

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19652

研究課題名(和文) ウイルス表面蛋白改変技術を用いた組換えワクチン作製プラットフォーム技術の開発

研究課題名(英文) Development of Platform Technology for Recombinant VLP Vaccine with Modified Viral Surface Protein

研究代表者

野阪 哲哉 (Nosaka, Tetsuya)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30218309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：非増殖型ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクターBC-PIVを基盤としたウイルス粒子表面蛋白改変型ワクチン開発プラットフォーム技術の確立を目指し、最初にエボラウイルスの表面糖蛋白GPを搭載したBC-PIV/EBOV-GPの作製とその効力の解析を行った。免疫電顕では十分量のGP蛋白がベクター上に搭載されていることが確認された(三重大学 溝口明教授との共同研究)。また、VSV/GP pseudotypeウイルス感染を明確に阻止する中和抗体の誘導能も確認された(北海道大学 高田礼人 教授との共同研究)。この技術は今後、新興感染症に迅速に対処するための力強い味方になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2019年末、COVID-19と呼ばれる新型肺炎が出現し、翌年瞬く間に全世界に広がった。SARS-CoV-2は世界経済を麻痺させ、多くの人命を奪い、一刻も早いワクチンの開発が望まれている。我々は今回のような新興感染症がいつ出現してもおかしくないと考え、約10年前よりバイオコモ(株)と共同で迅速にワクチンを作製するためのプラットフォーム技術を開発してきた。今回、図らずしもその技術を活かす機会が到来し、SARS-CoV-2の遺伝子配列を入手後、文科省の大臣確認が得られてから遺伝子組換え実験を開始し、1ヵ月で4種の新型コロナウイルスワクチン候補を作出した。最良品を選出し、一刻も早くヒトに応用したい。

研究成果の概要(英文)：We have developed a platform technology to generate recombinant vaccines against various infectious diseases by using non-propagative human parainfluenza virus type 2 vector designated as BC-PIV. First we created a vaccine against Ebola virus GP protein, and named as BC-PIV/EBOV-GP. Immunoelectron microscopy revealed that GP protein is abundantly present on the viral surface (collaboration with Prof. Akira Mizoguchi at Mie University). Immunization of mice with the BC-PIV/EBOV-GP resulted in generation of effective neutralizing antibodies against EBOV-GP-pseudotyped vesicular stomatitis virus (collaboration with Prof. Ayato Takada at Hokkaido University). This technology will become a powerful tool to fulfill unmet medical needs, especially against emerging infectious diseases.

研究分野：ウイルス学、分子生物学、免疫学

キーワード：遺伝子組換えワクチン 新興感染症 プラットフォーム技術 PIV2 生ワクチン 非増殖型ウイルスベクター COVID-19 SARS-CoV-2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

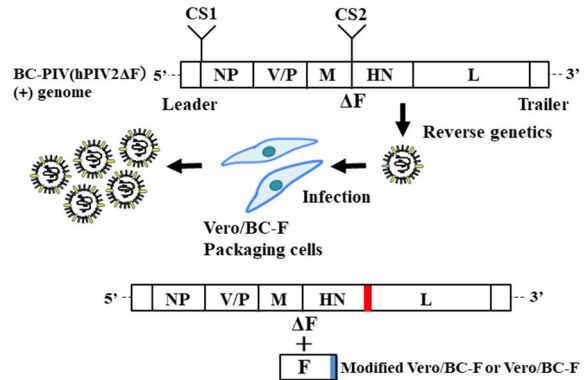
1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、SARS、MERS、高病原性鳥インフルエンザ、エボラ出血熱、ジカ熱など、近年の新興・再興感染症を目の当たりにするにつけ、人命を脅かす病原体がパンデミックになった場合、それに迅速に対処できる技術を確認しておく必要性を感じていた。我々はベンチャー企業であるバイオコモ株式会社(福村正之取締役)と共同で非増殖型ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)ベクターBC-PIVを基盤とし、ウイルス粒子表面蛋白を改変することによって迅速に遺伝子組換えワクチンを作製するプラットフォーム技術の確立を目指してきた。

hPIV2はヒトに繰り返し感染し(即ち、ベクター自体に対する中和抗体ができにくい)、健康成人には病原性がほとんどなく、核に入らないので安全であり、遺伝子発現能はすこぶる高い(レトロウイルスベクターの約100倍)ので、ワクチン開発用ベクターとして最適である。また、エンベロープ型ウイルスであるので、エンベロープのないアデノウイルスなどと違って、エンベロープ膜の表面にウイルス産生細胞由来の外来蛋白を発現させることによって、極めて容易にウイルス表面を改変することができる(所謂シュードタイプウイルスの作製と同じ原理)。

