

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790516

研究課題名(和文) ラッサウイルスに対する非増殖型の新規組換えウイルスワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of recombinant vaccine for lassa fever using replication-incompetent rabies viral vector.

研究代表者

伊藤 睦代(高山睦代)(Ito-Takayama, Mutsuyo)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：70392313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：致死的な出血熱であるラッサ熱にはいまだ有効なワクチンがない。本研究では安全性が高く、細胞性免疫を強く惹起する非増殖性ラドウイルスベクターが有効な手段となりうるかについて、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)のモデル系を用いて個体レベルの解析を行った。確立済みのP遺伝子欠損非増殖型狂犬病ウイルスベクターの系を用いて、LCMVの主要抗原遺伝子GPCを発現する組換えウイルス P-GPCを作出した。P-GPCがGPCを発現していることを蛍光抗体法およびウェスタンブロッティングにより確認した。マウスを用いた致死感染防御試験において、P-GPCは80%の防御効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Lassa fever is an acute viral illness, and there is no effective vaccine candidate available. It has been reported that cellular immunity plays the major roles in the prevention against lassa fever. Replication-incompetent live viral vaccine would be a promising vaccine candidate for lassa fever. To evaluate the immunogenicity of the replication-incompetent rhabdovirus vector for vaccine against lassa fever, we newly generated the recombinant rabies virus, delta-P-GPC strain, which lacks rabies P gene and possesses lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) GPC gene in its genome. We confirmed the GPC protein expression in delta-P-GPC strain infected rabies P protein expressing BHK cells by immunofluorescence assay and western blot. 80% of mice immunized twice with delta-P-GPC by i.m. and i.p. route, survived against lethal challenge with LCMV WE strain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：ウイルスベクター ワクチン アレナウイルス感染症

## 1. 研究開始当初の背景

致死的な出血熱であるラッサ熱にはいまだ有効なワクチンがない。さらにその感染防御には液性免疫ではなく細胞性免疫が非常に重要である事が分かっている。しかし、病原性復帰の問題から弱毒生ワクチンの適用は難しい。一方、本研究室ではこれまで増殖に必須である P 蛋白質を欠損した非増殖型狂犬病ウイルスベクターの系を確立している。本ベクター系は安全性が高く、且つ細胞性免疫を強く惹起することが知られている。

## 2. 研究の目的

非増殖性ラブドウイルスベクターが有効な手段となりうるかについて、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) のモデル系を用いて個体レベルの解析を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

1. LCMV の GPC を発現する非増殖型組換え狂犬病ウイルスの作製: LCMV の主要抗原遺伝子である GPC を PCR により増幅し、P 遺伝子欠損ウイルスベクターのフルゲノムプラスミド pHEP- P のクローニングサイト (N 遺伝子の直下) に挿入したプラスミド p P-GPC を作製した。この p P-GPC とともにウイルスの増殖・複製に必要な狂犬病ウイルスの N, P, L および G 蛋白質を供給する各ヘルパープラスミドを狂犬病ウイルスの P 蛋白質を恒常に発現する BHK 細胞 (BHK-P 細胞) に TransIT-LT1 (TaKaRa) を用いてトランスフェクトし、常法に従って LCMV の GPC を発現する非増殖型組換え狂犬病ウイルス P-GPC の作出を試みた。ネガティブコントロールとして用いるため、挿入遺伝子を持たない P 遺伝子欠損ウイルス P の作出を

行った。トランスフェクション後の培養上清を新しい BHK-P 細胞に数代継代し、培養細胞を 80% アセトンにて固定した後、FITC 標識抗狂犬病ウイルス N 蛋白質抗体 Anti Rabies monoclonal globulin (FUJIREBIO) を用いて狂犬病ウイルス抗原の検出を行った。同時に上清を用いて RNA 抽出を行い、GPC 挿入部を増幅する RT-PCR により、遺伝子構造の確認を行った。

2. ウェスタンブロッティングによる培養細胞での目的蛋白質発現確認: 組換えウイルス P-GPC および P を m.o.i.=1 で BHK-P 細胞に接種し、3 日間 35°C にて培養した。培養細胞での GPC の発現をウェスタンブロッティングにより確認した。上清を除き PBS (-) で 2 回洗浄した細胞をサンプルバッファーにて溶解し、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行った。ポジティブコントロールとして、HEK293 細胞に発現プラスミド (感染症研究所谷口怜先生より分与) を Transfection し、37°C で 48Hr 培養したもの、および Vero 細胞に LCMV を m.o.i.=0.1 にて接種し、37°C で 48Hr 培養したものを同様にサンプルバッファーにて処理して用いた。一次抗体として LCMV の GPC に対する単クローン抗体 KL-25 (ジュネーヴ大学 Pinschewer 教授より分与) を二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG を用いて GPC の検出を試みた。検出には SuperSignal West Femto (Thermo Scientific) を使用した。検出バンド Image Reader (FUJIFILM) により数値化し、 $\beta$  アクチンで補正後発現量の比較を行った。

