

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02663

研究課題名(和文) 遺伝子改変技術を応用したロタウイルスワクチンの新たなプラットフォーム

研究課題名(英文) New rotavirus vaccine platforms using reverse genetics systems

研究代表者

小林 剛 (Kobayashi, Takeshi)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：90324847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ロタウイルスは乳幼児に重篤な下痢症を引き起こす。発展途上国を中心に年間約20万人の死亡例が報告されている。本研究では、次世代ロタウイルスワクチンの開発基盤の確立を目的とし、独自に開発した新規ロタウイルスリバースジェネティクス系を駆使することで、ロタウイルスにおける複製機構ならびに病態発現機序の解明を行う。研究成果として、ロタウイルスの増殖機構を理解する上で有用なヒトロタウイルスOdelia株(G4P[8])ならびにマウスロタウイルスEW株のリバースジェネティクス系の開発などを行った。これらの成果はロタウイルスの予防・治療法の開発研究を進める上で有用と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、使用されているロタウイルスワクチンにおいては、発展途上国における不十分な防御効果、高額な費用、副反応(腸重積症)等の問題があげられており、次世代ワクチンの開発研究は重要な課題である。これまで有用なリバースジェネティクス系の開発の遅れからロタウイルスの複製機構ならびに病態発現機序の解明は進んでいなかった。本研究成果で開発されたヒトおよびマウスロタウイルス株のリバースジェネティクス系やレポーター遺伝子発現ロタウイルスを用いた研究は新規ワクチン開発や感染伝播、病態発現機序の理解につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Rotaviruses are a major cause of severe gastroenteritis in infants and young children worldwide and are responsible for approximately 215,000 deaths annually, particularly in developing countries. The objective of this research is to understand how rotaviruses replicate in vitro and cause diseases in vivo using plasmid-based rotavirus reverse genetics systems. We established a plasmid-based reverse genetics system for G4P[8] human rotavirus strain Odelia. Using reverse genetics systems, we recovered a panel of monoreassortant viruses harboring one gene segment from strain Odelia within the simian rotavirus strain SA11 genetic backbone. We also tried to develop a reverse genetics system for murine rotavirus strain EW. Reassortant viruses between strains SA11 and EW generated by the rescue system enabled study of the biological functions of viral gene segments. These systems will provide insight into the molecular mechanisms underlying rotavirus replication and pathogenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ワクチン ロタウイルス リバースジェネティクス系

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルス (RV) は乳幼児に深刻な嘔吐・下痢症を引き起こす原因ウイルスであり、発展途上国を中心に年間約 20 万人の死亡例が報告されている。先進国においては、死亡例は少ないが、入院治療を必要とする重症例は多く、医療経済の観点から重視されている。

現在、2 種類の弱毒生 RV ワクチンが広く使用されているが、RV 感染症が特に問題視されている発展途上国における不十分な防御効果、高額な費用、副反応 (腸重積症) また、既存のワクチンでは多様な RV の全ての血清型を制御することが困難になる可能性等の問題から、次世代ワクチンの開発研究の重要性が増している。RV は 11 本の分節型二本鎖 RNA をゲノムに有する。様々な哺乳動物や鳥類に感染し、種間伝播や分節ゲノムの遺伝子再集合は RV の遺伝子多様性の獲得に寄与している。ウイルスの感染性には、3 層構造 (外殻、内殻、コア構造) からなる RV の粒子表面に存在する中和抗原を含有する VP4 と VP7 が関与している。RV は VP4、VP7 遺伝子型の組み合わせにより多数の遺伝子型が存在する。

エンテロトキシン活性を有する RV NSP4 と下痢症との関わりについては解析が進んでいる。NSP4 以外にも NSP1 が Interferon regulatory factor 3 と結合し、分解することから、自然免疫阻害因子として、病原性に関与することが示唆されている。しかし、RV においてはウイルス遺伝子改変技術およびヒト感染病態を完全に反映している優れた動物モデルの開発の遅れから、下痢症や腸重積症の発症メカニズムについては詳細な解明がなされていない。

