

令和元年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26252048

研究課題名(和文) 制限増殖性ウイルスを基盤とする動物難治性疾患の統括的制御

研究課題名(英文) Prevention of refractory diseases in animals by novel strategies based on replication-incompetent recombinant viruses

研究代表者

堀本 泰介 (HORIMOTO, TAISUKE)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：00222282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、(1) 1回感染型非増殖性ウイルスのインフルエンザワクチンへの応用、(2) 犬の腫瘍を対象とした制限増殖型腫瘍溶解性アデノウイルスについて検討した。(1)では、複数のHA亜型に対応する混合ワクチンの作製に必要なH1～H15を恒常発現するMDCK細胞を樹立し、一部の1回感染型非増殖性ウイルスをリバースジェネティクス法により作出した。(2)では、コウモリアデノウイルスが犬の腫瘍溶解性ウイルスのベースとして応用できることを明らかにし、細胞人工染色体を用いたリバースジェネティクス法を確立し、初期遺伝子E1A/Bを欠損する制限増殖性ウイルスを作出し、その強い犬腫瘍細胞障害性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥インフルエンザを防御するための1回感染型非増殖性ウイルスの構築、さらにp10分子等を同時に発現するワクチン候補ウイルスの構築は、本研究グループ以外では例がない。複数のHA亜型に対応できる多価ワクチンの構築は、新興性インフルエンザに対応できる独創的な戦略であり、本研究は今後の展開に貢献する。一方、腫瘍細胞特異的に増殖する非病原性アデノウイルスを構築し、犬の抗ガン療法としての実用化を目指すのは国内では初めての戦略である。今回明らかになったコウモリアデノウイルスをベースとする腫瘍溶解性ウイルスの応用性は今後の研究に貢献する。

研究成果の概要(英文)：This study includes (1) “Generation of replication-incompetent virus vaccines against influenza”, and (2) “Anti-tumor therapy using oncolytic adenoviruses in dogs. First, we successfully established MDCK cells stably expressing each HA (H1-H15), which were required to generate replication-incompetent recombinant viruses with each HA. Actually, we generated a couple of such viruses and found their immunogenicity. Second, we established adenovirus reverse genetics system based on bacterial artificial chromosome and successfully generated a bat adenovirus-recombinant virus with E1A/B deletion to assess its anti-tumor effect as an oncolytic adenovirus, which targeted dog tumors.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な感染症の脅威は人にとどまらず、特に産業動物の生産性に影響し、多大な経済的損失を与える。越境性人獣共通感染性インフルエンザの制御は困難である。出現から20年、高病原性H5N1鳥インフルエンザは未だ制御できない。抗インフルエンザ薬は耐性ウイルスが出現すると無策である。人類の脅威となる新型インフルエンザは全て動物を起源とする。つまり、動物ウイルスの制御がインフルエンザ制御には最も重要である。しかし、感染摘発を困難にする不活化ワクチンの存在意義は低い。このままでは鳥インフルエンザの制御は永遠に不可能であり、何らかの打開策が必要である。

(2) 腫瘍は人の死因第一位を占めており、食生活や生活環境が人に依存する家庭動物でも同様である。例えば、10歳の犬では6頭に1頭が腫瘍疾患を発症している。動物における腫瘍の治療法は、手術的切除、薬剤・放射線治療である。人体用の抗ガン剤が動物にも適応されるが動物に効果的であるかは不明であり、副作用も懸念される。家庭動物への適用に特化した新しい抗ガン療法が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、「制限増殖性ウイルスを基盤とする動物難治性疾患の統括的制御」という題目で二つの柱で構成される。

(1) 新興性インフルエンザに対する新しい制御策として、1回感染型非増殖性ウイルスのインフルエンザワクチンへの応用を検討する。

(2) 家庭動物に見られる腫瘍性疾患に対する革新的な治療法として、犬アデノ改変ウイルスを基盤とする制限増殖型腫瘍溶解性ウイルスによる抗ガン治療への応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 新規の動物インフルエンザワクチン候補として、コンストラクトの異なる複数の1回感染型非増殖性ウイルスをリバースジェネティクス法により創出する。ワクチン汎用性の賦与を念頭に、抗原増強因子や複数のHA亜型の搭載を試行する。複数のHA亜型を混合したワクチンの効率のよい作製方法を最適化(培養条件の検討など)する。

(2) 次世代の革新的抗ガン治療法を目指し、腫瘍細胞のみで特異的に増殖し、それを排除する制限増殖型腫瘍溶解性アデノウイルスを構築する。構築法として、腫瘍抑制遺伝子が欠損する腫瘍細胞のみで増殖するE1A/E1B領域等の欠損変異ウイルスについて検討する。各種培養ガン細胞での溶解性と犬腫瘍移植マウスモデルでの腫瘍縮小効果を検証する。

