

平成 21年 6月 5日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17380179

研究課題名（和文） 人畜共通新興再興感染症に対する新規療法戦略

研究課題名（英文） A novel therapeutic strategy for zoonotic emerging and reemerging infections

研究代表者

堀本 泰介（HORIMOTO TAISUKE）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00222282

研究成果の概要：人畜共通新興再興感染症は人類の脅威である。特に、H5N1 高病原性鳥インフルエンザの世界的な蔓延とヒトへの感染は、インフルエンザの新たな世界的大流行（パンデミック）を危惧させている。本研究では、こういった世界情勢を鑑み、H5N1 ワクチン開発のための基礎研究を実施した。その結果、不活化ワクチン製造のためのシードウイルスの発育鶏卵ならびに MDCK 細胞における増殖基盤を明らかにし、その知見をもとに高増殖性シードウイルスの作出に成功した。本成果は、今後のインフルエンザワクチン開発におおいに貢献することが期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	4,100,000	0	4,100,000
2006 年度	3,800,000	0	3,800,000
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
総計	15,500,000	2,280,000	17,780,000

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：インフルエンザ、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

今日、人類は新興再興感染症の脅威に晒されている。そのほとんどは人畜共通感染症である。特に、鳥インフルエンザ、SARS、肺炭疽といった空気伝播性の呼吸器侵襲感染症が最も恐れられている。その予防のため有効な新しい戦略が求められている。

2. 研究の目的

これらの感染症に効果的な人体あるいは動物用の新規療法の開発のための基礎研究を実施する。

3. 研究の方法

(1) H5N1 インフルエンザウイルスに対する不活化ワクチン開発のための基礎研究を実施する。方法は、WHO が推奨する遺伝子組成を持つワクチンシードウイルスをリバースジェネティクスにより人工的に作製し、現在のワクチン製造

母体である発育鶏卵、および今後使用が見込まれるMDCK細胞における増殖性を規定する因子を同定する。

(2) インフルエンザウイルスを基盤とした高度弱毒ベクターを開発し、それに他の呼吸器病原体の感染防御抗原を搭載した多価ワクチンの可能性について検討する。

4. 研究成果

本研究は、人畜共通新興再興感染症の制御、特に空気伝播性の呼吸器侵襲感染症の制御を目的に計画された。当初は、SARS、肺炭疽などの制御も念頭に置いていたが、H5N1高病原性鳥インフルエンザの世界的な蔓延と新たなパンデミックの危惧感に直面し、そのワクチン開発の早急性が必要とされるという状況を鑑み、本研究でも特にH5N1インフルエンザワクチン開発のための基礎研究というテーマに焦点を絞り、研究を実施した。

(1) H5N1インフルエンザ不活化ワクチン作製のためのシードウイルス候補株の構築に関する研究を実施した。H5N1鳥インフルエンザウイルスが世界中に蔓延する様相を示しているが、その人への感染を防御する方法として、抗インフルエンザ薬の備蓄と予防ワクチンの開発が緊急課題として挙げられている。ワクチン開発に関しては、当時WHO協カラボで作製されたNIBRG-14というワクチンシードウイルスを用いた不活化ワクチンが試作され、日本を含めたいくつかの国で臨床試験が行われていた。そこで浮上してきた問題がこのシードウイルスのワクチン製造母体である鶏発育鶏卵における増殖性の悪さである。実際のパンデミック発生時には、発育鶏卵の供給が低下する可能性が高いため、この増殖性を改善することは非常に社会的要求の高い課題である。私たちは、リバースジェネティクス解析によりワクチンシードウイルスの鶏卵での増殖性は、HA-NA機能バランスとウイルスポリメラーゼのサブユニットであるPB1蛋白質の機能により決定されることを明らかにした。HA-NA機能バランスに関しては、従来のH5N1ウイルス由来のNAを用いるよりも、PR8株由来のNAを用いた時に、シードウイルスの増殖性が有意に上昇することを発見した。

(2) 実際にインフルエンザパンデミックが発生した場合を想定し、供給量が減少する発育鶏卵に頼らない方法として培養細胞を製造母体とするワクチン生産について検討した。その際に、最も使用される可能性の高いMDCK細胞におけるワクチンシードウイルスの増殖性を規定する因子を

