

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19560

研究課題名(和文)新コンセプト「ワクチン+アジュバント」ハイブリッドウイルスベクターの開発

研究課題名(英文)Development of new concept viral vectors exerting both vaccine and adjuvant activities

研究代表者

入江 崇(Irie, Takashi)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：70419498

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、申請者らが世界で始めて単離に成功した強力な自然免疫誘導物質(コピーバック型欠損干渉ウイルスゲノム)を恒常的に発現するセンダイウイルスクローン(SeV-cCdi)のワクチン賦活化剤(アジュバント)としての利用を試みた。上記ウイルスを市販インフルエンザワクチンに添加し、経鼻投与によりマウスを免疫したところ、顕著に粘膜免疫が誘導され、致死量のインフルエンザウイルスの攻撃感染に対して著しい防御効果の上昇がみられた。この結果から、センダイウイルスはヒトを含む殆どの動物に病原性がない安全なウイルスであり、細胞宿主域も広いことから、上記以外にも様々なワクチンに応用展開が可能であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワクチンは感染症対策の要であるが、未だ有効なワクチンが存在しない感染症も数多く残されており、効果が十分でなく改善が求められているものも多い。また、現在パンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス感染症など、新規感染症の突然の発生に対する迅速なワクチン開発も求められている。本研究成果では、ヒトに病原性を持たないウイルスをワクチン抗原に加えるという簡単な方法でワクチン効果を著しく高めることができ、様々なワクチンに適用可能である。また、抗原を組み込んだワクチンベクターとしての展開も可能であり、高性能ワクチンの迅速な開発に資するものである。

研究成果の概要(英文): In this study, we evaluated the possible application of a Sendai virus clone (SeV-cCdi) as a efficient vaccine adjuvant. This clone is unique in constitutively producing copyback-type defective-interfering viral genomes which strongly induce type-I interferon-mediated host innate immune responses. Indeed, mice received intranasally with a commercial flu vaccine in combination with the virus were protected much more remarkably against a challenge infection of a lethal dose of influenza A virus, compared to those received with a vaccine alone. The protective IgA titer against the flu HA was induced remarkably in the mice received with the vaccine + virus, but not in those with the vaccine alone. Since Sendai virus is a safe virus, non-pathogenic to human and most animals except for rodents, and possesses a wide cell tropism, SeV-cCdi would be applicable to the other different vaccines.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ワクチン アジュバント センダイウイルス ウイルスベクター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症は世界の死亡原因の 1/3 を占め、公衆衛生上の世界規模での最重要課題の一つである。その予防・治療において、ワクチンの役割は非常に重要であり、様々な感染症で著しい成果をもたらしてきた。しかし、有効なワクチンが存在しない感染症も未だ多く残されており、現在使用されているものでも改善が期待されていたり、効果が十分で無いものも多い。例えば 2009 年の H1N1 型新型インフルエンザの様な季節性インフルエンザ程度の病原性ウイルスのパンデミックには対応できたが、高病原性ウイルスのパンデミックがおきた場合には効果が疑問視されている。また、既知の感染症以外にも、近年様々な新興、再興感染症の発生も起こっており、これらの驚異に迅速に対応可能なワクチン基盤技術の開発が求められている。

ワクチン単体では十分な効果が得られない場合でも、賦活化剤(アジュバント)の併用により、その効果を著しく増強することが可能である。これまでアジュバントとして様々な無機物、脂溶性物質などの他に、自然免疫を活性化させる合成核酸、リポ多糖など、様々なものが使用、検討されてきた。しかし、現在数種類が実用化されているものの、汎用性の低さ、副反応の懸念などから、未だ十分なものは開発されていない。