4. 研究成果

(1) ワクチンのベースとなるPR8株(H1N1)を用いて、NS1欠損NS分節とNS2欠損NS分節を構築し、リバースジェネティクスによりNS部分欠損非増殖性ウイルスをレスキューした。これにワクチン対象となる各亜型のHAを搭載する計画であったが、このウイルスは培養細胞での増殖性が予想より極めて低いことが判明し、そのインフルエンザワクチンとしての応用は困難であると判断した。

(2) 非開裂性HAをベースとする一回感染性非増殖性ウイルスの構築に計画をシフトした。まず、このウイルスをワクチンとして使用する力価レベルまで増幅するために必要なHA恒常発現細胞を作製した。H1~H15ウイルスの各HA遺伝子をクローニングし、全亜型のHA恒常発現MDCK細胞の樹立に成功した。これを利用することで複数のHA亜型に対応できるワクチン候補株の作製が可能になった。

- (3) 理論上、一回感染性非増殖性ウイルスの誘導する防御抗原量は生ワクチンウイルスより低い。そこで感染単位当たりのウイルス抗原量を増やすという方法として、レオウイルス (Nelson Bay virus) 膜融合タンパク質p10の利用を考え、p10を発現する組換えウイルスを作製した。このウイルスを細胞に感染させると感染細胞当たりのM1タンパク質量の有意な増加が認められた。この結果は、p10搭載ウイルスの新規のインフルエンザワクチンへの応用性を示すものである。
- (4) レスキューに成功したレオウイルスp10タンパク質を発現する組換えウイルスのワクチンとしての可能性を検証するために、マウスに接種し抗体応答が増強するかを評価した。対照として野生型ウイルスの抗体応答と比較したものの、有意な差はみられなかった。したがって、p10発現組み換えウイルスをベースとし1回感染型非増殖性ウイルスの構築は行わなかった。
- (5) 腫瘍溶解性ウイルスのベースとなる犬アデノウイルス国内分離研究室株CAV-1 (D43株) およびCAV-2 (A2株) のウイルスゲノムを抽出し、全長ゲノムの細菌人工染色体 (BAC) へのクローニングに成功した。これをベースにGFP発現ウイルス (E1A/B欠損ウイルス) のレスキューに成功した。しかし、このウイルスは犬の正常細胞でも増殖することが判明し、腫瘍溶解性ウイルスとしては改善の余地が残された。
- (6) 腫瘍溶解性アデノウイルスの犬体内での増殖が抑制される要因は、家庭犬が接種している犬アデノウイルスワクチンに起因する特異抗体の存在である。最近、当研究室でわが国の野生コウモリから分離したコウモリアデノウイルスの遺伝子配列が犬アデノウイルスと最も相同性が高いことに注目し、その腫瘍溶解性ウイルスへの応用を考えた。まず、犬アデノウイルスに対する抗血清を用いて、コウモリアデノウイルスが中和されるかを調べたところ中和されなかった。
- (7) 次に、コウモリアデノウイルスの各種犬腫瘍由来の培養細胞での増殖性を調べた結果、犬アデノウイルスに匹敵する細胞障害性を示した。そこで、ヌードマウスを用いた犬乳腺腫瘍細胞を接種する腫瘍移植モデルにより、その抗腫瘍効果を調べたところ、犬アデノウイルス同様に、コウモリアデノウイルスは有意に腫瘍の増生を抑制できることがわかった。その効果は犬アデノウイルスを用いた場合に匹敵した。
- (8) コウモリアデノウイルスを用いた制限増殖型腫瘍溶解性ウイルスの構築に応用できる可能性が示されたので、組換えウイルス作製のため、コウモリアデノウイルスのゲノム全長を組み込んだ細菌人工染色体BACベクターを用いたリバースジェネティクス系を確立した。このシステムでレスキューした組換えウイルスは、それぞれ野生型ウイルスと同様な細胞増殖性を示した。今後、このシステムを腫瘍溶解性の制限増殖型アデノウイルスの構築に応用する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Sumiho Nakatsu, Shin Murakami, Keiko Shindo, Taisuke Horimoto, Hiroshi Sagara, Takeshi Noda, Yoshihiro Kawaoka, Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes, Journal of Virology, 査読有、92、2018、e02084-17
DOI:10.1128/JVI.02084-17

Satoshi Taniguchi, Ken Maeda, Taisuke Horimoto, Joseph S Masangkay, Roberto Puentespina Jr, James Alvarez, Eduardo Eres, Edison Cosico, Noriyo Nagata, Kazutaka Egawa, Harpal Singh, Aiko Fukuma, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Shuetsu Fukushi, Shinobu Tsuchiaka, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Mizutani, Yumi Une, Yasuhiro Yoshikawa, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Shigeru Kyuwa, First

isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. Archives of Virology、査読有、162、2017、1529-1539