解析した。その結果、ポリメラーゼ蛋白質のPB2サブユニットと非構造蛋白質NS1が、ウイルスの増殖性を左右することを見出した。

(3) MDCK細胞におけるワクチンシードウイルスの増殖性を規定する因子であるウイルスゲノムの転写・複製を司るポリメラーゼPB2蛋白質および非構造蛋白質NS1の分子基盤を解析した。各種レポーターアッセイ系を用いて解析したところ、PB2の360番目のアミノ酸がウイルスのMDCK細胞での増殖性を規定すること、また、NS1の55番目のアミノ酸がMDCK感染細胞に誘導されるインターフェロン活性を阻害し、その結果ウイルス増殖が高まることを発見した。

(4) H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、現在までにいくつかの異なる遺伝子集団(クレード)に進化している。それに伴い、ウイルス抗原性が変化している。そこで、各クレードのワクチンを試作し、それらの交差抗原性をマウスモデルで検証した。その結果、全てのワクチンは別のクレードのウイルスの感染に対し、一例を除き、完全なあるいは部分的な交差反応性を示すことがわかった。クレード2.2のワクチンは、クレード2.3.4のウイルスの感染を防御できなかった。一方、特に、クレード2.1ワクチンは非常に広範な交差抗原性を示すことがわかった。したがって、現在備蓄されているワクチンは、ある程度抗原性が異なるウイルスによるパンデミックが発生した際にも、バックアップワクチンとして有効であることが推測される。これらの知見は今後の効果的なワクチン産生に大いに貢献するものと期待できる。

(5) 多価ワクチンを念頭に置き、インフルエンザベクターの構築法を確立するため、レポーター遺伝子のウイルスゲノムへの搭載を検討した。その結果、HA/NSタンデムシステムという方法により、外来性遺伝子を比較的安定に搭載させることに成功した。今後、インフルエンザベクターの開発に寄与することが期待される。

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 17件)

Song J-H, Lee A-Y, Nguyen HH, Czerkinsky C, Cubura N, Horimoto T, Ko S-Y, Park S-H, Kweon M-N: Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. Proc Natl Acad Sci USA 105:1644-1649 (2008) 査読有
Murakami S, Horimoto T, Yamada S,

Kakugawa S, Goto H, Kawaoka Y: Establishment of canine RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A virus: its application for H5N1 vaccine production. *J Virol* 82:1605-1609 (2008) 査読有

Murakami S, Horimoto T, Le QM, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A, and Kawaoka Y: Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *J Virol* 82:10502-10509 (2008) 査読有

Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-HK, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Nidom CA, Le QM, Yamada S, Imai H, Sakai-T Y, Kawaoka Y, Horimoto T: Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine* 26:6398-6404 (2008) 査読有

Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, Yamada S, Fujii K, Kiso M, Iwatsuki-H K, Kino Y, Kawaoka Y: Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology* 366:23-27, 2007 査読有

Youn H-J, Ko S-Y, Lee K-A, Ko H-J, Lee Y-S, Fujihashi K, Boyaka PN, Kim S-H, Horimoto T, Kweon M-N, Kang C-Y: A single intranasal immunization with inactivated influenza virus and alpha-galactosylceramide induces long-term protective immunity without redirecting antigen to the central nervous system. *Vaccine* 25:5189-5198 (2007) 査読有

Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-H K, Ito M, Tagawa-S Y, Yamada S, Ito H, Ito T, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kawaoka Y. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine* 24: 3669-3676 (2006) 査読有

Iwatsuki-H K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* 80:5233-5240 (2006) 査読有

Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada M, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y: Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type

receptors. *Nature* 444:378-382 (2006) 査読有

Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, Yamamoto Y, Hitomi T, Kira T, Nakai T, Kiso M, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S. Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the outbreaks in Japan. *Virology* 332: 167-176 (2005) 査読有

Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. The importance of both the coding and segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* 79: 3766-3774 (2005) 査読有