研究開発当初、宿主の自然免疫を活性化させる物質が高いアジュバント効果を発揮することが明らかとなってきた。申請者らは、麻疹ウイルス、インフルエンザウイルス、エボラウイルスなど、ヒトや動物の重要な感染症の原因となるウイルスを数多く含むマイナス鎖 RNA ウイルスのプロトタイプの一つであるセンダイウイルスの研究から、ウイルス複製時に、コピーバック型欠損干渉 (cbDI) ゲノムを恒常的に産生するウイルスクローン (SeV-cCdi) の単離に世界で初めて成功した (図 1; Yoshida Front Microbiol 2015)。DI ゲノムは、ウイルス複製時にエラー産物として産生される短いゲノム様 RNA 分子で、その発生メカニズムは明らかにされていないものの、1970 年代から、ウイルスの増殖に干渉し、持続感染の成立に関与すること、I 型 IFN を誘導する性質があること、などが知られていた。研究当初、さらにこの DI ゲノムが、マイナス鎖 RNA ウイルス感染において宿主の I 型 IFN 経路のセンサー分子である RIG-I を強力に活性化し、自然免疫を惹起するウイルス因子であることが明らかにされてきた。

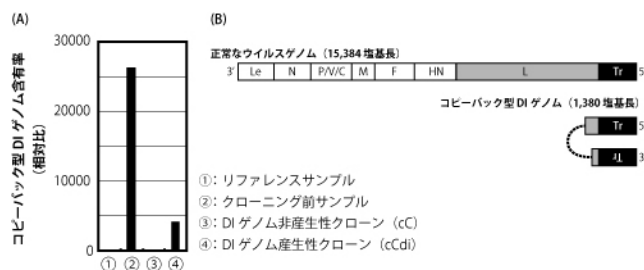


図 1. cbDI RNA 産生性 SeV クローン (cCdi) の単離 (A) と産生される cbDI RNA の構造 (B)

自然免疫を惹起する物質にアジュバント効果があること、DI ゲノムが強力に I 型 IFN 系を惹起するウイルス因子であることから、DI ゲノムを模した合成 RNA がアジュバント効果を発揮することが報告されていた (Martinez-Gil, J Virol 2013)。

2. 研究の目的

マイナス鎖 RNA ウイルスの DI ゲノムは、ウイルス様粒子構造中に取り込まれ、ゲノム以外が正常なウイルス粒子に似た DI 粒子となる。DI 粒子は、正常なウイルス粒子と同様に標的細胞に結合し、内包した DI ゲノム RNA が細胞質内に放出されるが、申請者らは予備的検討からこの DI 粒子が高いアジュバント効果を発揮することを確認した。センダイウイルスは、広い細胞及び組織宿主域、ヒト及びその他多くの動物に対する高い安全性、強力な増殖能力による高い生産性、DNA クローンの作成による均一なウイルス材料の供給が可能であることなどから、安全なウイルスベクターとして様々な応用されてきている。

申請者らは、我々が独自に世界で初めて単離に成功した cbDI ゲノム産生性ウイルスクローン (SeV-cCdi) の能動的な感染能力、アジュバント効果を発揮する cbDI ゲノムの産生能力、合成 RNA ではなくウイルス粒子構造を取ることに伴う安定性、生産性の高さなどから、このクローンを従来型アジュバントの抱える様々な問題点を大幅に克服したアジュバント材料及びその供給源として、またアジュバント供給能力と抗原供給能力を併せ持った高性能ワクチンウイルスベクターとしての応用を着想した (図 2)。



図 2. 従来型ワクチンアジュバントと DI ゲノム産生性センダイウイルスアジュバントの機能

本研究では、インフルエンザウイルスのマウス感染モデル系を用いて、上記の実証研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、主に上記ウイルス材料そのものをアジュバントとして使用する方法について検討した。DI 粒子は、DI 粒子の含まれたウイルスサンプルを培養細胞などで継代すると、サンプル中に蓄積していき、正常なウイルスの増殖に対して干渉作用があるため、その蓄積はプラトーに達する。IFN 誘導性の均一なウイルスサンプルを調製することを目的として、SeV-cCdi の鶏卵での継代とウイルス粒子サンプル中での DI 粒子含有量の変化を、ウイルス粒子中の DI ゲノム量と正常ウイルスゲノム量の比を qRT-PCR 法により検討した。また、各段階のサンプルの IFN 誘導性について、培養細胞系でのアッセイにより、DI 粒子含有量との相関関係について検討した。

