

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02784

研究課題名(和文) ロタウイルスワクチンを基盤としたリコンビナント性器ヘルペスワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of recombinant genital herpes vaccine based on the live attenuated rotavirus vaccine

研究代表者

吉川 哲史 (Yoshikawa, Tetsushi)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：80288472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ロタウイルスリバースジェネティクスシステムによりHSV-2 gD組み込みSA11 (rSA11-gD2)を作製した。感染細胞の培養上清を用いて、western blottingにてHSV-2 gD蛋白の発現を確認した。次に、In vivoでの免疫原性を確認するため、マウスに計2回rSA11-gD2を経口接種した。2回目接種後4週間の血清を採取し中和抗体法を行ったが、中和抗体は陰性だった。その後、8週令マウスに同様の接種実験を行った結果、ELISA法でRV IgG、IgA抗体の上昇と、HSV-2gD IgG抗体価の有意上昇を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既に安全性の確立され、定期接種ワクチンとして使用されている弱毒生ロタウイルスワクチンを基盤として、グローバルな観点から公衆衛生的に重要課題として認識されている性器ヘルペスを予防するためのワクチン開発につながる基盤技術を確立した。新規ワクチンプラットフォームの中でも、性器ヘルペス予防に重要な粘膜免疫を安全かつ効果的に誘導できるものは限られており、本研究成果の意義は極めて高いと考えられる。今後、粘膜免疫が感染防御に重要と考えられる感染症の予防法開発という意味でも、その意義は高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to develop simian RV (SA11), in which HSV-2 glycoprotein D (gD2) gene was inserted by reverse genetics system, as a herpes vaccine, and evaluated its immunogenicity in mice.

Artificially synthesized gD2 DNA fragment was inserted into T7 expression NSP1 plasmids (pT7/NSP1-gD2). Using the plasmid, recombinant SA11-gD2 virus (rSA11-gD2) was generated. Insertion of the gD2 gene and synthesis of gD2 protein were demonstrated by sequence analysis and Western blotting analysis, respectively. Diarrhea occurred after the first inoculation of rSA11-gD2 in suckling mice. Although IgG and IgA antibodies against RV were induced, no gD2 antibody was detected in convalescent sera in the suckling mice. Meanwhile, in the eight-week-old mice inoculated with three times of rSA11-gD2, significant increases in not only IgG and IgA against RV but also IgG against gD2 were demonstrated.

研究分野：小児感染症学

キーワード：ロタウイルスワクチン リバースジェネティクス 性器ヘルペスワクチン 粘膜免疫 リコンビナントワクチン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルス胃腸炎は、かつては発展途上国を中心に約 45 万人の小児死亡への関与が推定されていたが、弱毒生ワクチンの普及により世界規模での disease burden が著しく減少したことが明らかになっている。このように、現在使用されている弱毒生ロタウイルスワクチンの有効性と安全性は高く、WHO から全ての小児に対しての接種が推奨されている。

一方、ウイルスゲノムを in-vitro で人工的に自由に改変する技術はリバーシジェネティクス系と呼ばれ、基礎ウイルス学だけでなくワクチン開発等の translational research の観点からも極めて重要な技術である。これまで多くのウイルスについてその技術開発がなされてきたが、11 分節の二本鎖 RNA をゲノムとして持つロタウイルスについては極めて困難だった。しかしながら、共同研究者である谷口、河本らのグループは、2017 年に世界で初めてサルロタウイルス (SA11 株) のリバーシジェネティクス系の開発に成功し (Kanai Y, Komoto S, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2017) 世界中から脚光を浴びている。

我々はこれまで両博士と共同で、小腸での局所感染と考えられていたロタウイルス胃腸炎の概念を覆すロタウイルス抗原血症の動態を世界で初めて報告し (Sugata K, et al. Pediatrics, 2008)、さらにはロタウイルス脳炎の病態解明や (Kawamura Y, et al. J Med Virol. 2012, Kawamura Y, et al. Brain Develop. 2013)、次世代シーケンサーを用いたウイルスゲノム解析による新規ロタウイルスの発見等 (Komoto S, et al. J Gen Virol. 2017, Tacharoenmuang R, et al. PLoS One. 2016)、ロタウイルス感染症の臨床ウイルス分野において多大な貢献をしてきた。

サル由来ロタウイルスである SA11 株を用いたロタウイルスリバーシジェネティクス系の開発を契機に、この画期的な方法の臨床応用を考案する過程で、以前から公衆衛生上極めて大きな問題とされながら未だ有効なワクチンが開発されていない性器ヘルペス予防のための HSV