2. 研究の目的

他の病原性 RNA ウイルスと比較して、RV ではリバースジェネティクス系の開発が遅れていたことから、病原性遺伝子の同定やその機能解析研究は進んでいない。これまでの研究は、組換えタンパク質や分節ゲノムの交換体を用いた解析のみが行われており、リバースジェネティクス系の欠如から感染性組換えウイルスによる感染サイクルにおける解析研究は不可能であった。我々のグループは人工的に組換え RV を作出できる完全なリバースジェネティクス系の開発に世界に先駆けて成功した。この技術の開発により、これまで不可能であった RV 遺伝子を任意に改変し、複製や病原性に関わる変異を持つ様々な組換え RV を作製することが可能になった。本研究では、独自に開発した新規 RV 遺伝子改変技術を駆使することで、病原性に関わる RV 分節遺伝子に変異を加えたワクチンシードウイルスとなりうる組換え RV の作製やレポーター遺伝子発現 RV 等の開発を行うとともに、新規ロタウイルス株のリバースジェネティクス系についても確立し、RV 感染における増殖機構の解明を目指す。得られた知見を基に次世代 RV ワクチンの開発研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

ヒト RV のリバースジェネティクス系の開発およびレポーター遺伝子発現 RV の作製
サル RV においては効率的なリバースジェネティクス系が確立されている。一方、新規ワクチン開発を行う上で、ヒト RV のリバースジェネティクス系の開発は重要な課題である。本研究では、ヒト RV の主な流行型の一つである G4P[8] の遺伝子型をもつ Odelia 株のリバースジェネティクス系の開発を試みた。Odelia 株由来ウイルス粒子から二本鎖 RNA ゲノムを抽出し、cDNA を作製し、全ゲノム配列を決定した。得られた Odelia 株ゲノム由来 cDNA を T7 プロモーターおよび D 型肝炎リボザイム配列の間に配置したコンストラクトを作製した。組換えウイルスの作製のた

め、全 11 分節の Odelia 株ゲノム由来 cDNA をコードするプラスミドと RV 人工合成促進因子を共に T7 RNA ポリメラーゼ発現細胞に導入した。また、野生型 Odelia 株の作製に加えて、SA11 株 (サル RV) と Odelia 株とのモノリアソータントウイルスおよび NSP1 遺伝子変異ウイルスについても作製し、解析を行った。RV の増殖機構の解明や抗ウイルス薬のスクリーニング等に有用なレポーター遺伝子発現 RV の開発を行った。2 種類の NanoLuc ルシフェラーゼ断片 (LgBiT および HiBiT) の相補性を利用した発光系である Split NanoBiT System を応用し、NSP1 遺伝子の C 末端に 11 アミノ酸の HiBiT 配列を挿入した組換えサル RV を作製した。作製した組換えウイルスの増殖性およびレポーター活性について解析を行った。

マウス RV のリバースジェネティクス系の開発

RV の感染には種特異性があり、サル RV はマウスでの増殖性が低い。そのため、マウスで増殖性が高いマウス RV (EW 株) のリバースジェネティクス系の開発を試みた。EW 株由来ウイルス粒子から二本鎖 RNA ゲノムを抽出し、cDNA を作製し、得られたウイルスゲノム由来 cDNA を T7 プロモーターおよび D 型肝炎リボザイム配列の間に配置したコンストラクトを作製した。全 11 分節の EW 株ゲノム由来 cDNA をコードするプラスミドと RV 人工合成促進因子を共に T7 RNA ポリメラーゼ発現細胞に導入することで、組換えウイルスの作出を試みた。また、SA11 株 (サル RV) と EW 株とのリアソータントウイルスの作製についても試みた。

4. 研究成果

ヒト RV のリバースジェネティクス系の開発

Odelia 株全 11 分節ゲノム由来 cDNA を T7 RNA ポリメラーゼ発現細胞に導入した結果、組換え Odelia 株の作出に成功した。作製した組換え Odelia 株の培養細胞における増殖性は野生型と同程度であった。得られた組換え Odelia 株の NSP2 遺伝子に挿入した遺伝子マーカーの存在が確認できたことから、ウイルスゲノム由来 cDNA から作出された組換えウイルスであることが明らかになった。また、SA11 株と Odelia 株とのモノリアソータントウイルスを作製し、増殖性について解析を行った。その結果、SA11 株をバックボーンとしたモノリアソータントウイルスでは VP1、VP2、VP4 および VP7 遺伝子がウイルス複製に影響を与えていることが明らかになった。

Odelia 株のリバースジェネティクス系を用いて、

NSP1 の C 末端 166 アミノ酸領域を欠損させた変異体 (rsOdelia-NSP1-dC166) を作製し、解析を行った結果、rsOdelia-NSP1-dC166 は親株と比較して顕著に複製能が低下していた (図 1)。これらの結果から、Odelia 株 NSP1 の C 末端領域にはインターフェロンシグナル伝達経路の阻害等に關与することでウイルス複製に影響を及ぼす重要な領域が含まれていることが示唆された。

