ドメインの相互作用が粒子形成に影響している可能性が示唆された。

<引用文献>

- (a) Lindesmith LC, Mallory ML, Jones TA, Richardson C, Goodwin RR, Baehner F, Mendelman PM, Bargatze RF, Baric RS. Impact of pre-exposure history and host genetics on antibody avidity following norovirus vaccination. *J. Infect. Dis* (2017) 215:984-991.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kazuya Hasegawa, Yuichi Someya, Hideki Shigematsu, Tomomi Kimura-Someya, Takashi Kumasaka. Crystallization and preliminary X-ray analysis of 23-nm virus-like particles from norovirus Chiba strain. *Acta Crystallography*, **F73**, 568-573, 2017.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

染谷 雄一 (SOMEYA, Yuichi)
国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任
研究官
研究者番号：50283809