

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19444

研究課題名(和文) 粘膜免疫誘導型ロタウイルスベクターを用いた新規ノロウイルスワクチンの開発戦略

研究課題名(英文) Development of novel norovirus vaccine using rotavirus-based mucosal vector

研究代表者

小林 剛 (Kobayashi, Takeshi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：90324847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ノロウイルスは、感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであり、ワクチンは実用化されていない。本研究では、独自に開発したロタウイルス遺伝子改変技術を駆使することで、ノロウイルスおよびロタウイルスに対する経口ワクチンの開発基盤の確立を目的とする。安定的に外来遺伝子を発現できるロタウイルスベクターの改良を行った。この系を応用し、ノロウイルス VP1 遺伝子全長をロタウイルス NSP1 遺伝子に挿入した組換えウイルスを作製し、性状解析を行った。その結果、感染細胞で VP1 タンパク質の発現を確認することができた。これらの成果は、ロタウイルスを粘膜ワクチンベクターとして応用す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

ヒトノロウイルスでは効率の良い細胞培養系の開発が遅れており、ワクチンも開発されていない。現在、ノロウイルス様粒子(VLP)がワクチン候補として開発が進んでいる。本研究では、ノロウイルスVLPを発現するロタウイルスを開発し、ノロウイルスおよびロタウイルスに対する2価ワクチンの開発を目的とした。本研究において、安定的にレポーター遺伝子やノロウイルスVP1遺伝子を発現するロタウイルスベクターの開発に成功した。これらの成果はノロウイルスワクチンの開発だけでなく、他の消化器感染症に対するワクチン開発にも有用と考えられ、社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Human noroviruses are a leading cause of gastroenteritis outbreaks worldwide. Live-attenuated and inactivated norovirus vaccines have not been pursued due to the lack of a robust norovirus cell culture system. In this study, we aimed to develop norovirus vaccine using rotavirus-based vaccine vector. We first generated stable reporter rotaviruses expressing luciferase and green fluorescent proteins. Using the stable rotavirus reporter expression systems, we generated a recombinant rotavirus expressing norovirus VP1 gene derived from GII.4 strain. Expression of VP1 was clearly observed in cells infected with rotavirus expressing VP1 gene. These results demonstrate the utility of rotavirus as a mucosal vaccine vector against enteric pathogens including norovirus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ノロウイルス ロタウイルス ワクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス (NoV) は、感染性胃腸炎の主な原因ウイルスである。NoVでは、効率の良い培養細胞を用いた増殖系が開発されていないことから、基礎研究は進んでおらず、ワクチンも実用化されていない。NoVの感染防御に対して、腸管粘膜免疫の重要性が知られている。粘膜免疫システムは、粘膜上皮に存在するM細胞が免疫系の作動に必要な異物抗原を取り込むことにより始動する。しかし、粘膜ワクチンの開発にはワクチン抗原を効率的にM細胞へ運ぶことが必要不可欠とされているものの、効果的なデリバリー方法の開発は遅れている。NoVワクチンの有力候補として、ウイルス様粒子 (VLP) が注目されている。NoV-VLPは構造タンパク質VP1のみを発現させることで作製できる。複製能力を欠き、NoV粒子と類似の構造を持つVLPは高い安全性と免疫獲得効果が期待されている。

### 2. 研究の目的

ロタウイルス (RV) は、乳幼児の胃腸炎の主な原因ウイルスである。現在、2種類の経口弱毒生ワクチンが実用化されており、RV感染の重症化の予防に大きく貢献している。RVに対する防御免疫の主体はNoVと同様に腸管局所で誘導されるM細胞を介する粘膜免疫である。そのため、RVを粘膜感染症に対する粘膜ワクチンベクターとして応用する試みは、ワクチン抗原デリバリーに極めて有用な戦略と考えられる。複雑なゲノム構造を持つRVにおいては、ウイルス遺伝子改変技術の開発が遅れていたことから、これまで人工的に任意の変異を加えた組換えウイルスを作製することは不可能であった。最近、我々のグループは世界初となる完全なRVの遺伝子操作系の確立に成功した。本研究では、新規RV遺伝子改変技術を駆使することで、NoVおよびRVに対する粘膜ワクチンの開発基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

サルRV SA11株由来NSP1遺伝子の様々な部位に、レポーター遺伝子 (NLucもしくはZsGreen遺伝子) を挿入し、レポーター遺伝子発現RVを作製した。得られたレポーター遺伝子発現RVの増殖能、レポーター遺伝子の発現およびウイルス継代後のレポーター遺伝子の安定性について検討を行った。さらに、安定的にレポーター遺伝子を発現するRVの改良研究を行った。レポーター遺伝子発現RVの開発研究で得られた知見を基に、NSP1遺伝子にNoV-VP1遺伝子を挿入した組換えRV (RV/NoV-VP1) を作製した。サル由来MA104細胞にRV/NoV-VP1を感染させた後、全細胞サンプルをSDS-PAGEで展開し、ウサギ抗NoV-VP1抗体を用いたウェスタンブロッティングによりNoV-VP1の検出を試みた。また、MA104細胞にRV/NoV-VP1を感染後、上清を回収した。この上清を28,000rpmで遠心し、得られたペレットをPBSに溶解した。密度勾配遠心法により、NoV-VLPの精製を試みた。