ワクチン接種実験では、2017 年シーズンの市販ワクチンを抗原として使用し、これをマウスに 2 週間間隔で 2 回接種した。2 回目の接種からさらに 2 週間後に、H1N1 亜型の A 型インフルエンザウイルスを 15MLD50 量攻撃接種し、接種後のマウスの体重変化、生死について検討した。また、攻撃接種の段階で、鼻腔拭い液、肺洗浄液、血清サンプルを調製し、精製 HA 蛋白質を抗原として ELISA 法により抗体価を測定した。

また、より安定した性質のウイルス供給と、抗原を組み込んだワクチンウイルスベクター作成の目的で、SeV-cCdi の完全長ゲノム cDNA からの組換えウイルス作製系の構築を試みた。

4. 研究成果

本研究では、SeV-cCdi クローンを 1 回培養細胞 (LLC-MK2 細胞) で継代したもの (P1) をウイルスの出発材料とした。これを鶏卵でさらに 5 回継代し、各継代段階での漿尿液サンプルのウイルス感染価を測定するとともに、cbDI ゲノム RNA 量、完全長ウイルスゲノム RNA 量を qRT-PCR 法により測定し、cbDI ゲノム RNA/完全長ウイルスゲノム RNA 比 (DI ゲノム含有率) を求めた。この結果、継代を重ねる毎に cbDI ゲノム含有率は顕著に上昇したが、およそ継代 5 回目 (P6) でほぼプラトーに達した。また、DI ゲノム含有率の上昇にともなって、各サンプルの感染価は減少したが、その低下は最大でも 1/10 程度であり、 9.8×10^8 CIU/ml 程度のウイルス量がみられた。また、P6 サンプルでは、完全長ウイルスゲノム RNA に対する cbDI ゲノム RNA 量はおよそ 1/10,000 程度であった。今後の動物接種実験などで、あるていど感染価の高いウイルスサンプルの方が接種量を検討する幅が広がると考え、以降の実験では P3 サンプルを用いることにした。

上記ウイルスサンプルのアジュバントとしての効果を検証するために、上述の様にマウスを市販ワクチンに P3 サンプルを加えて経鼻接種により免疫した場合に、完全致死量の攻撃接種に対して防御免疫を獲得するのか検討した (図 3)。その結果、PBS(-)投与群 (ワクチンなし) では、全ての攻撃接種マウスが死滅したのに対し、ワクチンのみの接種の場合でも 1/3 程度しか生残しなかった。ワクチンに、アジュバント効果が報告されている poly(I:C) を添加して接種した場合、生残率は 55%程度に上昇したが、SeV-cCdi を加えて接種した場合には生残率はさらに 78%まで上昇した。また、攻撃接種前の肺洗浄液について HA 蛋白質に対する抗体価を検討したところ、SeV-cCdi を

