

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：34104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670488

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Development of novel Norovirus vaccines using virus vector

研究代表者

伊奈田 宏康 (inada, hiroyasu)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：90283522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000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だが、根本的な治療はなくワクチンが望まれている。我国で流行したノロウイルスGII.4の抗原となる遺伝子をクローンイングし、非増殖型ウイルスベクターに導入してワクチンを作製した。2014-2015に流行したGII.17のワクチンも同様に作製した。それぞれのワクチンは、迅速検査キットで抗原性を確認した。現在単独あるいは2価ワクチンとして、ワクチンの効果を検討中である。小児の感染性胃腸炎の原因となるロタウイルスワクチンを同様の方法で作製中であり、ノロウイルスワクチンとの混合ワクチンとしての効果の検討を予定している。

研究成果の概要(英文)：Norovirus is a major causative virus of infectious gastroenteritis, however, there is no fundamental treatment for norovirus infection, the development of a vaccine is desired. We were cloned the genes of antigen of the virus from norovirus GII.4 stocks of the recent outbreak in Japan. These genes were introduced into a non-proliferative type virus vector and produced norovirus vaccines. In 2014-2015 winter, norovirus GII.17 had been epidemic, antigenicity of GII.17 was different to GII.4. GII.17 vaccine was produced as well. These two vaccines, using a rapid test kit, it was confirmed that antigenicity is positive. The effect of vaccine each alone, or the combination of the vaccine of multivalent vaccine is now studying using the mouse. Rotavirus is also a major causative virus of infectious gastroenteritis, especially to children. We also produce Rota virus vaccine as well, and also plan to examine the effects of norovirus and rotavirus combination vaccine.

研究分野：分子生物学・病理学

キーワード：ノロウイルス ロタウイルス 感染性胃腸炎 ワクチン ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスは、世界中で発症する感染性胃腸炎の主な原因ウイルスで、わが国でも、特に冬季に猛威を振るっている。院内・施設内における集団感染や、外来患者間での集団感染は深刻な問題となっている。特に小児や高齢者では深刻で、下痢や嘔吐による脱水、誤嚥性肺炎などで重症化し、死亡に至る場合もある。ノロウイルスはエンペロープを持たず、環境(アルコール消毒)に強いウイルスであり、また、根本的な治療法はなく世界中でワクチンの開発が望まれているが、ノロウイルスの培養によるウイルス増殖系やモデル動物が確立していないため不明な点が多い。最近、ウイルス様粒子(VLP)を用いたノロウイルスワクチンの開発が期待されているが、抗体価の上昇や血液型の問題などが示唆される。本研究では、液性免疫および細胞性免疫の両面から相乗的な効果を期待できるヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(PIV2)ベクターを用いて、体内で強力な免疫誘導環境を調整することで、より効果の強いワクチンを開発するための検討を行う。

近年我々は、気道粘膜に感染し、導入遺伝子を高発現し、強力な粘膜免疫誘導をもつパラインフルエンザ2型(PIV2)ベクターを開発し、このPIV2ベクターを用いて、免疫環境を細胞性免疫(細胞傷害性T細胞(CTL)/Th1)あるいは液性免疫(Th2)へ誘導可能となり、結核菌の増殖抑制、喘息の緩和、アトピー性皮膚炎の病態抑制などを示す結果を得ている。1つめは、粘膜免疫を誘導すること、2つめは導入遺伝子によるCTL/Th1への誘導を確立していること、3つめは、ウイルスベクター自身がアジュバント効果(Th2誘導性)を有すること、さらに、複数の遺伝子を同時に導入可能なベクターの特徴を有することが挙げられ、次世代のワクチンあるいは遺伝子治療の有効なツールとなり得ると考えられる。このウイルスベクターを用いて、平成25年度から新規結核ワクチン開発事業(厚生労働省、AMED)がスタートした。この事業は、AERAS(世界中の財団で維持されている結核ワクチンに関するNGO法人)とも連携した、世界中が注目を集める実用化に向けたワクチン開発である。本研究は、世界中が期待する開発方法を用いて、ノロウイルスワクチン開発の実用化に向けた基礎研究である。これまでの研究成果、現在進めている研究結果を基盤とし、ノロウイルスに対する効果がより高いワクチンの開発が期待しうる。培養系の確立していないノロウイルスでは、感染の成立などには、腸内細菌の関与や免疫細胞への感染などが示唆されており、自然免疫をはじめ細胞性免疫や液性免疫が複雑に関係することが予想されている。そこで、PIV2ベクターを用いて、ノロウイルスの抗原性を有する外殻蛋白を細胞内で発現させることにより、ノロウイルスのVLPと同様の免疫応答を得られる可能性

