

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26870147
研究課題名(和文) 麻疹ウイルスベクターを利用した高病原性鳥インフルエンザウイルスワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of measles virus vector-based vaccine against highly pathogenic avian influenza virus

研究代表者
藤幸 知子 (Fujiyuki, Tomoko)
東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50610630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、麻疹ウイルスベクターを利用して作出した高病原性鳥インフルエンザウイルス(HPAIV)ワクチンの効果を検討した。カニクイザルに本ワクチンを接種した結果、HPAIV抗原タンパク質(H5)に対する抗体が産生され、HPAIV感染後の発熱や呼吸器症状、およびウイルス排出が抑制された。さらに、本ワクチンは、麻疹抗体を保有する場合にもHPAIV抗原タンパク質に対する抗体産生を誘導した。以上の結果から、本ワクチンは、HPAIV感染後の発症防御に寄与するワクチン候補として有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We generated recombinant measles virus (rMV) expressing the hemagglutinin (HA) protein of HPAIV (H5), and examined protective efficacy of the candidate vaccine in the monkey infection model by the challenge with a HPAIV (H5N1). Cynomolgus monkeys inoculated with the candidate vaccine produced anti-H5 HA antibodies and recovered earlier from influenza symptoms than unvaccinated monkeys after the challenge with the HPAIV strain. In addition, vaccination tended to suppress viral shedding. Moreover, even in monkeys possessing pre-existing anti-MV antibodies, the vaccination with the candidate induced the production of antibodies against H5 HA. These results suggest that the rMV expressing H5 HA is a good candidate vaccine against HPAIV infection to reduce disease severity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：高病原性鳥インフルエンザウイルス 麻疹ウイルス カニクイザル 感染モデル 発症防御 ワクチンベクター

1. 研究開始当初の背景

麻疹ウイルス(measles virus; MV)はパラミクソウイルス科モービルウイルス属の RNA ウイルスであり、ヒトに対する重大な疾患を引き起こすことから、古くから弱毒化ウイルスによる生ワクチンの接種が行われてきた。MV ワクチン株は、長年に渡って世界各国で多数の人へ接種され続けている実績があり、安全性の高さは実証されている。また、細胞性免疫誘導能が高い、免疫持続期間が長いといったワクチンとしての優れた特徴を持っている。さらに、MV のリバーシジェネティクスが確立されているため、外来遺伝子の挿入が可能である。その技術はワクチン開発にも応用が可能であり、MV と同じパラミクソウイルス科に属するニパウイルスの抗原を発現する組換え MV ワクチンは、ニパウイルスのサル感染モデルにおいて極めて高い防御能を示した (Yoneda et al., 2013, *PLoS ONE*)。したがって、MV ワクチンベクターを利用した組換えウイルス二価ワクチンは感染症制御に有用なツールであると考えられる。しかしながら、MV ワクチンベクターの汎用性に関する知見はごく限られており、その汎用性を一般化するには至っていない。

MV ワクチンベクターの応用を目指す感染症として、我々は鳥インフルエンザに着目した。高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) は、近年東南アジアを中心にヒトにおける感染が報告されて以来、その流行が危惧されている。鳥インフルエンザは、季節性インフルエンザに比べると感染症例は少ないものの、死亡率が高いことから、ワクチン開発に対する社会的ニーズは高い。現在ヒト用の鳥インフルエンザワクチンとして、不活化ワクチンや DNA ワクチンの臨床試験が進められている。しかし、免疫賦活力や免疫持続性の高さにより、生ワクチンのほうが高い効果を期待できる。一方で、HPAIV の弱毒生ワクチンでは復帰突然変異による病原性回復の危険性といった安全性の問題が伴う。MV ワクチン株をベースにした組換えウイルスができれば、細胞性免疫の誘導能や持続性の高いワクチンの良い候補となる。

MV ワクチンの効能評価には MV 感受性動物である霊長類を用いた HPAIV 感染モデルが必要である。我々は既に、国内で発症・死亡した野鳥から分離された HPAIV [A/whooper swan/Hokkaido/1/2008 (H5N1, clade 2.3.2.1)] によってカニクイザルやアカゲザルにインフルエンザ症状を引き起こされることを明らかにし、サル感染モデルを確立した (Fujiyuki et al., 2013, *PLoS ONE*)。続いて我々は、MV ワクチン株の全長感染性 cDNA クローンを用いて HPAIV の抗原タンパク質であるヘマグルチニンを発現する組換え麻疹ウイ

