

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380110

研究課題名（和文）レトロウイルスを用いた DNA ワクチンに代わる新たな RNA ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of RNA vaccine with fish retrovirus, a substitution of DNA vaccine, for fish viral diseases

研究代表者

西澤 豊彦（NISHIZAWA TOYOHIKO）

北海道大学 大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：10222184

研究成果の概要：

「RNA ワクチン」とは、ウイルス感染防御抗原遺伝子を mRNA としてウイルス粒子にパッキング後供給し、免疫を誘導するものである。本研究では、魚類のレトロウイルスである SnRV を用い、魚類病原ウイルスである伝染性造血器壊死症ウイルスおよび神経壊死症ウイルスに対する RNA ワクチンの開発を試み、*in vitro*での RNA ワクチン粒子の構築および発現に成功した。また、「mRNA 型」ワクチンの発展型である「ds-RNA 型」ワクチンを考案し、その感染防御効果を *in vivo*で確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚病

1. 研究開始当初の背景

近年、魚介類の増養殖事業において新興性あるいは再興性のウイルス病の発症件数が著しく増加し、これらウイルス病対策の確立が緊急かつ重要な課題である。ウイルス病の多くは、薬剤による治療が困難なことから、飼育環境からの原因ウイルスの排除を中心とした防除対策が確立されてきたが、一方で積極的な予防法であるワクチンの開発が切望されている。現在までに、マダイイリドウイルスの不活化ワクチンが市販され、またサケ科魚類の IHN ウイルスや VHS ウイルスでは DNA ワクチンの開発が進められ、各々感染防

御効果が確認されている。しかしながら、不活化ワクチンは抗原となるウイルスを培養するために生産コストが高く、またウイルスに対する感染防御で重要と考えられている細胞性免疫の誘導には不向きである。一方、遺伝子組換え体である DNA ワクチンは、細胞性免疫の誘導に有効であるが、消費者の遺伝子組換え体に対する不安等の面で実用化には多くのハードルが残されている。さらに、両ワクチンともに筋肉内接種する必要があり、大規模な養殖場では注射に多大な労力を必要とする点も大きな課題である。本研究では、これらの問題点を解決するために、全く新たなコンセプトのワクチン、すなわち RNA

ワクチンの開発を試みるものである。

2. 研究の目的

RNA ワクチンとは、発現させたい感染防御抗原遺伝子を mRNA としてウイルス粒子にパッケージし供給しようとするものである。感染防御抗原遺伝子はウイルス粒子により標的細胞に運ばれ、そこで通常のウイルスと同様に脱殻し、目的の抗原が発現され、DNA ワクチンと同様に細胞性免疫を誘導することができる。本ワクチンの特徴は、(1) RNA を用いることにより DNA ワクチンで認められた生体内での残存性の問題が解決されること、(2) 目的遺伝子をウイルス粒子にパッケージし供給することで筋肉内注射の必要性を排除可能とした点にある。また、(3) 既存の魚類 RNA ウイルス粒子を応用することで高力価のワクチン作出が可能となり、生産コストも抑えることができ、(4) 遺伝子操作により RNA ワクチンに用いるウイルス粒子の増殖性を欠如させることで安全性も高められる。これらの工夫により、先に紹介した既存ワクチンの問題点をすべて解決し、利便性の高い有効なワクチンが確立できると考えられる。

3. 研究の方法

- (1) 魚類病原 RNA ウイルス：RNA ワクチン開発対象ウイルスとして、IHNV (伝染性造血器壊死症ウイルス)、VHSV (ウイルス性出血性敗血症ウイルス) および魚類ノダウイルス (SJNNV) を用いた。IHNV および VHSV はノビラブドウイルス属に属し、感染防御抗原は G タンパク質 (G prot.) 遺伝子にコードされており、また魚類ノダウイルスの感染防御抗原は外被タンパク質 (VP) 遺伝子にコードされている。本研究では、これらの感染防御抗原遺伝子を RNA ワクチン用の遺伝源として用いた。
- (2) レトロウイルスベクター：魚類レトロウイルスとして snakehead retrovirus (SnRV) を用いた。SnRV は非病原性であるが、既知の C 型レトロウイルスと同様のゲノム構造を有する。すなわち、宿主ゲノムに組込むために重要な LTR 配列をウイルスゲノム両端に有し、ウイルスゲノムパッケージングシグナル (ϕ 配列), gag-pol-env (ウイルス構成タンパク質遺伝子) を有する。
- (3) 魚類由来株化細胞：BF-2 細胞および Sn-BF 細胞を用いた。BF-2 細胞は SnRV を効率よく増殖させる細胞である。一方、SnRV-BF 細胞は、申請者がこれまでの研究

