

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18792

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスを用いた新規ワクチンプラットフォームの開発

研究課題名(英文) Development of a novel vaccine platform based on Adeno associated virus.

研究代表者

大東 卓史(Daito, Takuji)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・助教

研究者番号：50769726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 発展途上国では、ワクチンを普及するうえで、経済的な問題や輸送方法、接種時の医療廃棄物等多くの問題を抱えている。そこで、本研究ではこれらの問題を解決する目的で、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を利用した新規ワクチンプラットフォームの開発を試みた。本研究によって、AAVに狂犬病ウイルスの主要な免疫抗原であるGタンパク質とウイルス様粒子の産生に必要なMタンパク質を共発現するAAVを作製することに成功した。作製したAAVワクチンをマウスに経鼻接種したところ、顕著な副反応は示さなかったが、共発現による効果を確認するまでには至らなかった。

研究成果の概要(英文)： In developing countries, there are many problems for spreading vaccines such as economic problem, infrastructures and medical wastes. To solve these problems, I tried to development of a novel vaccine platform based on Adeno associated virus vector (AAV). In this study, I produced the AAV vaccine which expressed the Rabies virus glycoprotein, which is major antigen for immunization, and matrix protein, which is key protein for viral like particle. The AAV based rabies vaccine did not induce the adverse effect to mouse however the effect of co-expression could not be confirmed.

研究分野：ウイルス

キーワード：AAV ワクチン

1. 研究開始当初の背景

先進国ではワクチン接種による予防医学の浸透によって、死亡原因における感染症の割合は減少してきた。しかし、発展途上国では今も感染症の流行は後を絶たず、近年のエボラ出血熱や中東呼吸器症候群の世界的流行は、感染症の制御が発展途上国のみのものであることではなく人類共通の課題であることを強く物語っている。

近年、遺伝子組換え技術の発展によって、多くの研究機関で遺伝子組換えワクチンの研究開発が行われている。近年のエボラ出血熱の流行に対しては、水痘性口内炎ウイルスを用いた組換えワクチンが開発され、すでに臨床試験も行われている (文献1)。

アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) は安全性の高いウイルスベクターとして幅広く利用されており、臨床応用も進められている。AAV を用いたワクチンは多くの病原体に対して作製が試みられてきたが、生産コストと免疫原性の低さから未だ実用化には至っていない。AAV は室温でも半年以上安定であるという報告や、注射器を使用せずに経鼻接種が可能というメリットがあり、これらのメリットは発展途上国などのインフラが未整備の地域では非常有用であり、総合的なコストを下げるのが期待される。

引用文献

1) Hanano-Restrepo AM et al., Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. Lancet, 2015, Aug 29; 386(9996): 857-66

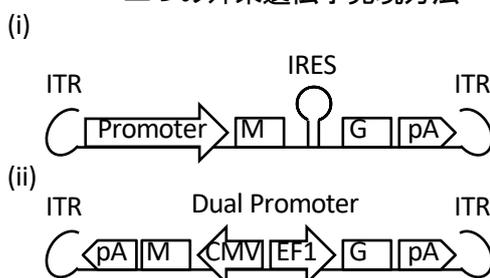
2. 研究の目的

そこで、本研究では、AAV の免疫原性を向上させることを目的に、AAV に複数のウイルス遺伝子を挿入し、AAV 導入細胞にウイルス様粒子を産生させる戦略を試みた。今回は発展途上国で問題となっている狂犬病ウイルスを用いて G タンパク質と M タンパク質を共発現する AAV を作製し、ワクチンとしての有用性について検討した。

3. 研究の方法

(1) AAV 産生ベクターに 2 通りの方法で狂犬病ウイルスの M タンパク質と G タンパク質を挿入し、AAV ベクターの産生を試みた (図 1)。

図1 二つの外来遺伝子発現方法



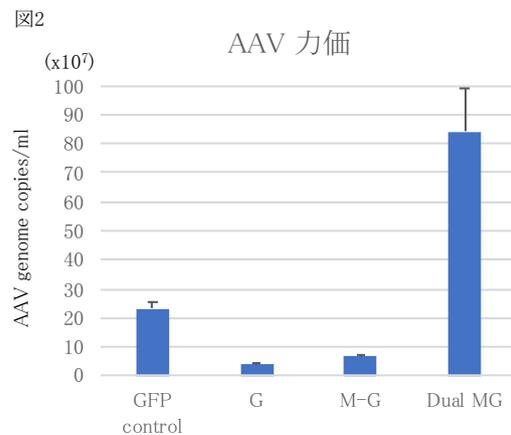
一つ目の方法は、プロモーター下流に二つの遺伝子を IRES (Internal ribosome entry site) で繋ぐ方法。もう一方は、二つのプロモーターを用いて二つの遺伝子を別々に産生する方法を用いた。作製したプラスミドを 293AA 細胞に遺伝子導入し、AAV ベクターの産生を行った。

(2) 産生した AAV ベクターをマウスに接種し、ワクチンとしての有効性を評価した。

4. 研究成果

(1) AAV ベクターの産生効率

作製した AAV プラスミドをヘルパープラスミドと血清型 2 のカプシド遺伝子と共に 293AA 細胞に遺伝子導入し、各 AAV ワクチンの作製を試みた。回収、精製した AAV のウイ