ワクチン開発への応用を着想した。HSV は経粘膜感染するため粘膜免疫が感染防御に重要な役割を果たしており、これまで弱毒生ワクチンや DNA ワクチンなど数多くの HSV ワクチンが開発され、一部は臨床試験にまで至っているが未だ実用化されたものはない。そこで、本研究では安全性と有効性の証明されている弱毒生ロタウイルスワクチンをバックボーンとして、リバーシジェネティクス系を用いて HSV の感染防御に重要な HSV-2 糖タンパクの遺伝子を組み込んだリコンビナント性器ヘルペスワクチンの開発を進めることとした。

図1. 世界的に見た顕性HSV-2患者数の分布 (推計患者数: 4億1千7百万人)



2. 研究の目的

性器ヘルペスはグローバルな観点から公衆衛生上極めて重要な問題であるが、未だ有効な予防ワクチンが実用化されていない。そこで、既に有効性と安全性が確立し臨床現場で広く使用されている弱毒生ロタウイルスワクチン (RV1) を基盤として、新規に開発されたロタウイルスのリバーシジェネティクス技術を用い、これまで成功していない性器ヘルペス感染症予防を目的としたリコンビナント性器ヘルペスワクチンを開発する。

3. 研究の方法

現行の SA11 株を用いたリバーシジェネティクス技術を用いて、HSV-2 感染防御抗原とされている gC、gD、gE、gI 遺伝子を組み込んだリコンビナントウイルスを作成する。その後、安全性、免疫原性を確認したうえでチャレンジテストを行い、感染防御効果を解析する。

- (1) **HSV-2 の gC、gD、gE、gI 遺伝子クローニング**: 各抗原をコードする遺伝子に、ロタウイルスリバーシジェネティクスシステム導入に使用される制限酵素認識部位 (NotI 及び XhoI) を付加した遺伝子フラグメントを合成。これらのフラグメントをベクタープラスミド (pcDNA 3.1(-); Invitrogen, Carlsbad, CA, 米国) に挿入し、大腸菌にてクローニング。
- (2) **リバーシジェネティクスによる標的遺伝子の挿入**: SA11 株の各遺伝子分節を T7 RNA プロモーター下流に配置したプラスミド 11 本を、T7 RNA ポリメラーゼを恒常的に発現する BHK/T7-9 細胞に導入することで、11 種のロタウイルス mRNA が細胞質内に発現する。その後 CV-1 細胞と共培養することで、全 11 本のゲノム分節が cDNA 由来の組換えロタウイルスが作成できる (Kanai Y, Komoto S, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2017; Komoto S, et al. J Virol. 2017)。 (1) でクローニングした HSV-2 の各候補遺伝子を挿入した NSP1 遺伝子の T7 プラスミドを構築し、上記リバーシジェネティクス系により、HSV-2 遺伝子をコードする組

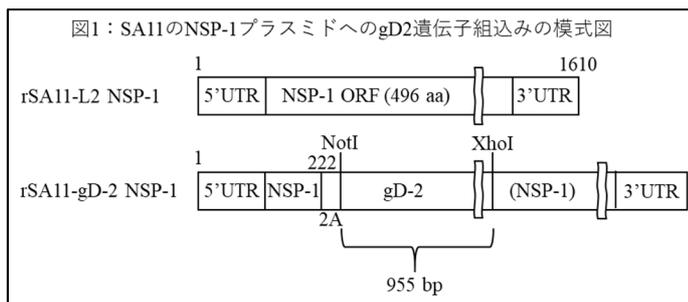
換え口タウウイルスを作成する。

- (3) **安全性・免疫原性評価**：雌乳のみ BALB/c マウスに作成した HSV-2 発現組換え口タウウイルスを経口接種。経時的（前、1 か月、3 か月、6 か月）に血清中口タウウイルス IgG、HSV IgG を測定する。
- (4) **感染防御効果の判定**：実験(3)で HSV の免疫誘導を確認後、ワクチン接種 1 か月の雌 BALB/c マウスに、マウス生殖器ヘルペスモデルとして確立されている HSV (186ΔKpn 株:米国 FDA、Phillip Krause 博士から分与) を経腔感染。経時的に腔粘膜病変をスコアリングするとともに、腔拭い液中ウイルス DNA 量を real-time PCR 法で測定する。