DOI: 10.1007/s00705-017-3251-2

Akiko Takenaka-Uema, Norasuthi Bangphoomi, Chieko Shioda, Kazuyuki Uchida, Fumihiro Gen, Kentaro Kato, Takeshi Haga, Shin Murakami, Hiroomi Akashi, Taisuke Horimoto, Characterization of a recombinant Akabane mutant virus with knockout of a nonstructural protein NSs in a pregnant goat model, Virologica Sinica、査読有、31、2016、274-277

DOI:10.1007/s12250-015-3704-2

Hiroshi Shimoda, Dung Van Nguyen, Kenzo Yonemitsu, Shohei Minami, Nao Nagata, Nanami Hara, Ryusei Kuwata, Shin Murakami, Yuuji Kodera, Tsutomu Takeda, Yasuhiro Yoshikawa, Taisuke Horimoto, Ken Maeda, Influenza A virus infection in Japanese wild boars (*Sus scrofa leucomystax*), Journal of Veterinary Medical Science、査読有、79、2017、848-851

DOI:10.1292/jvms.17-0052

Akiko Takenaka-Uema, Keita Sugiura, Norasuthi Bangphoomi, Chieko Shioda, Kazuyuki Uchida, Kentaro Kato, Takeshi Haga, Shin Murakami, Hiroomi Akashi, Taisuke Horimoto, Development of an improved reverse genetics system for Akabane bunyavirus, Journal of Virological Methods、査読有、232、2016、16-20

DOI:10.1016/j.jviromet.2015.12.014

Taisuke Horimoto, Takahiro Hiono, Hirohisa Mekata, Tomoha Odagiri, Tomoya Kobayashi, Junzo Norimine, Yasuo Inoshima, Hirokazu Hikono, Kenji Murakami, Reichi Sato, Hironobu Murakami, Masahiro Sakaguchi, Kazunori Ishii, Takaaki Ando, Kounosuke Otomaru, Makoto Ozawa, Yoshihiro Sakoda, Shin Murakami, Nationwide distribution of bovine influenza D virus infection in Japan, PLoS One、査読有、11、2016、e0163828

DOI:10.1371/journal.pone.0163828

Yukari Ishihara, Chieko Shioda, Norasuthi Bangphoomi, Keita Sugiura, Kosuke Saeki, Shunji Tsuda, Tatsuya Iwanaga, Akiko Takenaka-Uema, Kentaro Kato, Shin Murakami, Kazuyuki Uchida, Hiroomi Akashi, Taisuke Horimoto, Akabane virus nonstructural protein NSm regulates viral growth and pathogenicity in a mouse model, Journal of Veterinary Medical Science、査読有、79、2016、1391-1397

DOI:10.1292/jvms.16-0140

Shin Murakami, Mayumi Endoh, Tomoya Kobayashi, Akiko Takenaka-Uema, James K Chambers, Kazuyuki Uchida, Masugi Nishihara, Ben Hause, Taisuke Horimoto, Influenza D virus infection in herd of cattle, Japan, Emerging Infectious Diseases、査読有、22、2016、1517-1519、

DOI:10.3201/eid2208.160362

Akiko Takenaka-Uema, Yousuke Murata, Fumihiro Gen, Yukari Ishihara-Saeki, Ken-ichi Watanabe, Kazuyuki Uchida, Kentaro Kato, Shin Murakami, Takeshi Haga, Hiroomi Akashi, Taisuke Horimoto, Generation of a recombinant Akabane virus expressing enhanced green fluorescent protein, Journal of Virology、査読有、189、2015、9477-9484

DOI:10.1128/JVI.00681-15

Hiroaki Katsura, Zhenyu Piao, Kiyoko Iwatsuki-Horimoto, Yukihiko Akeda, Shinji Watanabe, Taisuke Horimoto, Kazunori Oishi, Yoshihiro Kawaoka, A bivalent vaccine based on a

replication-incompetent influenza virus protects against *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus infection, *Journal of Virology*, 査読有, 88, 2014, 13410-13417

DOI:10.1128/JVI.01205-14

Taisuke Horimoto, Fumihiro Gen, Shin Murakami, Kiyoko Iwatsuki-Horimoto, Kentaro Kato, Hiroomi Akashi, Masaharu Hisasue, Masahiro Sakaguchi, Yoshihiro Kawaoka, Ken Maeda, Serological evidence of infection of dogs with human influenza viruses in Japan, *Veterinary Record*, 査読有, 174, 2014, 96

DOI:10.1136/vr.101929.