ワクチン開発目的のプラットフォーム技術にするには、安全性の担保が重要であり、特に効果の高い生ワクチンとして使用するためには遺伝学的に増殖性を無くすることが必須となる。我々はhPIV2のF遺伝子を欠損させて非増殖型とし、ベクターの増殖のためのF蛋白持続発現パッケージング細胞も樹立し(右図)、GMPで製造・保管(マスター細胞バンク)している。したがって、マスターウイルスシードストック作製とウイルスのGMP産生を実現すれば、医薬品として世に送り出すことができる。

独自のウイルス産生工場: Vero/BC-F



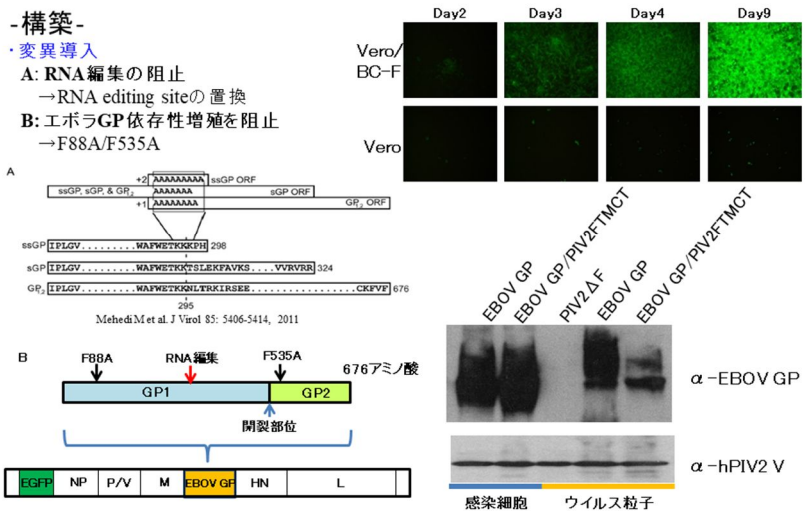
2. 研究の目的

プラットフォーム技術を用いた最初の応用例として、エボラウイルスワクチンを作製し、世界規模で保健医療に貢献する。また、未知の感染症に随時対処できる状況をつくる。

3. 研究の方法

モデルワクチンとしてエボラ出血熱の原因ウイルスであるザイル株のエボラウイルスの表面糖蛋白GPを搭載したBC-PIVを作製する。具体的には、GP遺伝子全長を用い、F88A、F535A二重変異を導入することによってGP蛋白を介した組換えウイルスの細胞内進入を阻止し、遺伝子組換えウイルスワクチンの非増殖性を担保する。1サイクルのみの感染、侵入はF遺伝子欠損型のhPIV2ベクターBC-

エボラウイルスワクチン抗原

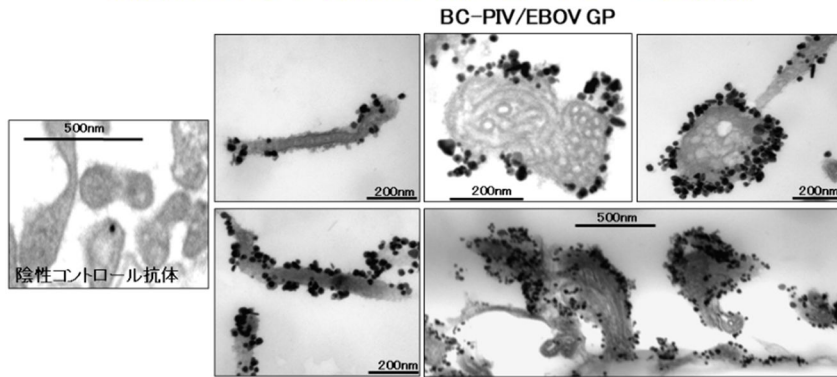


PIVが有するHN蛋白、F蛋白(後者はトランスに供給)により可能となる。その非増殖性を確認し、免疫電顕にてGPがウイルス表面に提示されていることも確認する。また、マウスへ投与後、中和抗体が誘導されるかを、エボラウイルスGP-pseudotyped Vesicular Stomatitis Virus(VSV)を用いたin vitro感染阻止実験にて解析する。