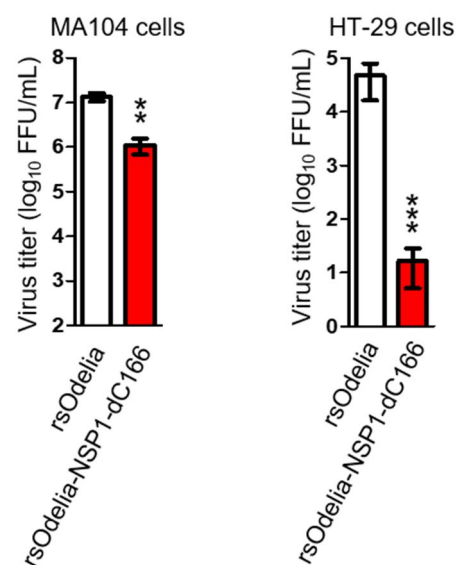


図1. NSP1タンパク質C末端166アミノ酸領域を欠損させた変異体の複製能は低下していた。

Split NanoLucペプチドタグを発現する組換えRVの作製

SA11 株 NSP1 遺伝子の C 末端に HiBiT タグを挿入したコンストラクトを作製し、組換えウイルス (rSA11-HiBiT) を作出した (図 2)。rSA11-HiBiT は親株と同様に効率よく培養細胞で増殖し、高い NanoLuc ルシフェラーゼ活性を示した (図 2)。挿入した HiBiT タグの安定性について解析を行った結果、培養細胞で 10 回継代後も HiBiT 配列は安定してウイルスゲノム (NSP1 遺伝子) に保持されていた (図 3)。さらに rSA11-HiBiT の有用性を理解するため、RV の増殖阻害剤であるリバビリンを用いて解析を行った。その結果、リバビリン濃度依存的に rSA11-HiBiT の複製能およびレポーター活性は抑制された (図 4)。以上の結果より、rSA11-HiBiT は安定的にレポーター遺伝子を発現し、効率よく複製できることが明らかになった。また、rSA11-HiBiT は抗ウイルス薬のスクリーニングに有用なツールであることが示された。

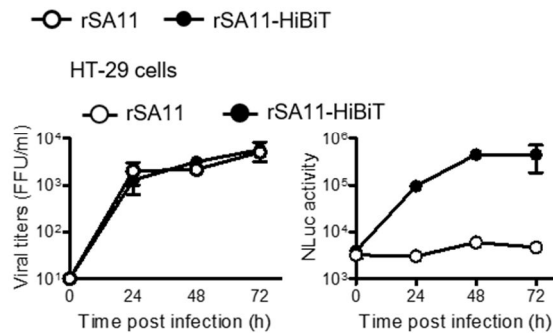
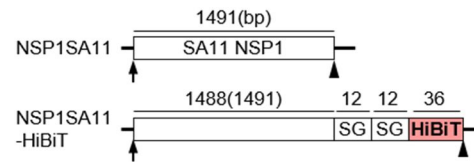


図2. SA11株NSP1遺伝子のC末端領域にHiBiT配列を挿入したrSA11-HiBiTを作製した。rSA11-HiBiTはrSA11と同程度の複製能を示し、顕著なNanoLucルシフェラーゼ活性を示した。

