

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580422

研究課題名(和文) デング熱・出血熱における次世代ワクチン開発戦略

研究課題名(英文) Development of next-generation dengue virus vaccine

研究代表者

小林 剛 (Kobayashi, Takeshi)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：90324847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：デングウイルス(DV)の新規DNAワクチン開発を目指して、DNA-based感染性cDNAクローンを構築し、培養細胞に導入した結果、導入24時間後で高力価のウイルス産生が認められた。さらに、DNA-based感染性cDNAクローンをもとに構造蛋白質領域をレポーター遺伝子に置換したレプリコンを作製した。より効率の高いリバースジェネティクス(RG)系の開発を目的に宿主相同組換え機構を利用したDV-1型の新規RG系の開発を行った。さらに、この系を応用し、DV-2型の構造蛋白質領域を含むキメラウイルスの作製にも成功した。これらの系の確立は新規DNAワクチン開発において、極めて有用なツールと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To develop a new DNA vaccine for dengue virus (DV) infection, we have constructed a plasmid-based infectious clone encoding full-length DV-1 cDNA under control of the minimum cytomegalovirus promoter. In our experiments, yields of WT virus 24 hours after plasmid transfection are regularly in the range of 100 to 1000 PFU/ml. Furthermore, DV-1 reporter replicon with luciferase was made by replacing part of the DV-1 structural gene region with the luciferase gene. To improve the reverse genetics for DV, we have developed a homologous recombination-based reverse genetics for DV. Furthermore, we have rescued a chimeric DV, which expresses the prM and E genes from DV type 2 in a DV type 1 genetic background. These improved infectious cDNA clone and reporter replicon systems described here can be employed for studies of the DV replication and pathogenesis and used to develop vaccines, diagnostics, and therapeutics.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用獣医学

キーワード：デングウイルス ワクチン

1. 研究開始当初の背景

デング熱・出血熱は、熱帯、亜熱帯地方を中心に流行している蚊媒介性フラビウイルス感染症である。全世界では年間約1億人がデング熱を発症すると推定される。日本国内ではデングウイルス(DV)の流行は認められない。しかし、DVの感染流行域は急速に広がっており、国内でもDVの常在・流行が懸念される。近年、森林型DV(蚊-サル-蚊の感染環)もヒトのデング熱・出血熱の流行に関与していることが報告され、医療・公衆衛生上の問題として注目を集めている。

DVに対する防御免疫は中和抗体が主体であり、同じ型のDVに対する免疫は終生持続すると考えられているが、異なる型に対する防御免疫は短期間で消失し、他の型に再感染しうる。重篤なデング出血熱は再感染時に発症する確率が高くなることが報告されている。初感染時に誘導された抗体の一部が、抗体依存性感染増強作用により標的細胞の感染を増強させることがデング出血熱の基盤と考えられている。抗体依存性感染増強作用によるウイルス増殖機構は、DVワクチンを開発する上で大きな障壁となっており、1~4型の血清型に対して同時に高い防御免疫を誘導可能な多価ワクチンの開発が極めて重要な戦略と考えられる。

2. 研究の目的

DVワクチン開発の現状として、各血清型に対する弱毒生ワクチンあるいは黄熱ワクチンにDV構造タンパク質を組み込んだキメラワクチン等を用いて、4価ワクチンを作製する試みがなされている。しかし、各血清型に対して期待されるレベルの防御免疫が誘導されないこと、抗体依存性感染増強作用によりデング出血熱の発症を誘発する可能性が危惧されている。一方で、主要抗原であるウイルス構造蛋白質(prM、E)を発現するDNAワクチンの開発も行われている。DNAワクチンは、副作用がなく、安全で大量に生産できることが利点であるが、防御免疫誘導能が低いことから、前臨床段階まで至っておらず、ウイルス増殖制御、免疫誘導能を強化するアプローチが求められている。

本研究課題では、DV感染症の制圧を目指し、Single-round感染性のウイルス粒子を産生する新規多価DNAワクチを開

発し、ワクチン効果を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 培養細胞

BHK細胞およびVero細胞は10%ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum、FBS)、2mM L-グルタミン、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを含むEagle's Minimum Essential Medium(EMEM)(Wako、Osaka、Japan)を用いて、37℃、CO₂濃度5%の条件下で培養した。

2) ウイルス株

実験にはDV1型02-20株およびDV2型16681株を用いた。ウイルスストックの作製は以下の手順で行った。Vero細胞2×10⁶ cellsを75 cm² フラスコに播種し、37℃、CO₂濃度5%存在下で培養した。培養24時間後に培養液を除き、EMEMで希釈したウイルス液100 µlを接種した。接種2日後にウイルス感染細胞の培養上清を全量回収してウイルスストックを得た。ウイルスストックは分注して-80℃で保存し、ウイルス感染力価はプラークアッセイ法により決定した。