加えて免疫した

サンプルで、顕

著な抗体価の上

昇がみられた。

これらの結果から、SeV-cCdi は高いアジュバント活性を有しており、ワクチン単体の場合に

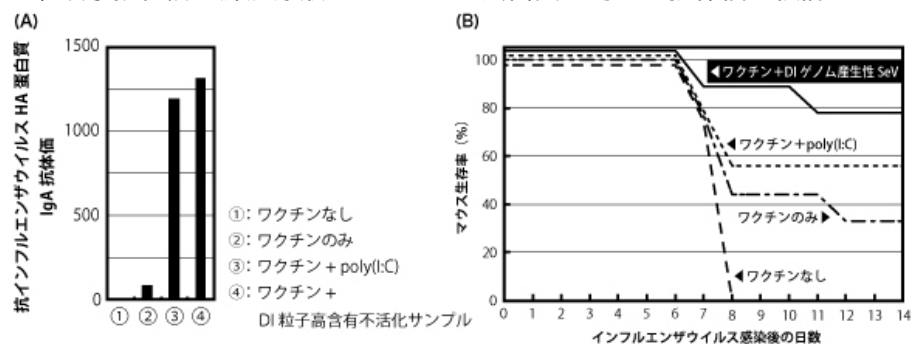


図 3. SeV-cCdi の高いアジュバント効果 (A. 2 回免疫後の肺洗浄液 IgA 抗体価 ;