が高いと考えられる。

2. 研究の目的

現代の医療において、日常的な感染症のほか、グローバル化に伴う新興・再興感染症、更には医療の発達に伴う日和見感染など、実際の医療現場では感染症対策は重要性を増すばかりである。特にウイルス感染症に対しては、根本的な治療は少なく、多くはワクチンによる予防医療に依るところが高く、多くのワクチンの開発が望まれているのが現実である。ノロウイルスは、世界中で発症する感染性胃腸炎の主な原因ウイルスで、途上国では死に至る感染症であり、先進国でも死に至る可能性もあり、また強力な感染力から医療経済的にも大きな問題である。ノロウイルスのVLPを用いたワクチンの開発が現在進められているが、ノロウイルスの生物学的な知見がまだ不十分であり、様々なワクチン開発を含め十分検討する余地を残している。

このような問題点を抱えるワクチン開発において、本研究は、全く新しい方法でのノロウイルスワクチンの開発が目的である。その特徴は、1)非増殖性でかつ野生型の病原性がほとんど認められないウイルス(PIV2)をベクターとして用いること、2)腸管粘膜に感染する病原体に対して粘膜での免疫反応が重要であることから、鼻・気道粘膜に抗原を提示し粘膜免疫を誘導するワクチンであること、3)ウイルスベクターには複数の抗原遺伝子を搭載可能であり、強力な細胞性免疫(Th1/CTL)を誘導可能なウイルスベクターを既に開発していること、4)ウイルス自身が液性免疫(Th2)を誘導するアジュバント効果を持つこと、などがあげられる。本研究で作製されたワクチンは、粘膜での抗原性の獲得、細胞性免疫の誘導能、液性免疫の誘導能を兼ね備えている。

3. 研究の方法

1) ノロウイルスの骨格蛋白(VP1(ORF2)・VP2(ORF3))に対するワクチンの作製

本実験で使用する非増殖型アンチセンスPIV2ベクター(PIV2 M)は、PIV2のマトリックス蛋白の発現させないことでウイルス増殖能を喪失させたウイルスベクターである。また、ゲノムの5'末端に存在するLeader配列(ウイルスプロモーター)に近い程、mRNAの発現量が多くなる特徴を持っている。

ノロウイルスの骨格蛋白遺伝子(VP1(ORF2)・VP2(ORF3))を導入させたベクター(PIV2 M/ORF2、PIV2 M/ORF3)を作製するにあたり、ノロウイルスのVP1(ORF2)およびVP2(ORF3)のクローニングを行った。近年流行したノロウイルスRNAより、VP1(ORF2)領域さらにVP2(ORF3)領域をクローニング後、G₁4(sydney2012)とアミノ酸レベルで同じ遺伝子を改変し、PIV2 Mベクターへ搭載したウイルスベクターを作製した。リバーストランスジェニック法を用いて、培養細胞に