ルス力価を qPCR 法にて定量した結果、コントロールの GFP 発現 AAV (GFP control) に対して、やや産生効率は低いものの、G 遺伝子単独発現 AAV (G) および、M、G 遺伝子共発現 AAV (M-G) の産生が確認された。また、Dual promoter タイプの AAV は他の 3 種の AAV に比べかなり高い産生効率を有することが確認された (図 2)。

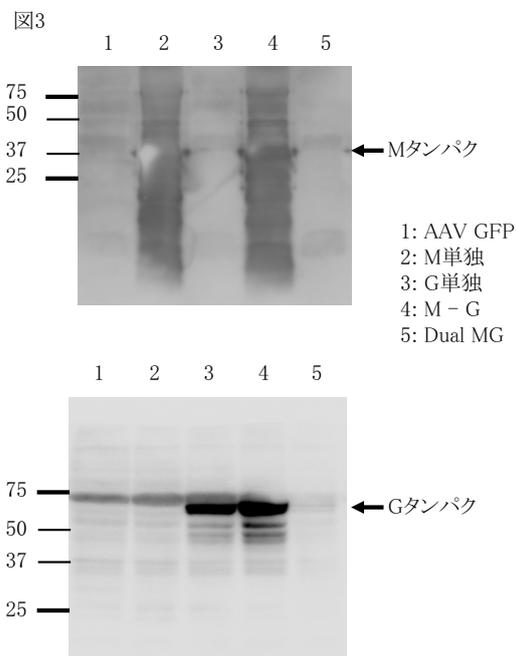
(2) AAV ベクターの遺伝子発現

作製した AAV ベクターを導入した細胞で実際に導入した遺伝子が発現しているかを、Western Blotting 法にて確認した。

AAV を導入した細胞において、M 遺伝子単独発現 AAV (レーン 2) および M、G 遺伝子共発現 AAV (レーン 4) では M タンパク質の発現が確認された。また、G 遺伝子単独発現 AAV (レーン 3) および M、G 遺伝子共発現 AAV (レーン 4) では G タンパク質の発現が確認された。一方、Dual promoter タイプの AAV (レーン 5) では M タンパク質、G タンパク質どちらもタンパク質の発現も確認されなかった (図 3)。

Dual promoter タイプの AAV は AAV 産生自体に問題はなく、産生効率はむしろ高かったが、何らかの理由により導入した遺伝子の発現が進まない問題が認められた。挿入した遺伝子の塩基配列やその前後のプロモーター領域の塩基配列も確認したが、問題は

確認できなかった。このため、次のマウスに接種してワクチンの効果を検証する実験は G 遺伝子単独発現 AAV と M、G 遺伝子共発現 AAV を用いて行うこととした。



(3) マウスにおける免疫応答

①作製した AAV ワクチンの免疫原性を調べる目的で、マウスに経鼻接種し、産生される抗体価を測定した。

用いたマウスは 6 週齢の BALB/c マウスで経鼻からそれぞれ、陰性対照群の PBS、AAV-GFP、G 遺伝子単独発現 AAV、M-G 遺伝子共発現 AAV を 1×10^6 copy 接種し、経過観察後、血清サンプルを回収した。

各 AAV ワクチン接種後 10 日間の体重変動について、各グループ間で違いは認められなかった。また、その間に健康面での顕著な変化も観察されなかった。4 ヶ月間飼育したマウスにおいても、全てのグループで健康面での問題は観察されなかった。このことから、作製した AAV ワクチンに顕著な副反応は認められなかったと考えられる。

②AAV ワクチン接種後 2 週および 16 週間後の血清サンプルを回収し、血中の中和抗体価を測定した。

BHK-21 細胞を用いてウイルス力価を測定した狂犬病ウイルス RC-HL 株に対する中和抗体価を測定したところ、2 週後、16 週後どちらの血清サンプルも中和活性を示さなかった。

この結果から今回作製した AAV ワクチンは現時点では中和抗体をマウスに誘導するまでの力価には至らなかったと考えられる。

(4) 考察とまとめ

本研究によって M-G 遺伝子共発現 AAV が M タンパク質、G タンパク質両方のタンパク質を問題なく発現することが確認された。一方

で Dual promoter タイプの AAV はどちらの遺伝子も発現することができなかった。また、マウスへの経鼻接種による免疫誘導は残念ながら確認されなかった。今後の改善点としては下記の 2 点が挙げられる。

① AAV ウイルス力価の向上

② 使用する血清型の変更

①については、本研究期間中も取り組んだが、上手くいかなかった。今回は主に市販の抽出、精製試薬によって AAV ワクチンの産生を行なったが、今後は超遠心などの方法による精製を取り入れることで、力価の向上が期待される。また、②の使用する血清型は現在血清型 AAV2 を使用していたが、より経鼻接種に適した血清型に変更することも免疫誘導に効果があると予想される。

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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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
北海道大学
人獣共通感染症リサーチセンター
生物製剤研究開発室

<http://www.czc.hokudai.ac.jp/biologics/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大東 卓史 (DAITO TAKUJI)

北海道大学

人獣共通感染症リサーチセンター 助教

研究者番号：50769726

(2)研究分担者

()
なし

(3)連携研究者

()
なし

(4)研究協力者

()
なし