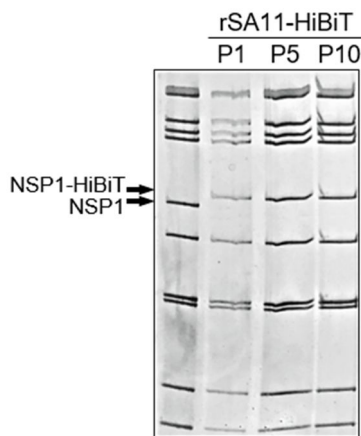


図3. rSA11-HiBiTは培養細胞で10回継代後もHiBiT配列を安定的に保持していた。

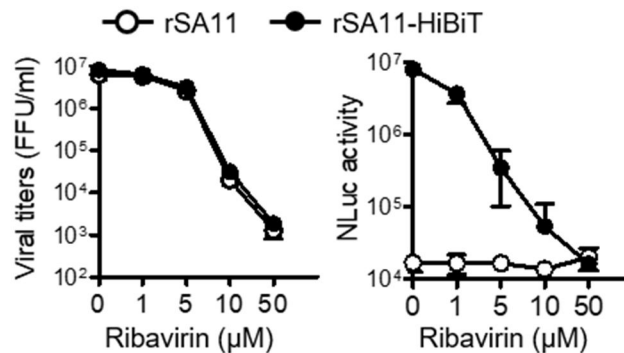


図4. rSA11-HiBiTをリバビリンで処理した場合、濃度依存的にウイルス力価およびレポーター活性が抑制された。

マウス RV のリバースジェネティクス系の開発

EW 株全 11 分節ゲノム由来 cDNA および人工合成促進因子を同時に T7 RNA ポリメラーゼ発現細胞に導入し、組換えウイルスの作出を試みたが、作出することはできなかった。そこで、SA11 株および EW 株における様々なリアソータントウイルスの作製を行った。マウスモデルを用いて SA11 株と下痢症の発症能について比較した結果、幾つかのリアソータントウイルスでは下痢発症能が増強していた。また、EW 株由来分節ゲノム 10 種および SA11 株由来分節ゲノム 1 種をもつリアソータントウイルスの作製にも成功した。これらのリアソータントウイルスは RV の病原性を理解する上で有用と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanai Yuta, Kawagishi Takahiro, Sakai Yusuke, Nouda Ryotaro, Shimojima Masayuki, Saijo Masayuki, Matsuura Yoshiharu, Kobayashi Takeshi.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cell-cell fusion induced by reovirus FAST proteins enhances replication and pathogenicity of non-enveloped dsRNA viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1007675	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 Kanai Yuta, Kawagishi Takahiro, Matsuura Yoshiharu, Kobayashi Takeshi.	4. 巻 93
2. 論文標題 In Vivo Live Imaging of Oncolytic Mammalian Orthoreovirus Expressing NanoLuc Luciferase in Tumor Xenograft Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00401-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00401-19	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 Kanai Yuta, Kawagishi Takahiro, Nouda Ryotaro, Onishi Misa, Pannacha Pimfhun, Nurdin Jeffery A., Nomura Keiichiro, Matsuura Yoshiharu, Kobayashi Takeshi.	4. 巻 93
2. 論文標題 Development of Stable Rotavirus Reporter Expression Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01774-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01774-18	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 Kawagishi T, Nurdin J, Onishi M, Nouda R, Kanai Y, Tajima T, Ushijima H, Kobayashi T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Reverse Genetics System for a Human Group A Rotavirus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00963-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00963-19	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 Kawagishi Takahiro, Kanai Yuta, Nouda Ryotaro, Fukui Ichika, Nurdin Jeffery A., Matsuura Yoshiharu, Kobayashi Takeshi.	4. 巻 94
2. 論文標題 Generation of Genetically RGD 1-Modified Oncolytic Reovirus That Enhances JAM-A-Independent Infection of Tumor Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01703-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01703-20	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 Kanai Yuta, Onishi Misa, Kawagishi Takahiro, Pannacha Pimfhun, Nurdin Jeffery A., Nouda Ryotaro, Yamasaki Moeko, Lusiany Tina, Khamrin Pattara, Okitsu Shoko, Hayakawa Satoshi, Ebina Hirota, Ushijima Hiroshi, Kobayashi Takeshi.	4. 巻 95
2. 論文標題 Reverse Genetics Approach for Developing Rotavirus Vaccine Candidates Carrying VP4 and VP7 Genes Cloned from Clinical Isolates of Human Rotavirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01374-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01374-20	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 該当する