てワクチンを作製し、蛋白発現（抗原性）の解析を行った。また、細胞性免疫(CTL/Th1)を誘導する Ag85B を同時搭載したものを作製した。

2) 2015-2016 に流行した G .17 に対するワクチンの作製

2014-2015 冬期に流行したと考えられる G .17 は、従来のウイルス検出迅速キットの反応性が弱く、抗原性の変化が考えられた。そのため、G .4 に対するワクチンだけでなく G .17 に対するワクチンを作製する必要が考えられた。そこで、2014-2015 冬期に検出されたノロウイルス RNA より、VP1(ORF2)領域をクローニング後、PIV2 M ベクターへ搭載したウイルスベクターを作製した。リバースジェネティクス法を用いて、培養細胞にてワクチンを作製し、蛋白発現（抗原性）の解析を行った。

3) ロタウイルスに対する新規ワクチンの作製

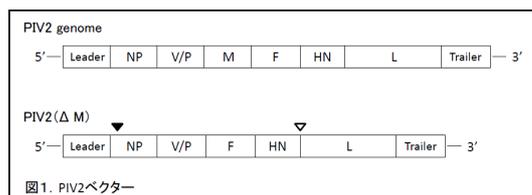
小児の感染性胃腸炎の原因ウイルスのほとんどは、ノロウイルスとロタウイルスで占めている。ロタウイルスは、ワクチンが開発されその有効性が示され始めている。しかし、経口生ワクチンであり、他のワクチンとの同時接種はできない。一方、不活化ワクチンが開発されたポリオワクチンは、三種混合ワクチンとの混合接種が行われている。そこで、上記のノロウイルスワクチンと同様に、ロタワクチンの主な抗原となる VP4 および VP7 を PIV2 M ベクターに搭載したワクチンを作製した。

4. 研究成果

1) G .4 (sydney2012) ワクチンの開発

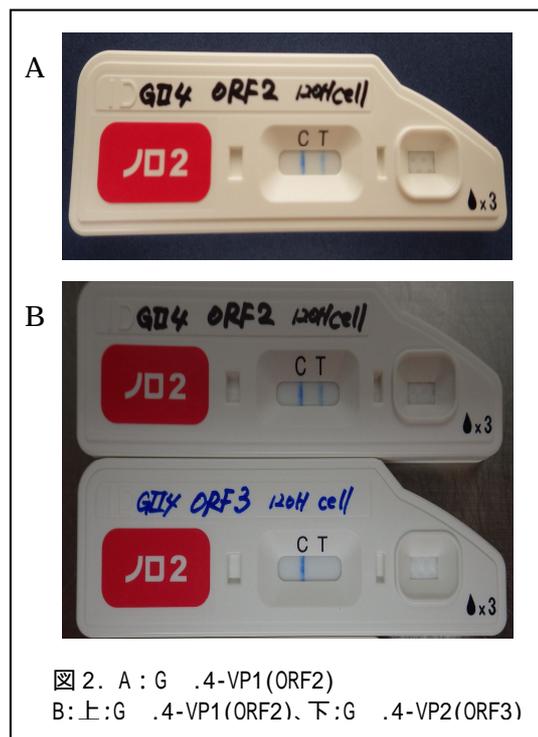
我が国で最近流行したノロウイルスの RNA より、ノロウイルス骨格蛋白遺伝子 (VP1(ORF2) および VP2(ORF3)) を、RT-PCR 法によりクローニングした。それぞれ複数個の遺伝子をクローニングし、遺伝子の塩基配列を調べたところ、G .4 (sydney2012) と比べアミノ酸レベルで 4 ~ 数か所の変異が認められた。これらの遺伝子の変異は、二次元的には明らかなパターンがみられなかったため、G .4 (sydney2012) のアミノ酸レベルで一致するように、遺伝子の改変を加えた。

これらの VP1(ORF2) および VP2(ORF3) 遺伝子を図 1 に示す、PIV2 M ベクターに組み込んだ。PIV2 M-ORF2 および PIV2 M-ORF3 をリバースジェネティクス法により、培養細胞にて VP1(ORF2) と VP2(ORF3) を発現するウイルスワクチンの作製に成功した。