3) プラスミドの構築

DV1型のDNA-based感染性cDNAクローンはRNA-based感染性cDNAクローンであるD1(02-20)/pMW119をベースに構築した。具体的にはサイトメガロウイルス由来プロモーター配列をT3 RNAポリメラーゼプロモーター配列と置換し、DV1型02-20ゲノム3'末端にリボザイム、ポリA付加シグナル配列を付加した感染性cDNAクローンを構築した。DV1型レポーターレプリコンについては、DV1型DNA-based感染性cDNAクローンの構造蛋白質コード領域をFMDV 2A配列を付加したレポーター遺伝子(DGL-1)、またはレポーター遺伝子およびIRESと置換した(DGL-2)レプリコンを構築した。レポーター遺伝子として分泌型ルシフェラーゼGaussia Luciferase遺伝子を用いた。それぞれのレプリコンについてポリメラーゼ活性中心に変異を導入したレプリコンも同様に作製し、レプリコンの複製を評価した。DGL2に関して、DV RNA複製阻害活性があるといわれているリバビリンを添加し、レプリコンの複製を解析した。宿主相同組換え機構を利用した新規のリバースジェネティクス系の構築については、prM-E PCR断片および5'、3'両末端でDV1型またはDV2型由来prM-E PCR断片とそれぞれ重複領域をもつようにDV1型DNA-based感

染性 cDNA クローンを鋳型として 2 つの DV1 型 5' および 3' 領域をコードする PCR 断片を増幅し、解析に使用した。

4) DNA トランスフェクション

BHK 細胞 1.6×10^6 cells/well を 6 well プレートに播き 37 °C、CO₂ 濃度 5% の条件下で 14 時間培養した。プラスミド DNA は 2 μg 使用し、100 μl の Opti-MEM™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) と 6 μl の X-tremeGENE HP (Roche Diagonostic Corporation, Basel, Switzerland) と混合し 15 分間静置した。静置後、混合液を培養液に加え 37 °C、CO₂ 濃度 5% 存在下で培養した。

4. 研究成果

1) DV における DNA-based リバースジェネティクス系の開発

DV のリバースジェネティクス系では、in vitro で合成したウイルス RNA を細胞内に導入することにより組換えウイルスの作出を行う系 (RNA-based system) が広く使われている。新規 DNA ワクチン開発に必須の基盤技術として、細胞内にウイルス cDNA を直接導入することにより、効率の高い組換えウイルスの作出が可能な DNA-based リバースジェネティクス系の開発を行った。サイトメガロウイルス由来プロモーターおよび D 型肝炎ウイルス由来リボザイム配列の間に DV1 型全長 cDNA を配置したコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトを培養細胞にトランスフェクションした結果、24 時間後に組換えウイルスの産生が認められた (図 1)。

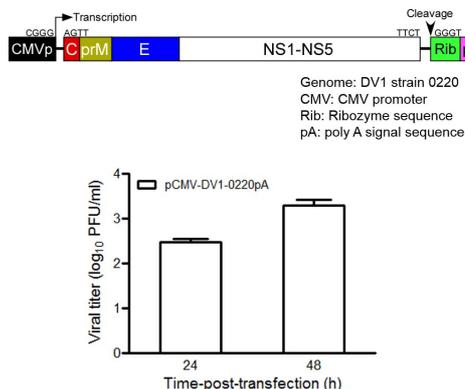


図1 Plasmid-Based Reverse Genetics for DV

2) DV における DNA-based リバースジェネティクス系を応用したレプリコンシステムの開発

新規 DNA ワクチン開発の基盤技術として、細胞内にウイルス cDNA を直接導入することにより、効率の高い組換えウイルスの作出が可能

な DNA-based リバースジェネティクス系を用いた Single-round 感染性ウイルス粒子産生系の開発は必須である。構造蛋白質領域 (C, prM, E) をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) に置換した DNA-based DV レプリコンシステムの開発を行った。バイシストロニック発現のため、レポーター遺伝子に FMDV 2A 配列または IRES 配列を付加したレプリコンを構築した。IRES 配列を付加したレプリコンを導入した培養細胞では 2A 配列を付加したレプリコンより安定したルシフェラーゼ発現が認められた (図 2)。