4. 研究成果

hPIV2 F蛋白を恒常的に産生する細胞株以外の細胞では、組換えウイルスの非増殖性が確認された(上図)。

大量のエボラウイルスGP蛋白をベクター上に搭載



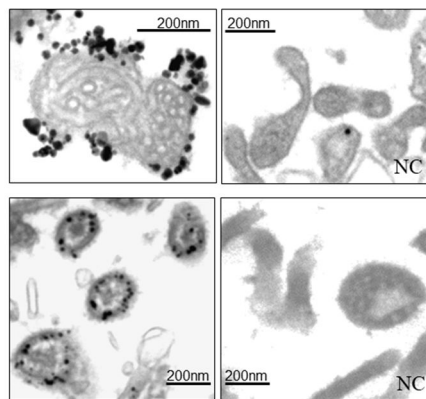
立体構造を認識する中和抗体(KZ52)で検出→立体構造を保持

*in vitro*感染阻止実験により、ワクチン投与マウスの血清中にエボラウイルスGP-pseudotyped VSV感染を明確に阻止する中和抗体活性が存在することを確認した（北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 高田礼人 教授との共同研究）。高度に希釈した血清中にはADE（抗体依存性感染増強活性）効果も確認した。CTL活性の確認は標的ペプチドが定まらず、成功していないが、エボラウイルスの感染阻止には中和抗体が有効であることが既に報告されている（Marzi A et al., Proc Natl Acad Sci USA 110: 1893-1898, 2013）ことから、問題ないと考えている。一方、安全な生ワクチン作製プラットフォーム技術として、外来抗原を搭載したBC-PIVが細胞性免疫を誘導できるかを確認しておくことは重要なことであり、後述のように別の実験系であるが、腫瘍免疫の実験系で確認した。

組換えウイルス自体の特性解析として抗エボラウイルスGP抗体を用いた免疫電顕解析にてベクター表面に大量のGP蛋白が搭載されていることも確認した（上図；三重大学大学院医学系研究科 溝口明教授との共同研究）。

BC-PIV/EBOV-GPと名付けられた当該ワクチンはアフリカでのエボラ出血熱の終息に大いに貢献したとされるrVSV/ZEBOV（Ebola Zaire vaccine live）に匹敵する効果が期待でき（右図）、なおかつrVSV/ZEBOVは増殖型であるために50%で見られた副作用がBC-PIVでは回避できるはずで（BC-PIV/EBOV-GPは同じ生ワクチンのカテゴリーであるが、完全非増殖型なので、理論的に安全性が担保される）、実用性が高いと考える。我が国（対岸の火事ではないことを認識する必要がある）のみならず、世界の保健医療におけるエボラウイルス対策の有力候補ワクチンとして大いに期待・貢献できると考えている。

免疫電子顕微鏡で見た外側搭載タイプと内側搭載タイプ



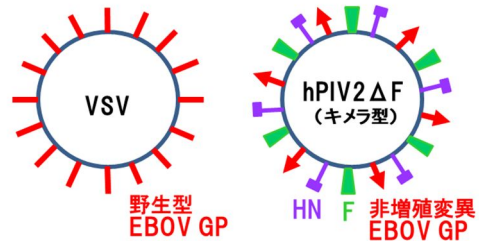
とも確認した。実際、縮小した腫瘍組織の周囲には大量のCD8陽性細胞が集積していた。これらの結果は2019年9月9日号のScientific Reportsにプラットフォーム技術として掲載された。