ウイルスワクチンをそれぞれ細胞に感染さ

せた後、細胞を回収し凍結融解処理したサンプルを、市販のノロウイルス迅速検出キット(クイックナビ™-ノロ2)を用いて、それぞれの蛋白発現（抗原性）の解析を行った。図 2 で示すように、検出キットにより、PIV2 M-ORF2_G .4 の抗原性が認められたが、PIV2 M-ORF3_G .4 は認められなかった。



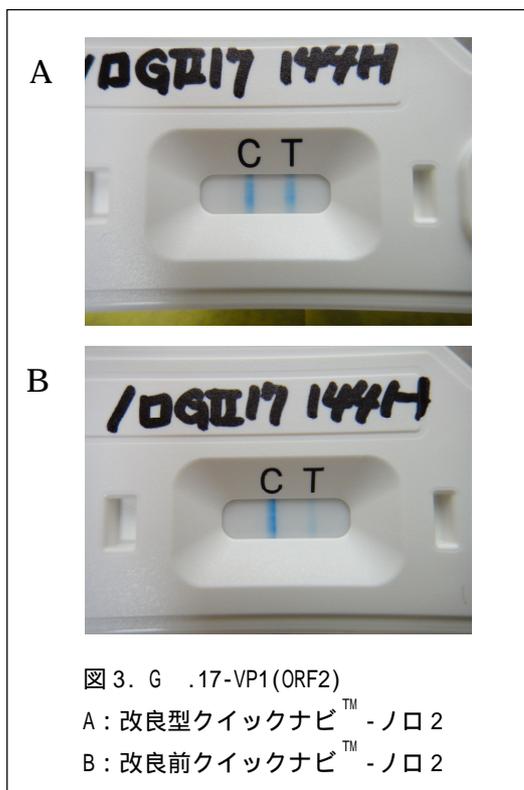
2) G .17 ワクチンの開発

2014-2015 冬期には、G .17 型のノロウイルスが流行したと考えられているが、従来のウイルス検出迅速キットでの反応性が弱いことが指摘され、偽陰性の患者が多くみられた可能性は否定できない。ウイルスのこのような変異は、ウイルスの特性と考えられるため、今後は、従来の G .4 型ではなく、G .17 型のウイルスが流行する可能性が考えられる。そこで、2014-2015 冬期に検出されたノロウイルス G .17 の RNA より、RT-PCR 法により VP1(ORF2) のクローニングを行った。その後、遺伝子配列を解析しデータベースで比較検討した。日本では、長野で流行したものと神奈川県で流行したものの遺伝子配列が報告されているが、我々がクローニングした G .17 (三重) は神奈川県と同じであった。抗原性となる領域は、G .4 とはかなり異なっているため、最も抗原性が考えられる領域に対するワクチンを新たに作製した。すなわち、G .17 の PIV2 M-ORF2 を、G .4 の PIV2 M-ORF2 と同様に作製し、リバースジェネティクス法を用いて、培養細胞にてワクチンを作製した。

G .4 ワクチンと同様に、G .17 ワクチンの蛋白発現（抗原性）の解析を、迅速検出キット(クイックナビ™-ノロ2)を用いて行った。図 3 で示すように、改良型検出キット(A)で

は、G .17 の PIV2 M-ORF2 の抗原性が認められたが、図2で使用した改良前の検出キット(B)では、陽性のバンドが薄く、判定は困難であった。G .17 の流行を受けて改良された検出キットでは検出が容易であると考えられたが、それ以前のものでは、偽陰性の症例が存在した可能性は否定できないと考えられた。

以上より、G .4 および G .17 の抗原性を有するワクチンの作製に成功したと考えられた。現在、これらのワクチンを大量に作製し、マウスによるワクチン効果を検討予定である。