過程で樹立した SnRV 持続感染 BF-2 細胞で、細胞変性することなしに SnRV を持続的に産生する細胞である。

(4) ウイルス感染防御抗原遺伝子発現プラスミドの構築：各種 RNA ウイルスの感染防御遺伝子を mRNA 型で発現できる様に構築し、SnRV の ϕ 配列 (レトロウイルス粒子パッケージ関連遺伝子配列) と連結させ、真核細胞発現用ベクターにクローニングした。この時、形質転換細胞内における標的感染病魚抗原の発現量の定量的観察を可能にする目的で、蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を組込んだベクターも同時に準備した。

(5) RNA ワクチン粒子の構築： ϕ 配列+感染防御抗原発現プラスミドを用いて Sn-BF 細胞を形質転換した。SnRV 持続感染細胞である Sn-BF 細胞は、常に SnRV を産生しており、同細胞中で ϕ 配列を有する mRNA 型の感染防御抗原遺伝子が、強力なプロモーター支配下で大量に発現された場合、Sn-BF 細胞で産生された SnRV 粒子に mRNA 型感染防御遺伝子が高率にパッケージされ、Reassortant Virus (rV) 粒子として培養液中に放出される。

(6) RNA ワクチンウイルスの感染性の確認：RNA ワクチンウイルス (rV 粒子) を BF-2 細胞に感染させ、GFP 蛍光発現強度ならびに抗ウイルス血清を用いた蛍光抗体法により、各ウイルス感染防御抗原の発現量を測定した。また同 RNA ワクチンウイルスを様々な魚類由来細胞などに接種し、その感染性および感染防御抗原の発現性について検討した。

(7) *In vivo* での発現およびワクチン効果の確認：RNA ワクチンウイルスをニジマスおよびマハタに筋肉内接種し、感染防御抗原が発現されることを血清中の特異抗体の検出により確認した。

4. 研究成果

- (1) 各ウイルス遺伝子のクローニング：レトロウイルスである SnRV の LTR、LTR+ ϕ 配列および GagPol 遺伝子を、また IHNV、VHSV および魚類ノダウイルスの感染防御遺伝子を各々クローニングした。さらに、パッケージ粒子産生用遺伝子として LTR-GagPol-LTR 等を、またパッケージ用遺伝子として ϕ 配列を有する各ウイルス感染防御遺伝子を、各々 pCR-GFP プラスミドに組み込み、真核細胞における発現系を構築した。
- (2) 標的遺伝子をパッケージしたリアソータント粒子の形成：Lipofectamin および UV-不活化 SnRV を用いることで、魚類由来細

胞である BF-2 細胞に標的遺伝子を効率よくインテグレーションさせる系を確立した。さらに、形質転換細胞を Geneticin (250 µg/mL) 含有培地で 7-10 日間培養することにより標的細胞のクローニングが可能であることを確認した。

(3) *In vitro* におけるリアソータント粒子の感染性：リアソータント粒子を BF-2 細胞に接種することで、パッキングされた標的遺伝子が発現することを確認したが、その発現量は微量であった。但し、CMV プロモーターを用いることで、発現量の改善が認められた。

(4) *In vivo* での確認：残念ながら、SnRV のニジマスおよびマハタに対する感染性が極めて低かったことから、*in vivo* での確認は出来なかった。これに対し、マハタおよびニジマスに感染するレトロウイルスの存在を新たに確認した。現在、そのウイルスの分離培養を試みている。

(5) 予想外の成果：レトロウイルスを応用した RNA ワクチンは、感染防御遺伝子を用いた「mRNA 型」のワクチンである。但し、「mRNA 型」ワクチンの発現効率が予想以上に低かったこと、また SnRV の感染宿主域が予想以上に狭まったこと等、予想外の課題が新たに生じた。本研究ではこれらの課題を克服するために、「mRNA 型」の発想を進め、新たに「ds-RNA 型」RNA ワクチンを考案した。「ds-RNA 型」ワクチンとは、本研究で開発してきた「mRNA 型」ワクチンの発想を発展させたものである。インターフェロン (IFN) 誘導物質である ds-RNA を投与することで魚を抗ウイルス状態とし、この間に養殖環境に存在する病原ウイルスに暴露することで、ウイルスによる魚の死亡を制御しながらウイルス感染を成立させ、最終的には病原ウイルスに対する免疫を成立させようとするものである。本法は「mRNA 型」ワクチンと比べ以下の点で優れている。①遺伝子組み換え技術を必要としないこと、②ウイルスの培養ならびに不活化を必要としないこと、③接種後速やかに消失するという RNA ワクチン最大の利点を継承していること、④多様な魚種とウイルスに応用可能であることから、養殖現場での実用化が十分可能な「RNA ワクチン」である。