今回我々が確立した安全な遺伝子組換え生ワクチン迅速作製のプラットフォーム技術は今後、人類を脅かすであろう新興感染症に対する画期的な防御手段として大いに役立つと考えられる。その危機的状況が図らずしも現実となったCOVID-19パンデミックに際しては、BC-PIVを用いた遺伝子組換え実験を文部科学大臣に申請し、承認（2020年3月19日）が得られてからワクチンの作製を開始し、1ヵ月以内にSARS-CoV-2に対するワクチンを4種類完成（2020年4月）させ、蛋白発現も確認できた。ヒトへの応用が期待される場所である。

次に、マウス実験においてGP蛋白に対する最大の抗体価を得るための組換えワクチンの投与条件を決定する目的で、種々の条件下で免疫したマウスの血清を用いてGP蛋白に対するELISAによる評価を行い、最適投与条件を決定した。その条件下で本実験を行った。

さらに、上述の*in vitro*

現行ワクチンとの比較



- ・サルでの有効性は実証済み
- ・体内で増殖
- ・関節炎などの副作用
- ・家畜伝染病予防法上も問題

- ・中和抗体誘導は確認済み
- ・体内で非増殖
- ・hPIV2自体は成人には安全

・サルでの有効性は実証済み

応用版プラットフォーム技術として、抗原をウイルスエンベロープ膜の外側に自在に搭載させる技術も確立し、当該抗原の局在を免疫電顕で確認した（左図）。また、melanomaに対するがん抗原としてgp100とWT1におけるT細胞受容体認識抗原エピトープ（ペプチド）をウイルス膜の外側と内側に各々同時に搭載させたがんワクチンを作製し、マウスに移植したmelanoma細胞の増殖を抑制すること

とも確認した。実際、縮小した腫瘍組織の周囲には大量のCD8陽性細胞が集積していた。これらの結果は2019年9月9日号のScientific Reportsにプラットフォーム技術として掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Yamanaka K, Nakanishi T, Isono K, Hasegawa C, Inada Y, Mizutani K, Matsushima Y, Okada K, Mabuchi T, Kondo M, Yamagiwa A, Kakeda M, Habe K, Nosaka T, Gabazza EC, Yamazaki H, Mizutani H, Kawano M.	4. 巻 139
2. 論文標題 Restrictive interleukin-10 induction by an innocuous Parainfluenza virus vector ameliorates nasal allergy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 682-686.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.05.044.	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 Takeuchi T, Yamaguchi M, Kobayashi K, Miyazaki K, Tawara I, Imai H, Ono R, Nosaka T, Tanaka K, Katayama N.	4. 巻 123
2. 論文標題 MYD88, CD79B, and CARD11 gene mutations in CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 1166-1173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.30404.	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 Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, Nosaka T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Eya2, a target activated by Plzf, is critical for PLZF-RARA-induced leukemogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 e00585-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00585-16.	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 Tsurudome M, Ohtsuka J, Ito M, Nishio M, Nosaka T.	4. 巻 9
2. 論文標題 The hemagglutinin-neuraminidase (HN) head domain and the fusion (F) protein stalk domain of the parainfluenza viruses affect the specificity of the HN-F interaction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.00391.	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 Nagatake T, Suzuki H, Hirata S, Matsumoto N, Wada Y, Morimoto S, Nasu A, Shimojou M, Kawano M, Ogami K, Tsujimura Y, Kuroda E, Iijima N, Hosomi K, Ishii KJ, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J.	4. 巻 30
2. 論文標題 Immunological association of inducible bronchus-associated lymphoid tissue organogenesis in Ag85B-rHPIV2 vaccine-induced anti-tuberculosis mucosal immune responses in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 471-481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy046.	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 Maharjan BD, Ono R, Nosaka T.	4. 巻 54
2. 論文標題 Eya2 is critical for E2A-HLF-mediated immortalization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 981-990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4673.	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 Ohtsuka J, Matsumoto Y, Ohta K, Fukumura M, Tsurudome M, Nosaka T, Nishio M.	4. 巻 528
2. 論文標題 Nucleocytoplasmic shuttling of the human parainfluenza virus type 2 phosphoprotein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 54-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2018.12.005.	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 Ohtsuka J, Fukumura M, Furuyama W, Wang S, Hara K, Maeda M, Tsurudome M, Miyamoto H, Kaito A, Tsuda N, Kataoka Y, Mizoguchi A, Takada A, Nosaka T.	4. 巻 9
2. 論文標題 A versatile platform technology for recombinant vaccines using non-propagative human parainfluenza virus type 2 vector.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 12901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49579-y.	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 D'Alessandro-Gabazza CN, Kobayashi T, . . . Nosaka T (27番目/35人), . . ., Cann I, Gabazza EC.	4. 巻 11
2. 論文標題 A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15344-3.	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 該当する