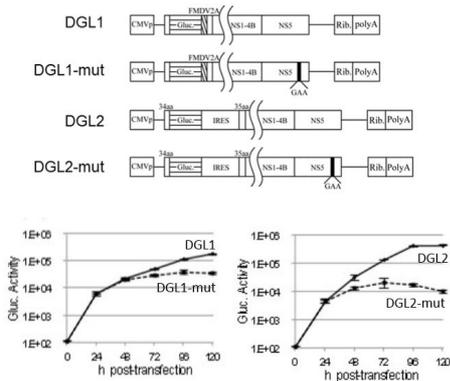


図2 Gaussia luciferase activity of DNA-based replicons in BHK-21

次に、抗 DV 薬剤スクリーニングにおいての有用を検討するため、DV 増殖阻害効果が知られているリバビリンを用いて、リバビリン存在下でのレプリコンのレポーター活性を測定した。その結果、レポーター活性は、Ribavirin 濃度依存的に低下した (図 3)。以上の結果、新規 DV レプリコンは抗 DV 薬剤のスクリーニングに有用であることが示唆された。また、新規 DNA ワクチン候補となる Single-round 感染性ウイルス粒子産生システムの開発のため、DNA-based リバースジェネティクス系を応用したレプリコンシステムは粒子産生の条件検討等にも有用と考えられる。

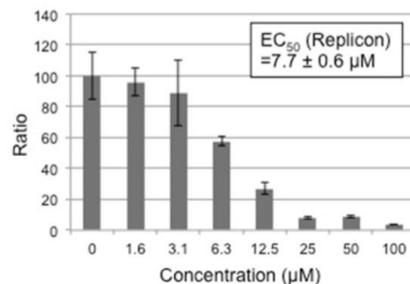


図3 Effects of Ribavirin against DNA-based replicon

3) フラビウイルスにおける宿主相同組換え機構を利用した新規リバースジェネティクス系の開発

先行研究で開発に成功した DV と同属である ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) の DNA-based

感染性cDNAクローンを用いて、宿主の相同組換え機構を応用した新規のリバースジェネティクス系の確立を試みた。TBEV DNA-based感染性cDNAクローンを鋳型に全長をカバーするように両末端に各々隣接する領域に対して重複領域を含む3断片のフラグメントを増幅した。増幅したフラグメントを培養細胞にコトランスフェクションした結果、24時間後に～1000 PFU/mlのウイルス価が得られた。

次いで、ダニ媒介性脳炎ウイルスで開発に成功した宿主相同組換え機構を利用した新規リバースジェネティクス系をDVに応用した。DV1型 DNA-based感染性cDNAクローンを鋳型に全長をカバーするように両末端に各々隣接する領域に対して重複領域を含む断片のフラグメントを増幅した。増幅したフラグメントを培養細胞にコトランスフェクションした結果、24時間後に感染性ウイルスが得られた(図4)。

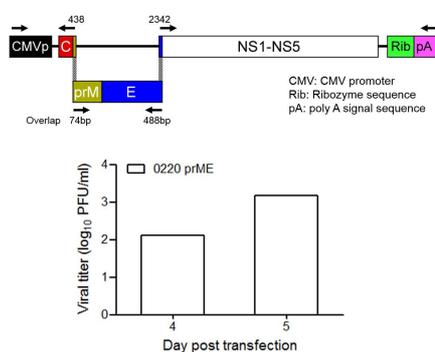


図4 Reverse Genetics Based on Homologous Recombination

さらに、DV1型をバックボーンとして2型の構造蛋白質を持つキメラウイルスの作出を試みた結果、キメラウイルスの作出に成功した(図5)。宿主相同組換え機構を利用した新規リバースジェネティクス系はDV1型をバックボーンとし、他のDV型の構造蛋白質領域とのSingle-round感染性ウイルス粒子産生システムの効率の良い粒子産生条件の検討に有用と考えられる。

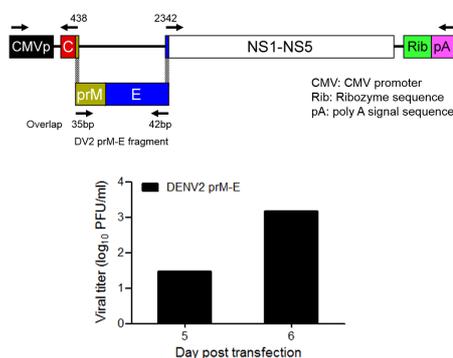


図5 Rescue of DV2 prM-E Chimeric Mutant

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 14件)

Yamanaka A., Iwakiri A., Yoshikawa T., Sakai K., Harpal S., Himeji D., Kikuchi I., Ueda A., Yamamoto S., Miura M., Shioyama Y., Kawano K., Nagaishi T., Saito M., Minomo M., Iwamoto N., Hidaka Y., Sohma H., Kobayashi T., Kanai Y., Kawagishi T., Nagata N., Fukushi S., Mizutani T., Tani H., Taniguchi S., Fukuma A., Shimojima M., Kurane I., Kageyama T., Odagiri T., Saijo M., and Morikawa S. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species Nelson Bay orthoreovirus. *PLoS One* 9:e92777. (2014). 査読有

Komoto S., Kawagishi T., Kobayashi T., Ikizler M., Iskarpatyoti J., Dermody T. S., and Taniguchi K. A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase. *J. Virol. Methods* 196:36-39. (2014). 査読有