3) ロタウイルスワクチンの開発

ロタウイルスによる感染性胃腸炎は、ノロウイルス同様、特に乳幼児においては重要な問題である。現状では、ロタウイルスワクチンの開発・予防接種施行によりその発症頻度は減少している。しかし、生後数か月から3回の接種が必要であり、他に必要なワクチン接種との投与時期の重複が問題である。そこで、我々は小児の感染性胃腸炎の包括的な予防を目的として、ノロウイルスワクチンとロタウイルスワクチンとの混合ワクチン接種の効果を検討するため、ロタリックスワクチンで使用されているロタウイルスを参考に、最近流行したロタウイルス RNA から抗原性を有し、ワクチンとして使用可能と考えられる VP4 および VP7 のクローニングを行った。塩基配列を調べたところ、参考にしたものと比べ、アミノ酸レベルで数個の変異が認められた。現在、それぞれの遺伝子を PIV2 Mベクターへ組み込み中であり、ロタウイルスのワクチンを作製中である。

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6件)

- 6-(4-Amino-2-butyl-imidazoquinolyl)-norleucine: Toll-like receptor 7 and 8 agonist amino acid for self-adjuvanting peptide vaccine. Fujita Y, Hirai K, Nishida K, Taguchi H. *Amino Acids*. 2016 48(5):1319-1329. doi:10.1007/s00726-016-2190-7. 査読有
- Kondo M, Akachi S, Kawano M, Yamanaka K, Yamagiwa A, Gabazza EC, Ando K, Mizutani H. Improvement in early diagnosis of Japanese spotted fever by using a novel Rick PCR system. *J Dermatol*. 2015 42(11):1066-1071. doi: 10.1111/1346-8138.13015. 査読有
- Ribavirin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication in vitro. Kihira S, Uematsu J, Kawano M, Itoh A, Ookohchi A, Satoh S, Maeda Y, Sakai K, Yamamoto H, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H. *Microbiol Immunol*. 2014 58(11):628-635. doi: 10.1111/1348-0421.12192. 査読有
- Effects of mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K, Yasutomi Y. *PLoS One*. 2014 5;9(9): e106807. doi: 10.1371/journal.pone.0106807. eCollection. 査読有
- Vero/BC-F: an efficient packaging cell line stably expressing F protein to generate single round-infectious human parainfluenza virus type 2 vector. Ohtsuka J, Fukumura M, Tsurudome M, Hara K, Nishio M, Kawano

M, Nosaka T. Gene Ther. 2014 21(8):
775-784. doi: 10.1038/gt.2014.55. 査
読有

6. Recombinant Ag85B vaccine by taking
advantage of characteristics of human
parainfluenza type 2 virus vector
showed Mycobacteria-specific immune
responses by intranasal immunization.
Watanabe K, Matsubara A, Kawano M,
Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada
H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y.
Vaccine. 2014 26;32(15):1727-1735.
doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.108.
査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. ミコフェノール酸によるヒトパラインフ
ルエンザウイルス 2 型増殖阻害 .植松淳、
酒井香江、山本秀孝、河野光雄、鶴留雅
人、駒田洋 . 日本薬学会 136 年会、2016
年 3 月 29 日 . パシフィコ横浜
2. 空中浮遊菌サンプラーを用いた非結核性
抗酸菌の分離検出 .平井一行、下村裕史、
伊奈田宏康、出屋敷喜宏、平井義一 . 第
89 回日本細菌学会総会 . 2016 年 3 月 23
日 . 大阪国際交流センター
3. 改良シュウ酸法による非結核性抗酸菌
(NTM)の検出と応用 .平井一行、伊奈田宏
康、下村裕史、林俊治、平井義一、出屋
敷喜宏 . 第 60 回薬学会東海支部 . 2014
年 7 月 5 日 . 鈴鹿医療科学大学白子キャ
ンパス

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊奈田 宏康 (INADA HIROYASU)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授
研究者番号：90283522

(2)研究分担者

河野 光雄 (KAWANO MITSUO)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：00234097

平井 一行 (HIRAI KAZUYUKI)