〔学会発表〕(計 18 件)

小林知也、丸山隼輝、松郷宙倫、前田健、高田礼人、村上晋、堀本泰介、国内のコウモリから分離された2種類のアデノウイルスの性状解析、第159回日本獣医学会、2017

松郷宙倫、堀本泰介、鳥インフルエンザウイルス弱毒株の哺乳類細胞における増殖性を上げる変異、第1回獣医RNAウイルス研究会、2017

神木春彦、堀本泰介、H9N2インフルエンザウイルスが哺乳類へ馴化するために必要なゲノム変異の探索、第1回獣医RNAウイルス研究会、2017

小林知也、丸山隼輝、松郷宙倫、前田健、高田礼人、村上晋、堀本泰介、国内のコウモリから分離された2種類のアデノウイルスの性状解析、第65回日本ウイルス学会、2017

小林知也、村上晋、松郷宙倫、神木春彦、前田健、堀本泰介、国内のモモジロコウモリ(*Myotis macrodactylus*)から分離された新規アデノウイルス、第159回日本獣医学会、2016

松郷宙倫、村上晋、堀本泰介、鳥インフルエンザウイルス弱毒株の哺乳類細胞における増殖性に関わる変異、第159回日本獣医学会、2016

Taisuke Horimoto T、Tomoha Odagiri、Tomoya Kobayashi、Akiko Uema、Hirohisa Mekata、Junzo Norimine、Takahiro Hiono、Yasuo Inoshima、Hirokazu Hikono、Kenji Murakami、Reiichiro Sato、Hironobu Murakami、Masahiro Sakaguchi、Kazunori Ishii、Takaaki Ando、Kounosuke Otomaru、Makoto Ozawa、Yoshihiro Sakoda、Shin Murakami、Serological survey reveals the wide distribution of bovine influenza D virus infection in Japan、第64回日本ウイルス学会、2016

Shin Murakami、Tomoya Kobayashi、Tsubasa Sato、Taisuke Horimoto、Characterization of bovine influenza D virus isolated in Japan、第64回日本ウイルス学会、2016

小林知也、塩田佳代子、奥村実紀、須田遊人、村上晋、堀本泰介、豚サーコウイルスゲノムを基盤とするエピゾーマルベクターの検討、第158回日本獣医学会、2015

神木春彦、松郷宙倫、山下憂也、大塚旭、須田遊人、村上晋、堀本泰介、H9N2 インフルエンザウイルスが哺乳類へ馴化するために必要なゲノム変異の探索、158 回日本獣医学会、2015

谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Roberto Puentespinna Jr、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉川泰弘、西條政幸、久和茂、前田健、フィリピンのコウモリから分離されたプテロパインオルソレオウイルスの性状解析及び疫学的研究、158 回日本獣医学会、2015

小林知也、塩田佳代子、奥村実紀、須田遊人、村上晋、堀本泰介、豚サーコウイルスゲノムを基盤とするエピゾーマルベクターの検討、第63回日本ウイルス学会、2015

上間亜希子、村上晋、芳賀猛、堀本泰介、外来遺伝子高発現組換えアカバネウイルスの作製、

日本ウイルス学会、2015

飯村太郎、玄文宏、須田遊人、光井英晃、奥村実紀、大塚旭、加藤健太郎、河岡義裕、村上晋、堀本泰介、A型インフルエンザウイルス(H1N1)の鶏卵における高増殖性決定因子の解析、第157回日本獣医学会、2014

奥村実紀、村上晋、玄文宏、須田遊人、光井英晃、飯村太郎、大塚旭、加藤健太郎、河岡義裕、前田健、堀本泰介、野生動物に対するA型インフルエンザウイルス抗体検出系の検討、第157回日本獣医学会、2014

飯村太郎、玄文宏、須田遊人、光井英晃、奥村実紀、大塚旭、加藤健太郎、河岡義裕、村上晋、堀本泰介、A型インフルエンザウイルス(H1N1)の鶏卵における高増殖性決定因子の解析、第62回日本ウイルス学会、2014

奥村実紀、村上晋、玄文宏、須田遊人、光井英晃、飯村太郎、大塚旭、加藤健太郎、河岡義裕、前田健、堀本泰介、野生動物に対するA型インフルエンザウイルス抗体検出系の検討、第62回日本ウイルス学会、2014

上間亜希子、石原ゆかり、村田洋介、玄文宏、加藤健太郎、村上晋、芳賀猛、堀本泰介、明石博臣、GFP発現組換えアカバナウイルスの作出、第62回日本ウイルス学会、2014

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：村上 晋

ローマ字氏名：Shin Murakami

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科(農学部)

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10636757

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。