3. 蛍光抗体法による P-GPC 感染培養細胞での目的蛋白質発現確認: 組換え

ウイルス P-GPC および P を m.o.i.=0.1 で BHK-P 細胞に接種し、33°C にて 2 日間培養した。上清を除き 80%アセトンを用いて紫外線照射下で 20 分間固定した。LCMV の GPC を単クローン抗体 KL-25 および Dylight594 標識抗マウス IgG 抗体を用いて、狂犬病ウイルスを FITC 標識抗狂犬病ウイルス N 蛋白質抗体 Anti Rabies monoclonal globulin (FUJIREBIO) を用いて二重染色を行い、倒立顕微鏡 (OLYMPUS) で観察した。

4. 非増殖型組換えウイルスの培養細胞での性状解析：組換えウイルス P-GPC および P を m.o.i.=0.01 で BHK-P 細胞に接種し、35°C にて培養した。経時的に上清を回収し、ウイルス力価を BHK-P 細胞を用いたフォーカスアッセイにより算出した。
5. 非増殖型組換えウイルスの高力価ウイルスストックの作製：組換えウイルス P-GPC および P を m.o.i.=0.01 で BHK-P 細胞に接種し、35°C にて 6 日間培養した。培養上清を回収し、新しい培養液を加えさらに 6 日間培養後の上清を回収した。回収した培養上清を 0.45 $\mu$ l のボトルトップフィルターでろ過したものに、ポリエチレングリコール (PEG) を加えて 4°C にて 1 晩転倒混和した。4°C にて 2,900 $\times$ g、30 分遠心して沈澱を回収した。その後 60% と 20% のスクロース液を用いて 4°C にて 2,500 $\times$ g、90 分超遠心を行った。ウイルスバンドを回収し、限界ろ過により濃縮・精製を行った。精製ウイルスの力価をフォーカスアッセイにより測定した。
6. マウスを用いた防御試験：LCMV モデル系では強毒株である WE 株を用いたマウスでの感染防御試験が可能であ

る。5 週齢の C57BL/6j マウスに 10<sup>6</sup> ffu/匹の P-GPC を 1 週間間隔で 2 回筋肉内または腹腔内接種し、その 1 週間後に強毒の WE 株を 300 LD<sub>50</sub> (10 pfu) 脳内接種した。陰性対照として empty の P を用いた。2 週間の観察を行い、その防御効果を比較した。

#### 4. 研究成果

1. フルゲノムプラスミド p P-GPC を用いてリバースジェネティクスを行い、3 回継代後の細胞において狂犬病ウイルス抗原を確認できた。p P を用いた場合 1 回継代後の細胞においてウイルス抗原を確認できた。3 回継代後の細胞の培養上清を用いて行った RT-PCR の結果予想された分子量の遺伝子断片の増幅が確認された。
2. 作出された組換えウイルス P-GPC 接種細胞において GPC 一過性発現細胞および LCMV 感染細胞 GPC と同一の分子量のバンドが確認された。陰性対照の P および mock 感染 BHK-P 細胞では GPC 特異的バンドは確認されなかった。発現量の解析の結果、P-GPC 感染細胞における GPC 発現量は発現プラスミド導入細胞および LCMV 感染細胞に比べそれぞれ約 2.5 および 11 倍低かった。
3. P-GPC 接種 BHK-P 細胞では、狂犬病ウイルス抗原発現細胞において GPC が検出された。陰性対照の P 接種 BHK-P 細胞では、狂犬病ウイルス抗原のみが検出された。蛍光抗体法の染色像では、狂犬病ウイルス N 蛋白質の抗原が細胞質に見られたのに対し、GPC は細胞膜表面が強く染まる傾向があった。
4. BHK-P 細胞での P-GPC の増殖は P のそれと比べ若干低く 10<sup>5</sup> ~ 10<sup>6</sup> 程度であり、P-GPC の培養細胞での増殖は

P と比較して若干低かった。この理由としては GPC を挿入したことで、それより後ろのウイルス蛋白質の発現が落ちたため、もしくは GPC が細胞膜状に発現することにより、ウイルスの出芽効率に何らかの影響を与えたためと考えられる。

5.  $2.3 \times 10^5$  ffu/ml のウイルス液 1.7 L を精製・濃縮し、 $2.5 \times 10^7$  ffu/ml の精製 P-GPC ウイルス液約 3 ml を得た。

6. マウスを用いた防御試験において、筋肉内接種した群では、P 接種群が全頭死亡したのに対し、P-GPC 接種群は 5 匹中 4 匹が生残した。腹腔内接種群においては、P 接種群では、3 匹中 1 匹のみが生残したのに対して、P-GPC 接種群は 5 匹中 4 匹が生残した。どちらにおいても約 80% の防御効果が確認できた。

今後接種ルート、接種量、接種間隔等についてさらに検討をするとともに、免疫後のマウスの中和抗体価や免疫反応についても解析していく予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

伊藤(高山)睦代、林 昌宏、森本金次郎、垣内五月、山口幸恵、堀谷まどか、西條政幸: ラッサウイルスなどのアレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの開発, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月

西條政幸, 伊藤(高山)睦代, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 林 昌宏

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に

対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 伊藤睦代(高山睦代)  
国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究者番号: 70392313