(6) 「ds-RNA 型」ワクチンの効果：「ds-RNA 型」ワクチンの感染防御効果が予想以上に高いことを実験的に確認した。「ds-RNA 型」ワクチンは、「mRNA 型」に比べ開発が容易であること、また様々なウイルス病への応用も可能であることから、現場での実用性の点で極めて有望な RNA ワクチンであると考えられた。今後は、「ds-RNA 型」ワクチンの実用化を視野に入れた研究を推進する予定である。

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 11 件)

- 1) Kokawa, Y., Takami, I., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) A mixed infection in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* affected with viral nervous necrosis (VNN). *Aquaculture*, 284, 41-45. (査読有り)
- 2) Kim, W.-S., Mochizuki, M., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) Detection of specific antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus from rainbow trout sera by ELISA using two novirhabdoviruses. *Fish Pathol.*, 43, 112-116. (査読有り)
- 3) Nishizawa, T., Kokawa, Y., Wakayama, T., Kinoshita, S. and Yoshimizu, M. (2008) Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently infected with snakehead retrovirus (SnRV). *Dis. Aquat. Org.*, 79 19-25. (査読有り)
- 4) Kim, W.-S., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2007) Non-specific adsorption of fish immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells. *Dis. Aquat. Org.*, 78, 55-59. (査読有り)
- 5) Kim, W.-S., Nishizawa, T., Oh, M.-J., Park, J.-W., Kurath, G. and Yoshimizu, M. (2007) Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Arch. Viro.*, 152, 2119-2124. (査読有り)
- 6) 高見生雄・西澤豊彦・吉水 守 (2007) トラフグロ白症に対する感染防御誘導の試み. 魚病研究, 42, 67-69. (査読有り)
- 7) 高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水 守 (2007) 口白症トラフグ脳磨砕濾液を用いた人為感染試験によるブリでの発症. 魚病研究, 42, 35-39. (査読有り)
- 8) 高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水 守 (2007) 口白症感染耐過トラフグ血清を用いた口白症関連タンパク質の検出. 魚病

研究, 42, 29-34. (査読有り)

- 9) Nishizawa, T., Kinoshita, S., Higashi, S., Kim, W.-S. and Yoshimizu, M. (2006) Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, 71, 267-272. (査読有り)
- 10) Nishizawa, T., Savaş, H., Işıdan, H., Üstündağ, C., Iwamoto, H. and Yoshimizu, M. (2006) Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from free-living turbot *Psetta maxima* in Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2373-2378. (査読有り)
- 11) Kitamura, S.-I., Jung, S.-J., Kim, W.-S., Nishizawa, T., Yoshimizu, M. and Oh, M.-J. (2006) A new genotype of lymphocystivirus, LCDV-RF, from lymphocystis diseased rock- fish. *Arch. Virol.*, 151, 607-615. (査読有り)

[学会発表] (計 24 件)

- 1) 粉川愉記・西澤豊彦・高見生雄・吉水 守 (2009) Poly (I:C) 免疫法を用いたマハタのノダウイルスに対する特異免疫の誘導. 日本水産学会, 3月27-31日, 東京海洋大学, 東京
- 2) Kwon, S.-R., Nishizawa, T., Oh, M.-J. and Yoshimizu, M. (2008) Productivity of red seabream iridovirus (RSIV) in grouper fin (GF-2) cell line persistently infected with RSIV. World Aquaculture 2008, May 19-23, Busan, Korea.
- 3) Yoshimizu, M., Nishizawa, T., Kim, W.-S. and Oh, M.-J. (2008) Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) based on the glycoprotein gene. In "the 8th Japan-Korea, Korea-Japan Joint Sympo. on Aquaculture 2008", Oct. 26-27, Wakayam.
- 4) Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) Molecular epidemiology of fish RNA viruses in the Far Eastern Asia. In the 5th World Fisheries Congress, Oct. 20-24, Yokohama.