1. 著者名 Sawaki A, Miyazaki K, Yamaguchi M, Takeuchi T, Kobayashi K, Imai H, Tawara I, Ono R, Nosaka T, Katayama N.	4. 巻 111
2. 論文標題 Genetic polymorphisms and vincristine-induced peripheral neuropathy in patients treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 686-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02832-x.	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 小埜良一、野阪哲哉	4. 巻 -
2. 論文標題 血液腫瘍モデル動物の現状と展望. In: 金倉讓 編集. 造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向-.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Fukumura M, Ohtsuka J, Tsurudome M, Mizoguchi A, Takada A, Tsuji M, Nosaka T.
2. 発表標題 A structure-based vaccine by a non-transmissible human parainfluenza virus vector.
3. 学会等名 2017 International Society for Vaccines (ISV) Annual Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T.
2. 発表標題 Specified amino acids at the dimer interface of the parainfluenza virus HN head domain are required for the virus-specific HN-F interaction.
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 Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, Nosaka T.
2. 発表標題 Eya2 is critical for an aberrant self-renewal in PLZF-RARA-induced leukemogenesis.
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagatake T, Suzuki H, Nasu A, Hirata S, Wada Y, Matsumoto N, Shimojou M, Morimoto S, Hosomi K, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J.
2. 発表標題 Organogenesis of inducible bronchus-associated lymphoid tissue plays an essential role in Ag85B-hPIV2-based anti-tuberculosis respiratory vaccine in mice.
3. 学会等名 第11回次世代アジュバント研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagatake T, Suzuki H, Kawano M, Ogami K, Tsujimura Y, Kuroda E, Iijima N, Hosomo K, Ishii KJ, Yasutomi Y, Kunisawa J, (non-JSI member contributors: Hirata S, Nosaka T).
2. 発表標題 Immunological association of inducible bronchus-associated lymphoid tissue organogenesis in Ag85B-rHPIV2 vaccine-induced anti-tuberculosis mucosal immune responses in mice.
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyazaki K, Takeuchi T, Yamaguchi M, Asano N, Sawaki A, Imai H, Ono R, Nosaka T, Kobayashi K, Tanaka K, Katayama N.
2. 発表標題 Gene mutations and sites of involvement in duodenal-type follicular lymphoma.
3. 学会等名 15 ICML - International Conference on Malignant Lymphoma. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 香奈, 竹内 俊文, 山口 素子, 浅野 直子, 澤木 昭彦, 今井 裕, 小埜 良一, 野阪 哲哉, 小林 一彦, 田中 匡介, 片山 直之
2. 発表標題 十二指腸濾胞性リンパ腫における遺伝子変異と浸潤部位.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sawaki A, Miyazaki K, Takeuchi T, Kobayashi K, Imai H, Tawara I, Ono R, Nosaka T, Yamaguchi M, Katayama N.
2. 発表標題 Gene polymorphisms and vincristine-induced neuropathy in patients who received R-CHOP chemotherapy.
3. 学会等名 61th Annual Meeting & Exposition of the ASH (American Society of Hematology). (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗がん剤、がん治療用医薬組成物、及びキット	発明者 福村正之、大塚順平、野阪哲哉	権利者 三重大学、パイオコモ(株)
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/039487	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学・分子遺伝学分野
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/>
 三重大学卓越型研究施設 次世代型VLPワクチン研究開発センター
<http://www.mie-u.ac.jp/research/intro/VLP-vakzin.html>

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
研究協力者	福村 正之 (Fukumura Masayuki)		
研究協力者	大塚 順平 (Ohtsuka Junpei)		