### 4. 研究成果

我々が以前に開発したNLuc遺伝子発現RVは、NLucを発現するものの、培養細胞で繰り返し継代することで、NLuc遺伝子を欠損した変異ウイルスが認められ、挿入した外来遺伝子が不安定であることが判明した。そこで、NSP1遺伝子に欠損変異を導入したNLuc遺伝子発現RVを作製したところ、培養細胞で10代継代後も安定してNLuc遺伝子が保持されていることが示された (図1)。また、外来遺伝子として、緑色蛍光蛋白質の一種であるZsGreen遺伝子を用いた場合でも同様の結果が得られ、外来遺伝子の種類を問わず応用できることが明らかとなった。これらのレポーター遺伝子発現RVでは、レポーター遺伝子は、NSP1のN末端27アミノ酸 (NSP1<sub>1-27</sub>) との融合タンパク質として発現されており、NSP1<sub>1-27</sub>配列が外来遺伝子の細胞内局在に影響することが明らかとなった (図2)。そこで、NSP1<sub>1-27</sub>配列の開始コドン (ATG) に変異 (ATG ATC) を加えた組換えRVの作製を試みたがウイルスは得られな

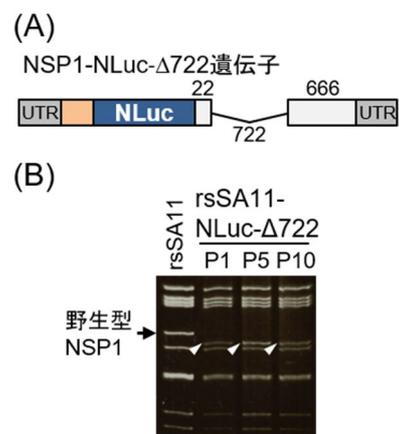


図1. (A) NSP1-NLucキメラ遺伝子、(B) NSP1領域に722塩基の欠損変異を加えたウイルスでは、継代後、外来遺伝子が安定的に保持された。

かった。NSP1 RNA の 2 次構造モデルから NSP1<sub>1-27</sub> 配列の開始コドンである ATG が 3' 末端付近に位置する C1556 と相互作用することが予測されたため、相補的な変異である C1556G 変異を導入したところ、ネイティブな ZsGreen を発現する組換え RV が得られた (図 2)。

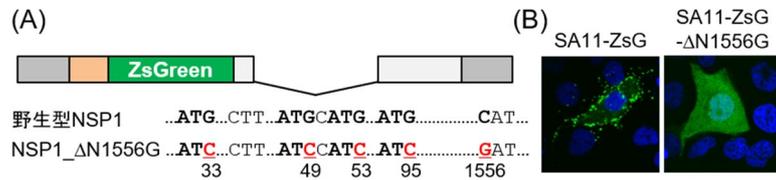


図2. (A) NSP1-ZsGreenキメラ遺伝子にG33C, G49C, G53C, G95C, C1556G変異を加えた。(B) 付加配列 (NSP1<sub>1-27</sub>) を除去したZsGreen遺伝子の発現が可能となった。

これらの成果により、NoV 抗原を発現する RV ベクターの開発基盤の構築に成功したと考えられる。

安定的に外来遺伝子を発現する RV ベクターシステムを用いて、NSP1 遺伝子に NoV-VP1 遺伝子 (G11.4) を挿入した組換え RV を作製した。VP1 に対する特異抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、RV/NoV-VP1 感染細胞において、十分量の NoV-VP1 の発現を確認することができた。RV/NoV-VP1 感染細胞から、密度勾配遠心法を用いて、VLP の精製を行った。その結果、陽性コントロールとして用いたバキュロウイルス発現系 (NoV-VP1 発現バキュロウイルス) により調整された試料で確認された NoV-VP1 由来 VLP フラクシオンと同様の位置にバンドが確認された。現在、電子顕微鏡解析により、VLP 粒子形成の確認を行っている。本成果は RV を粘膜ワクチンベクターとして用いる上で極めて有用と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanai Y, Kawagishi T, Sakai Y, Nouda R, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T.	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 Y, Kawagishi T, Matsuura Y, Kobayashi T.	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 J Virol	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 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 J Virol	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 Kanai Y, Kawagishi T, Nouda R, Onishi M, Pannacha P, Nurdin J, Nomura K, Matsuura Y, Kobayashi T.	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

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 ロタウイルス 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, 大西未沙, Nurdin Jeffry, 野村圭一郎, Tina Luciany, 山崎萌子, 小林剛
2. 発表標題 ロ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 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 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, Yusuke Sakai, 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、Nurdin 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2件

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	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
--	---------------------------	-----------------------	----