- 5) Kim, H. J., Oseko, N., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) A live-vaccine of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. In the 5th World Fisheries Congress, Oct. 20-24, Yokohama.
- 6) Kwon, S.-R, Takano, R., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) Modified ELISA system for detection of specific antibodies against red seabream iridovirus (RSIV) in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. In the 5th World Fisheries Congress, Oct. 20-24, Yokohama.
- 7) Kokawa, Y., Takami, I., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) A mixed infection in sevenband grouper *Epinephelus septem-fasciatus* affected with viral nervous necrosis (VNN). In the 5th World Fisheries Congress, Oct. 20-24, Yokohama.
- 8) 望月満美子・笠井久会・西澤豊彦・吉水 守 (2008) IHN株の静岡県産ニジマスに対する病原性について. 日本水産学会, 3月27-31日, 東海大学, 清水.
- 9) 西澤豊彦・吉水 守 (2007) Infectious hematopoietic necrosis virus (IHN, 魚類ラドウイルス)のアジアにおける分子疫学. ウイルス学会, 10月21-23日, 札幌.
- 10) 金 尉植・西澤豊彦・吉水 守 (2007) ニジマス血清中の抗IHN特異抗体検出ELISAの改良. 魚病学会, 9月28-29日, 北海道大学, 函館.
- 11) 粉川愉記・木下真一・若山貴子・西澤豊彦・吉水 守 (2007) Snakehead retrovirus (SnRV)による魚類ノダウイルスの増殖の亢進. 魚病学会, 9月28-29日, 北海道大学, 函館.
- 12) 粉川愉記・高見生雄・西澤豊彦・吉水 守 (2007) VNN罹病マハタに存在するノダウイルス以外の濾過性病原体. 魚病学会, 9月28-29日, 北海道大学, 函館.
- 13) 西澤豊彦・吉水 守 (2007) ウイルス混合感染の重要性と対策. H19年度日本魚病学会シンポジウム, 魚病学会, 9月28-29日, 北海道大学, 函館.

- 14) 金 尉植・西澤豊彦・吉水 守 (2007) サケ科魚類の抗体検査法について -IHNを例に-, 第1回サケ学研究会, 9月24日, 北海道大学, 函館
- 15) Nishizawa, T and Yoshimizu, M (2007) Molecular Epizootiology of fish diseases by RNA viruses in the Far Eastern Asia. In the 7th Int. Symp. on Viruses of Lower Vertebrates. Aip. 22-25, Oslo, Norway.
- 16) 金 尉植・呉 明柱・J. W. Park・G. Kurath・西澤豊彦・吉水 守 (2007) Gタンパク質遺伝子に基づく伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) 韓国株のゲノタイピング. 日本水産学会, 3月27-31日, 東京海洋大学.
- 17) Kokawa, Y., Takami, I., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2006) Kuchijir-sho associated proteins (KAPs) in brain tissues of Tiger puffer and Yellowtail. In the 1st Int. Symp. on Viral Nervous Necrosis of Fish, Nov. 28 - Dec.1, Hiroshima.
- 18) 高見生雄・西澤豊彦・吉水 守 (2006) 口白症トラフグの脳組織磨砕濾液を用いたホルマリン不活化ワクチンの有効性. 日本魚病学会, 9月14-15日, 長崎大学.
- 19) 高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水 守 (2006) 感染耐過トラフグ血清を用いた口白症原因体関連タンパク質の検出. 日本魚病学会, 9月14-15日, 長崎大学.
- 20) 高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水 守 (2006) 口白症トラフグ脳磨砕濾液を用いた人為感染試験によるブリでの発症. 日本魚病学会, 9月14-15日, 長崎大学.
- 21) 金 尉植・西澤豊彦・吉水 守 (2006) 抗体検出ELISAにおけるブロッキング剤と魚類IgMの非特異反応について. 日本魚病学会, 9月14-15日, 長崎大学.
- 22) Yoshimizu, M., Kim, W.-S., Kasai, H. and Nishizawa, T. (2006) Evaluation of methods for sero-epidemiology and surveillance of infectious hematopoietic necrosis. In the 11th Int. Symp. on Veterinary Epidemiology and Economics. Aug. 6-11, Cairns, Australia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者
西澤 豊彦 (NISHIZAWA TOYOHIKO)
北海道大学 大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号: 10222184

(2) 研究分担者
吉水 守 (YOSHIMIZU MAMORU)
北海道大学 大学院水産科学研究院・教授
研究者番号: 40122915

(3) 連携研究者
なし