ルス(rMV-Ed-H5HA)を作出し、予備的検討によりサル感染モデルにおける防御効果があると示唆した。そこで、より詳細な解析を行って MV ベクターによるワクチンの有用性を明らかにするため、本研究計画に至った。

2. 研究の目的

本研究では、HPAIV 抗原タンパク質発現組換え MV の HPAIV 感染に対する防御効果を多角的に評価し、二価ワクチンとしての特性や防御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、大きく 3 つに分けて研究を進めた。

(1) HPAIV 抗原タンパク質発現組換え MV 接種サルが示す鳥インフルエンザウイルス感染に対する防御能の評価

rMV-Ed-H5HA による HPAIV に対する防御効果を検討するため、カニクイザルへの rMV-Ed-H5HA 接種による免疫誘導後に HPAIV をチャレンジし、インフルエンザの代表的な臨床症状である発熱と呼吸器症状について、体温・呼吸数のモニタリング、および胸部レントゲン撮影によって観察した。観察期間終了後に感染個体を剖検し、呼吸器の病理組織学的解析を行った。また、チャレンジ個体のスワブを経時的にサンプリングし、RT-PCR 法によりウイルスの有無を解析した。

(2) HPAIV 抗原発現組換え MV 接種個体における HPAIV チャレンジに対する防御機構の解析

ウイルス感染防御には抗体の寄与が大きい。そこで、本ワクチンの接種によって HPAIV 暴露後の抗体産生誘導が促進されるかを検討するため、チャレンジ後に経時的に採取した血液中の抗 H5 HA 抗体価を測定した。

インフルエンザ発症防御には、細胞傷害性 T 細胞によるウイルス感染細胞の除去が重要な役割を果たす。一方、免疫担当細胞の過剰な活性化は HPAIV 重症化の一要因と考えられているサイトカインストームの引き金となる。そこで、細胞性免疫の活性化を導くサイトカインや、インフルエンザの病態との関連性が高い炎症性サイトカインの量を調べた。

(3) MV ワクチン接種経験のある個体における本組換えウイルスのワクチン効果の検討

MV ワクチンの接種率は先進諸国では非常に高い。MV ワクチンの効果は長期間持続することから、MV ワクチン接種経験のある場合には、同じ MV ワクチン株をベースとした組換えウイルスは感染しにくく効果を発揮しない可能性がある。そこで、MV ワクチン接種済みの個体に対しても本組換えウイルスワクチンが効果を発揮するのかを調べるため、予め MV ワク

チン株で免疫したカニクイザルに rMV-Ed-H5HA を接種し、HPAIV に対する免疫誘導能を検討した。

4. 研究成果

(1) HPAIV 抗原タンパク質発現組換え MV 接種サルが示す鳥インフルエンザウイルス感染に対する防御能の評価

カニクイザルに HPAIV を感染させ、臨床症状を観察した結果、ワクチン接種個体では非接種個体に比べて発熱期間の短縮および呼吸器症状の軽減が認められた。また、レントゲン撮影および病理組織学的解析による肺炎像はワクチン個体で軽度であった。さらに、チャレンジ個体の鼻腔拭い液を解析した結果、ウイルスの排出期間が短縮した。したがって、本組換え MV ワクチンは HPAIV 感染後の重症化を抑制する効果を持つと示唆された。

(2) HPAIV 抗原発現組換え麻疹ウイルス接種個体における HPAIV チャレンジに対する防御機構の解析

チャレンジ後の血中抗 H5 HA 抗体価は、ワクチン接種個体で顕著に上昇した。一方、非接種個体では抗体産生は認められなかった。ワクチン接種個体では HPAIV 感染後の速やかな抗体産生誘導が重症化抑制に寄与する可能性が考えられた。