B. 2 回免疫後の攻撃接種実験のマウス生存率)

はほとんど誘導されなかった粘膜免疫を強く誘導できることが示された。

現在、さらに他の接種方法や、他のワクチンとの組み合わせについても同様のアジュバント効果が得られるか検討を進めているところである。また、これまでに、SeV-cCdi のゲノム cDNA の作製と、このゲノム cDNA からのウイルスレスキュー系の構築に成功している。今後このウイルスを利用して、これに HA 蛋白質などの抗原蛋白質を発現する組換えウイルスを作製し、ワクチンベクターとしての効果の検討を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 OHMINE TAKAHITO, NARAI SEIKA, MATSUBARA TOSHIKI, NOMURA TOSHIHITO, ODA KOSUKE, FUKUSHI MASAYA, IRIE TAKASHI, KOMATSU TAKAYUKI, TOHYA YUKINOBU, SAKAGUCHI TAKEMASA	4. 巻 23
2. 論文標題 Eligibility of Feline Calicivirus for a Surrogate of Human Norovirus in Comparison with Murine Norovirus, Poliovirus and Coxsackievirus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biocontrol Science	6. 最初と最後の頁 145 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4265/bio.23.145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama Miyu, Igarashi Manabu, Koshiba Takumi, Irie Takashi, Takada Ayato, Ichinohe Takeshi	4. 巻 92
2. 論文標題 Two Conserved Amino Acids within the NSs of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus Are Essential for Anti-interferon Activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00706-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00706-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Asuka, Kawabata Ryoko, Honda Tomoyuki, Sakai Kouji, Ami Yasushi, Sakaguchi Takemasa, Irie Takashi	4. 巻 92
2. 論文標題 A Single Amino Acid Substitution within the Paramyxovirus Sendai Virus Nucleoprotein Is a Critical Determinant for Production of Interferon-Beta-Inducing Copyback-Type Defective Interfering Genomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02094-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02094-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 坂口 剛正、入江 崇、小田 康祐	4. 巻 50
2. 論文標題 センダイウイルスがインターフェロンに対抗する仕組み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本ウイルス学会北海道支部会報	6. 最初と最後の頁 7 ~ 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 入江 崇、酒井 宏治、坂口 剛正	4. 巻 34
2. 論文標題 ウイルスベクターワクチンの現状と展望	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 107 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takashi Irie, Kouji Sakai, Takemasa Sakaguchi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Development of New Concept Viral Vectors Exerting Both Vaccine and Adjuvant Activities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IMPACT	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Asuka, Kawabata Ryoko, Honda Tomoyuki, Sakai Kouji, Ami Yasushi, Sakaguchi Takemasa, Irie Takashi	4. 巻 92
2. 論文標題 A Single Amino Acid Substitution within the Paramyxovirus Sendai Virus Nucleoprotein Is a Critical Determinant for Production of Interferon-Beta-Inducing Copyback-Type Defective Interfering Genomes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02094-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02094-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oda Kosuke, Oda Takashi, Matoba Yasuyuki, Sato Mamoru, Irie Takashi, Sakaguchi Takemasa	4. 巻 292
2. 論文標題 Structural analysis of the STAT1:STAT2 heterodimer revealed the mechanism of Sendai virus C protein-mediated blockade of type 1 interferon signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19752 ~ 19766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.786285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 酒井 宏治、吉田 明日香、川端 涼子、坂口 剛正、入江 崇
2. 発表標題 特異なセンダイウイルスクローンの単離とワクチンアジュバントとしての利用
3. 学会等名 第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江 崇
2. 発表標題 センダイウイルス～基礎ウイルス学から応用へ～
3. 学会等名 名古屋大学 第96回 創薬科学セミナー・GTRセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Yoshida、Kouji Sakai、Ryoko Kawabata、Takemasa Sakaguchi、Takashi Irie
2. 発表標題 Characterization of a Sendai virus isolate producing copyback-type defective viral RNA and its potential as an effective vaccine adjuvant
3. 学会等名 Influenza and Other Infections Symposium ((国際学会))
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川端 涼子、吉田 明日香、中西 真人、坂口 剛正、入江 崇
2. 発表標題 新規組換えウイルス系を用いたパラミクソウイルスアクセサリー蛋白質の機能解析
3. 学会等名 Negative Strand Virus-Japan Symposium 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Irie, Ryoko Kawabata, Asuka Yoshida, Mahito Nakanishi, Takemasa Sakaguchi
2. 発表標題 Detailed functional mapping of the paramyxovirus accessory proteins in viral infection
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江 崇
2. 発表標題 センダイウイルス：アジュバント活性を有するワクチンベクターとしての可能性
3. 学会等名 阪大微生物病研究会 講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Yoshida, Kouji Sakai, Ryoko Kawabata, Takemasa Sakaguchi, Takashi Irie
2. 発表標題 Characterization of a Sendai virus isolate producing copyback-type defective viral RNA and its potential as a vaccine adjuvant
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum in Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江 崇
2. 発表標題 ヒトに病気を起こさないウイルスを研究する～基礎ウイルス学と応用展開～
3. 学会等名 2018年度 富士フィルム和光純薬株式会社 夏季研修会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryoko Kawabata, Asuka Yoshida, Takemasa Sakaguchi, Takashi Irie
2. 発表標題 Detailed functional mapping of the paramyxovirus accessory proteins in viral infection
3. 学会等名 16th International Conference of Negative Strand Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川端 涼子、吉田 明日香、小田 康祐、坂口 剛正、入江 崇
2. 発表標題 新規組換えウイルス系を用いたパラミクソウイルスアクセサリ-蛋白質の機能解析
3. 学会等名 第33回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江崇
2. 発表標題 センダイウイルス-宿主自然免疫相互作用の解析とその応用展開 - アジュバント+ワクチン・ハイブリッドウイルスベクターの可能性 -
3. 学会等名 中国四国乳酸菌研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江崇
2. 発表標題 モノネガウイルス遺伝子間塩基配列の発現制御機能
3. 学会等名 第32回 中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江崇
2. 発表標題 Sendai virus V protein plays an antiapoptotic role during infection
3. 学会等名 The 17th International Congress of Virology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江崇
2. 発表標題 私的センダイウイルス研究の過去と未来
3. 学会等名 第5回 関西ウイルスクラブ (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川端涼子
2. 発表標題 A regulatory role of intergenic trinucleotides in Sendai viral gene expression
3. 学会等名 第65回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江崇
2. 発表標題 A novel anti-apoptotic role of Sendai virus V protein via its interaction with IRF3
3. 学会等名 第65回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江崇
2. 発表標題 センダイウイルス感染における細胞死の制御
3. 学会等名 Negative Strand Virus-Japan Symposium 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江崇
2. 発表標題 Detailed functional mapping of the paramyxovirus accessory proteins in viral infection
3. 学会等名 16th International Conference of Negative Strand Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ウイルス学講座 - 広島大学 https://home.hiroshima-u.ac.jp/isaikin/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂口 剛正 (Sakaguchi Takemasa) (70196070)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	宮沢 孝幸 (Miyazawa Takayuki) (80282705)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授 (14301)	