1. 著者名 Pannacha Pimfhun, Kanai Yuta, Kawagishi Takahiro, Nouda Ryotaro, Nurdin Jeffery A., Yamasaki Moeko, Nomura Keiichiro, Lusiany Tina, Kobayashi Takeshi.	4. 巻 534
2. 論文標題 Generation of recombinant rotaviruses encoding a split NanoLuc peptide tag	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 740 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.007	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 Suzuki Youichi, Tanaka Atsushi, Maeda Yusuke, Emi Akino, Fujioka Yoshihiko, Sakaguchi Shoichi, Vasudevan Subhash G., Kobayashi Takeshi, Lim Chang-Kweng, Takasaki Tomohiko, Wu Hong, Nakano Takashi.	4. 巻 552
2. 論文標題 Construction and characterization of an infectious clone generated from Chikungunya virus SL11131 strain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 52 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2020.09.006	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 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 山崎萌子、金井祐太、浜島りな、南昌平、Pannacha Pimfun、納田遼太郎、Jeffry Nurdin、Tina Lusiany、松本真依、大西未紗、小林剛
2. 発表標題 ロタウイルス感染における多様な細胞表面糖鎖レセプターの意義
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanai Y, Kobayashi T.
2. 発表標題 Development of rotavirus vector as vaccine platform for intestinal pathogens
3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program's 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawagishi T, Nurdin A, Onishi M, Nouda R, Kanai Y, Tajima T, Ushijima H, Kobayashi T.
2. 発表標題 Reverse Genetics System for a Human Group A Rotavirus
3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program's 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kobayashi T.
2. 発表標題 The Application of Reverse Genetics Systems in Studies of dsRNA Virus Replication and Pathogenesis
3. 学会等名 Gordon Research Conference Viruses and Cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nurdin J, Kawagishi T, Onishi M, Kanai Y, Tajima T, Ushijima H, Kobayashi T.
2. 発表標題 Reverse Genetic System for Human Rotavirus A Odelia strain
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 納田遼太郎, 金井祐太, 川岸崇裕, Pannacha Pimfhun, 小林剛
2. 発表標題 口タウイルス NSP3タンパク質のeIF4G結合領域変異がウイルス複製に及ぼす影響
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nurdin J, Kawagishi T, Onishi M, Kanai Y, Tajima T, Ushijima H, Kobayashi T.
2. 発表標題 Reverse Genetic System for Human Rotavirus A Odelia strain
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井祐太, 川岸崇裕, Pannacha Pimfhun, 納田遼太郎, 大西未紗, Nurdin Jeffrey, 野村圭一郎, Tina Luciany, 山崎萌子, 小林剛
2. 発表標題 口タウイルスベクターの開発
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi T.
2. 発表標題 ロタウイルス人工合成法の開発と新規ワクチン
3. 学会等名 第22回日本ワクチン学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawagishi T, Kanai Y, Sakai Y, Nouda R, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T.
2. 発表標題 Nelson Bay reovirus C body domain is associated with strain-specific differences in viral replication
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 Kanai Y, Kawagishi T, Onishi M, Pannacha P, Nouda R, Nurdin J, Nomura K, Ushijima H, Kobayashi T.
2. 発表標題 Platform for rotavirus vaccine development using plasmid-based reverse genetics
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 Nouda R, Kawagishi T, Kanai Y, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T.
2. 発表標題 Fusogenic bat-borne orthoreovirus p17 protein regulates viral replication in a host-specific manner
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 Pannacha P, Kanai Y, Onishi M, Kawagishi T, Nouda R, Nurdin J, Matsuura Y, Kobayashi T.
2. 発表標題 Development of stable reporter rotaviruses
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 Kobayashi T.
2. 発表標題 Reverse genetics systems for orthoreoviruses and rotaviruses
3. 学会等名 13th International dsRNA Symposium 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanai Y, Kawagishi T, Onishi M, Pannacha P, Nouda R, Nurdin J, Nomura K, Ushijima H, Kobayashi T.
2. 発表標題 Antigenicity of simian and human reassortant rotaviruses generated by reverse genetics
3. 学会等名 13th International dsRNA Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawagishi T, Kanai Y, Sakai Y, Nouda R, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T.
2. 発表標題 Nelson Bay Orthoreovirus cell attachment protein C determines strain-specific differences in viral replication and pathogenesis
3. 学会等名 13th International dsRNA Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井祐太、川岸崇裕、Pimfhun Pannacha、納田遼太郎、Nuridin Jeffery、野村圭一郎、牛島廣治、小林剛
2. 発表標題 次世代組換えロタウイルスワクチン作製の試み
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi T.
2. 発表標題 Nelson Bay orthoreovirus p17 protein regulates viral replication in a host-specific manner
3. 学会等名 第12回日中国際ウイルス学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 南 昌平、小林 剛	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 6
3. 書名 Pharama Medica January 2021 vol.39 No1	

1. 著者名 小林 剛	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 腎と透析	

1. 著者名 川岸 崇裕、小林 剛	4. 発行年 2018年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 獣医畜産新報	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	金井 祐太 (Kanai Yuta) (80506501)	大阪大学・微生物病研究所・講師 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------