6種のサイトカインの測定を試み、定量が可能であった IL-6 について、ワクチン接種個体と非接種個体での肺での量を比較した。その結果、IL-6 量はワクチン接種個体で有意に低下していた。IL-6 はインフルエンザの病態との関連性が高い炎症性サイトカインであるが、高 IL-6 レベルがインフルエンザの重症化の原因とはならないことがマウスを用いた研究から示唆されている。したがって、ワクチン接種による重症化抑制のメカニズムの解明にはさらなる解析が必要である。

(3) MV ワクチン接種経験のある個体における本組換えウイルスのワクチン効果の検討

MV ワクチン株をカニクイザルに免疫し、抗 MV 抗体産生が認められた後に rMV-Ed-H5HA を接種した。その結果、抗 MV 抗体価の上昇および抗 H5 HA 抗体の産生が見られた。したがって、rMV-Ed-H5HA は MV 保有宿主に対してもワクチン効果を発揮しうると示唆された。

以上のように、本組換え MV は HPAIV 感染後の重症化を抑制し、MV に対する免疫を持つ個体に対しても有効性を発揮しうることから、ワクチン候補として有望であると考えられる。パンデミックの危険性が想定されている高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するワクチンの候補として、一般的な不活化ワクチン

とは異なる安全性と防御効果の高い生ワクチンを提示したことは感染症制御・予防医学上の観点から価値があったと考えている。また、MV ベクターによる多価ワクチンの応用可能性を上げたことで、他の新興・再興感染症に対するワクチン開発にも展望が開かれることを期待する。

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 5 件)

1. 藤幸知子、堀江亮、米田美佐子、倉石武、安井文彦、権賢貞、池田房子、宗片圭祐、石井美穂、木曾有里、佐藤宏樹、服部正策、喜田宏、小原道法、甲斐知恵子。麻疹ウイルスベクターを利用した高病原性鳥インフルエンザウイルスワクチンの霊長類感染モデルにおける効果。第63回日本実験動物学会、2016年5月18-20日(神奈川、川崎)。

2. Tomoko Fujiyuki, Ryo Horie, Misako Yoneda, Takeshi Kuraishi, Fumihiko Yasui, Hyun-jeoung Kwon, Fusako Ikeda, Keisuke Munekata, Miho Ishii, Yuri Kiso, Mio Omi, Hiroki Sato, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Michinori Kohara, Chieko Kai. Efficacy of recombinant measles virus expressing highly pathogenic avian influenza virus antigen in non-human primate model. 第63回日本ウイルス学会、2015年11月22-24日(福岡、博多)。

3. Tomoko Fujiyuki, Ryo Horie, Misako Yoneda, Takeshi Kuraishi, Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Shosaku Hattori, Hiroshi Kida, Michinori Kohara, Chieko Kai. Attenuated recombinant measles virus expressing highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) antigen is protective against HPAIV challenge in cynomolgus monkeys (XVIth International Congress of Virology, Jul 27-Aug 1, 2014, Montreal, Canada)。

4. 藤幸知子、堀江亮、米田美佐子、倉石武、安井文彦、宗片圭祐、池田房子、木曾有里、権賢貞、石井美穂、佐藤宏樹、服部正策、喜田宏、小原道法、甲斐知恵子。霊長類感染モデルを用いた高病原性鳥インフルエンザウイルス抗原発現組換え麻疹ウイルスの防御効果の解析。

(第61回日本実験動物学会、2014年5月15-17日、札幌)

5. 安井文彦、宗片圭祐、倉石武、服部正策、藤幸知子、米田美佐子、迫田義博、喜田宏、甲斐知恵子、小原道法。H5N1高病原性鳥インフルエンザ組換えワクチニアワクチン単回接種による免疫長期持続作用機序の解析。第62回日本ウイルス学会2014年11月12日、横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤幸 知子 (FUJIYUKI, Tomoko)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：50610630

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

甲斐 知恵子 (KAI, Chieko)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：10167330

米田 美佐子 (YONEDA, Misako)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：40361620

小原 道法 (KOHARA, Michinori)
東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・シニア研究員
研究者番号：10250218

喜田 宏 (KIDA, Hiroshi)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任教授
研究者番号：10109506

服部 正策 (HATTORI, Shosaku)
東京大学・医科学研究所・特任研究員
研究者番号：00164864