Boehme K. W., Hammer K., Tollefson W. C., Konopka-Anstadt J. L., Kobayashi T., and Dermody T. S. Nonstructural Protein σ 1s Mediates Reovirus-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *J. Virol.* 87:12967-12979. (2013). 査読有

Kato F., Ishida Y., Kawagishi T., Kobayashi T., Hishiki T., Miura T., and Igarashi T. Natural infection of cynomolgus monkeys with dengue virus occurs in epidemic cycles in the Philippines. *J. Gen. Virol.* 94:2202-2207. (2013). 査読有

Shojima T., Hoshino S., Abe M., Yasuda J., Shogen H., Kobayashi T., and Miyazawa T. Construction and characterization of an infectious molecular clone of Koala retrovirus. *J. Virol.* 87:5081-5088. (2013). 査読有

Fujita Y, Otsuki H., Watanabe Y., Yasui M., Kobayashi T., Miura T., and Igarashi T.. Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying env from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology* 436:100-111. (2013). 査読有

Nakaya Y, Shimode S., Kobayashi T., Imakawa K., and Miyazawa T. Binding of transcription factor activating protein 2 γ on the 5'-proximal promoter region of human porcine endogenous retrovirus subgroup A receptor 2/GPR172B. *Xenotransplantation*

19:177-185. (2012). 査読有
Shimode S, Yoshikawa R., Hoshino S., Nakaya Y., Sakaguchi S., Kobayashi T., and Miyazawa T. Sequence comparison of three infectious molecular clones of RD-114 virus. *Virus Genes* 45:393-397. (2012). 査読有
Yoshikawa R, Yasuda J., Kobayashi T., and Miyazawa T. Canine ASCT1 and ASCT2 are functional receptors for RD-114 virus in dogs. *J. Gen. Virol.* 93: 603-607. (2012). 査読有
Shimode S, Miyazawa T., Kobayashi T., Sato H., and Tanabe T. Identification and characterization of feline UBE1L gene. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 235-239. (2012). 査読有
Horiike M., Iwami S., Sato A., Watanabe Y., Yasui M., Kobayashi T., Miura T., and Igarashi T. Lymphatic tissues harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology* 423: 107-118. (2012). 査読有
Boehme K. W., Frierson J. M., Konopka J. L., Kobayashi T., and Dermody T. S. The reovirus $\sigma 1s$ protein is a determinant of hematogenous but not neural viral dissemination in mice. *J. Virol.* 85: 11781-11790. (2011). 査読有
Boehme K. W., Ikizler M., Kobayashi T., and Dermody T. S. Reverse genetics for mammalian reovirus. *Methods* 55: 109-113. (2011). 査読有
Reiter D. M., Frierson J. M., Halvorson E. E., Kobayashi T., Dermody T. S., and Stehle T. Crystal structure of reovirus attachment protein signal in complex with sialylated oligosacchrides. *PLoS Pathogen* 7:e1002166. (2011). 査読有

〔学会発表〕(計 13件)

加藤文博他、分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を有するデングウイルス 1 型レプリコンの構築、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
石田祐樹他、フィリピンカニクイザルにおけるデングウイルス自然感染、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
星野重樹他、コアラレトロウイルス内在化機序の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13～15 日、大阪
仲屋友喜他、ウシ内在性レトロウイルス-K1 の獲得によるウシ科動物の進化、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13～15 日、大阪
川岸崇裕他、シベリア型ダニ媒介性脳炎ウイルス IR99-2f7 株の感染性 cDNA クロ

ーンの構築、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13～15 日、大阪
加藤文博他、抗デングウイルス活性を有する化合物の探索および作用機序の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13～15 日、大阪
大附寛幸他、中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザルモデルの開発、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13～15 日、大阪
大附寛幸他、中和抵抗性のサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と in vitro における立体構造変化誘導剤による中和感受性増強効果の評価、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日、東京
日向亮輔他、フラビウイルスにおける宿主 DNA 修復機構を用いた新規リパースジェネティクス系の開発、第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2011 年 11 月 11 日、東京
川岸崇裕他、ダニ媒介性脳炎ウイルス IR99 株の感染性 cDNA クロンの構築、第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2011 年 11 月 11 日、東京
加藤文博他、抗デングウイルス活性を有する薬剤の探索、第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2011 年 11 月 11 日、東京
仲屋友喜他、ウシ内在性レトロウイルス K1 エンベロープタンパクの開裂に重要な領域の探索、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 19～21 日、大阪
川岸崇裕他、新規相同組換え技術による組換えダニ媒介性脳炎ウイルスの構築、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 19～21 日、大阪

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/viral-replication/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI Takeshi)
大阪大学 微生物病研究所 特任准教授
研究者番号：90324847