Shinya K, Hatta M, Yamada S, Takada A, Watanabe S, Halfmann P, Horimoto T, Neumann G, Kim JH, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kiso M, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003. *J Virol* 79: 9926-9932 (2005) 査読有

Mase M, Eto M, Tanimura N, Imai K, Tsukamoto K, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S. Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China. *Virology* 339: 101-109 (2005) 査読有

Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KH, Pham ND, Nguyen HH, Yamada S, Muramoto Y, Horimoto T, Takada A, Goto H, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. A drug-resistant H5N1 flu virus. *Nature* 437: 1108 (2005) 査読有

Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-H K, Kawaoka Y. A protective immune response in mice to viral components other than hemagglutinin in a live influenza A virus vaccine model. *Vaccine* 22: 2244-2247 (2004) 査読有

Horimoto T, Iwatsuki-H K, Hatta M, Kawaoka Y. Influenza A viruses possessing type B hemagglutinin and neuraminidase: potential as vaccine components. *Microb Infect* 6: 579-583 (2004) 査読有

Iwatsuki-H K, Horimoto T, Fujii Y, Kawaoka Y. Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. *J Virol* 78: 10149-10155 (2004) 査読有

[学会発表](計 13 件)

村上晋、岩佐彩香、岩附研子、伊藤睦美、木曾真紀、喜田宏、高田礼人、CA Nidom、Le Quynh Mai、山田晋弥、今井博貴、坂井(田川)優子、河岡義裕、堀本泰介: H5N1

不活化インフルエンザワクチンのクレード間交差防御免疫能の解析 第 56 回日本ウイルス学会 (2008.10) 岡山
Murakami S, Horimoto T, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-H K, Shimajima M, Kawaoka Y: Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. XIV. International Congress of Virology 国際ウイルス学会 (2008.8) イスタンブール
村上晋、堀本泰介、河岡義裕 イヌ RNA ポリメラーゼエプロモーターを用いたインフルエンザウイルスリバースジェネティクス系の確立と H5N1 ワクチンシードウイルスの作製 第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10) 札幌
村上晋、堀本泰介、村本裕紀子、岩佐彩香、山田晋弥、岩附研子、岩田晃、河岡義裕 H5N1 ワクチンシードウイルスの MDCK 細胞での増殖性を決める因子 第 55 回日本ウイルス学会 (2007.10) 札幌
堀本泰介、村本裕紀子、藤井健、山田晋弥、岩附研子、城野洋一郎、河岡義裕 インフルエンザ不活化ワクチンの製造基材である発育鶏卵でよく増殖する H5N1 ワクチンシードウイルス候補株の作出 第 53 回日本ウイルス学会 (2005.11) 横浜

〔図書〕(計 1 件)

堀本泰介、河岡義裕 ウイルスと感染のメカニズム：インフルエンザウイルス 微生物感染学(光山正雄編) pp.190-201(2005) 南山堂

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称：New composition comprising influenza virus vectors, useful in preparing high titer influenza viruses for use immunizing an individual against a pathogen.

発明者：KAWAOKA Y, HORIMOTO T, MURAKAMI S

権利者：同上

番号：US2007231348 -A1, WO2007126810 -A2, WO2007126810 -A3, EP2010557 -A2

取得年月日：

2007/10/4, 2007/11/8, 2008/3/13, 2009/1/7

国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀本 泰介 (HORIMOTO TAISUKE)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：00222282

(2)研究分担者

五藤 秀男 (GOTOH HIDEO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50323639

高田 礼人 (TAKADA AYATO)(2007 年度まで)

北海道大学・人畜共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：10292062

安田 二郎 (YASUDA JIRO)(2007 年度まで)

科学警察研究所・法科学第一部・室長

研究者番号：10282518

下島 昌幸 (SHIMOJIMA MASAYUKI)(2007 年度まで)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10422411

(3)連携研究者

高田 礼人 (TAKADA AYATO)(2008 年度)

北海道大学・人畜共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：10292062

安田 二郎 (YASUDA JIRO)(2008 年度)

科学警察研究所・法科学第一部・室長

研究者番号：10282518

下島 昌幸 (SHIMOJIMA MASAYUKI)(2008 年度)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10422411