様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008 ～ 2009
課題番号：20790820
研究課題名（和文）　水痘帯状疱疹ウイルス次世代ワクチン開発の基礎研究

研究課題名（英文）　A basic study of next generate varicella zoster virus vaccine

研究代表者　伊東　秀記（ITO　HIDEKI）
東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：７０３６０１３８

研究成果の概要（和文）：
水痘－帯状疱疹ウイルスの ORF39 遺伝子は ウイルスの増殖に必須うであり、存在位置も ORF65 と ORF66 遺伝子間にある AvrII 部位への再導入させた結果、ウイルスの増殖を見ることはできなかった。この結果は、ORF39 は ORF38 および ORF40 に囲まれた状態でないとウイルスの生存に何らかの影響があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：
ORF39 gene of VZV is essential for replication of VZV. We tried to insert a unique AvrII site which is located between ORF65 and ORF66, however, no virus is replicated. We guess the location of VZV gene ORF39 is important for replication of VVZ.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００８年度	1,600,000	480,000	2,080,000
２００９年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：水痘、帯状疱疹、水痘帯状疱疹ワクチン、次世代ワクチン

１．研究開始当初の背景

水痘ワクチンの認可後、重症水痘患者の減少や症状の軽減化に成功したものの、このワクチンは神経節に潜伏感染を起こし、のちに帯状疱疹を発症する可能性もあることが示唆されている。また、ワクチン接種後も軽度ながら自然株の水痘ウイルスに感染し、水痘を発症することもある。そこで、このウイルスの遺伝子を解析し、重要な感染部位である皮膚、リンパ球、神経節での遺伝子の役割を検討し、より効果的な次世代ワクチンの開発の基礎研究を行う。

２．研究の目的

水痘帯状疱疹ウイルスは水痘および帯状疱疹の原因ウイルスある。現在使用されている弱毒生ワクチン（岡株）は水痘の予防や重症の水痘患者数の減少などの効果も認められてが、免疫不全の子供には水痘様症状が生じ、健常人にでも潜伏感染し、後に帯状疱疹を発症させる危険性がある。近年、このワクチンを用いた高齢者の帯状疱疹の予防効果に関して報告され、帯状疱疹の予防効果は 50%程度と発表された。水痘と同様、帯状疱疹についても、より安全性が高く効果的な次世代ワクチンの開発必要であると考えられている。このため、より安全で効率的な次世代水痘帯状疱疹ワクチンの開発のため、このウイルスが持つ遺伝子で、未知の遺伝子の機能解析を行う。

３．研究の方法

組織培養下でウイルスの複製および増殖に関する役割が不明な遺伝子について、その遺伝子の機能を以下の方法にて検討する。組換え操作の容易化のため、プラスミドベクターにサブクローニングする。プロモーターの範囲、両隣に位置との関係を顧慮した上で、目的遺伝子を欠損させる。適当な制限酵素サイトがない場合には制限酵素サイトを作成する。欠損遺伝子の範囲を確認後、ターゲット遺伝子がコードされているコスミベクターに同部位に組み込む。今回用いるコスミドベクターは Stanford 大学の研究グループにより作成された Fsp4, Spe5, Pme19 および Spe21 で、それぞれのコスミドは水痘帯状疱疹ウイルス遺伝子（岡株）の 1-33211, 21875-40134, 53877-96188 および 94208-124884 を Supercos vector 制限酵素 AscI 部位に組み込んだものである。細胞へ

の遺伝子導入効果を上げるため、リポフェクション法にてターゲット遺伝子を組替えたコスミドベクターを MW-115 細胞に導入する。遺伝子導入を行った MW-115 細胞は細胞変性効果が認められるまで継代する。細胞変性効果が認められた場合は感染細胞から全遺伝子を抽出し、遺伝子欠損を確認する。目的の遺伝子を欠損させたウイルスの作成が不可能な場合、欠損させた遺伝子を再度、Spe21 の ORF65 と ORF66 の遺伝子間に存在するユニークな制限酵素部位である AvrII 部位に組込み、必須で遺伝子の有無を再度、検討する。co-ransfection で欠損遺伝子の再現が不可能な場合は、ターゲット遺伝子を持続的に発現する細胞株を MW-115 細胞用いて作成し、同様に co-ransfection を行うことでウイルス増殖の必須遺伝子であることを証明する。また、ウイルスの増殖に必要な遺伝子であることが証明できれば、ヒト皮膚、胸腺、神経節移植 SCIDhu mouse を用い、それぞれでのウイルスの病原性を検討する。

４．研究成果

組織培養下でウイルスの複製および増殖に関する役割が不明な水痘－帯状疱疹ウイルス遺伝子ORF39について、その遺伝子の機能を以下の方法にて検討した。まず、目的遺伝子であるORF39 をこの領域をコードするヴクター内で欠損させ、ターゲット遺伝子がコードされているコスミベクターに同部位に組み込みこんだ。今回用いたコスミドベクターは Stanford 大学の研究グループにより作成された Fsp4, Spe5, Pme19 および Spe21で、それぞれのコスミドは水痘帯状疱疹ウイルス遺伝子（岡株）の 1-33211, 21875-40134, 53877-96188 および 94208-124884 を Supercos vector 制限酵素 AscI 部位に組み込んだものである。細胞への遺伝子導入効果を上げるため、リポフェクション法にてターゲット遺伝子を組替えたコスミドベクターを MW-115 細胞に導入した。遺伝子導入を行った MW-115 細胞は細胞変性効果が認められるまで継代したが細胞変性効果が認められたため、欠損させた遺伝子を再度、Spe21 の ORF65 と ORF66 の遺伝子間に存在するユニークな制限酵素部位である AvrII 部位に組込み、必須で遺伝子の有無を再度、検討した。また、ORF39 をAvrII 部位への再導入し正常な3 つのコスミドベクターとco-ransfection でさせた結果、細胞変性は認められず、ウイルスを得ることができなかった。この結果は、ORF39 はORF38 およびORF40 に囲まれた状態でないとウイルスの生存に何らかの影響があ

ることが示唆された。このことを証明するために、今後、ターゲット遺伝子を持続的に発現する細胞株を MW-115 細胞用いて作成し、同様にco-ransfection　を行うことでウイルス増殖の必須遺伝子であることを証明し、ORF39は水痘‐帯状疱疹ウイルスにとって必須な遺伝子であることを証明する。

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０件）

〔学会発表〕（計０件）

６．研究組織
(1)研究代表者
伊東　秀記（ITO　HIDEKI）
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：７０３６０１３８