4. 研究成果

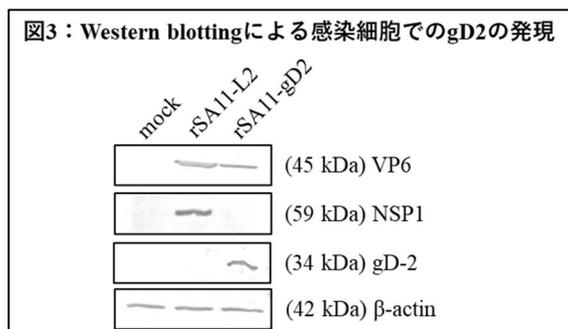
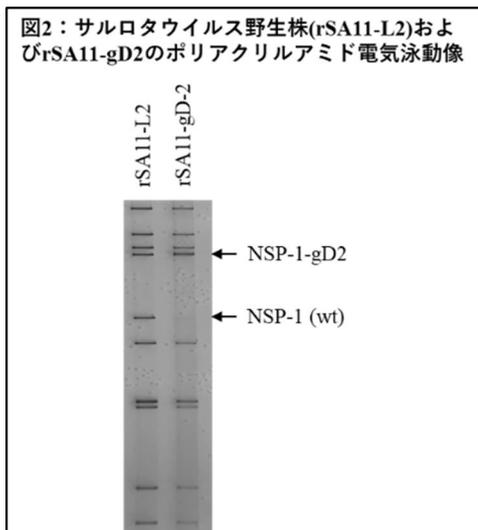
(1) HSV-2 gD 遺伝子サブクローニング

過去の HSV-2 ワクチンで候補遺伝子として使用されている gD2 を最初を選択した。約 900bp の gD 塩基配列をベクターへ組み込むために、制限酵素サイトで挟んだ gD2 発現用塩基配列を人工合成し SA11 の NSP-1 プラスミドにサブクローニングした(図 1)。



(2) gD2 組み込み口タウウイルス作成

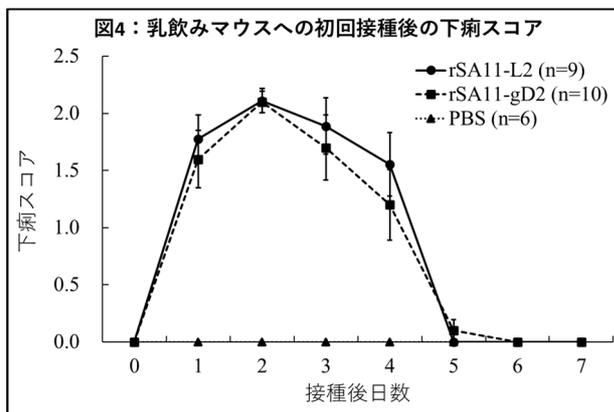
gD2 組み込み NSP-1 プラスミドを含んだ全 11 種類の SA11 遺伝子分節を組み込んだプラスミドを用い口タウウイルスリバースジェネティクスシステムにより HSV-2 gD 組み込み SA11(rSA11-gD2)を作製し(図 2)、rSA11-gD2 の HSV-2 gD 蛋白発現を *in vitro* で確認するため、CV1 細胞に rSA11-gD2 を感染させ感染細胞の培養上清を用いて Western blotting にて HSV-2 gD 蛋白の発現を確認した(図 3)。



(3) In vivo での免疫原性評価

a) 乳のみマウス

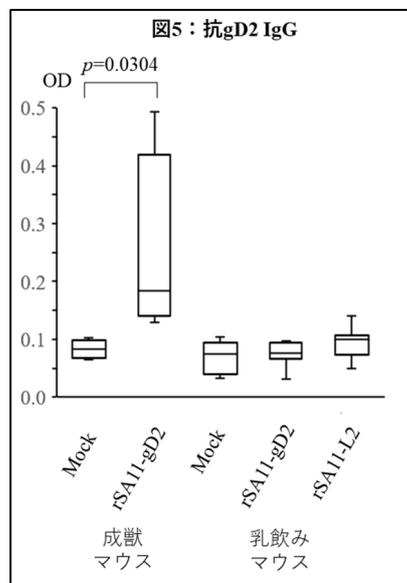
次に、*In vivo* での免疫原性を確認するため、雌 BALB/c マウスに 5 日齢、19 日齢の計 2 回 rSA11-gD2 を経口接種した。1 回目接種後の下痢スコアは野生株 SA11 感染マウスと同一だった(図 4)。しかしながら、2 回目接種後 4 週間の 47 日齢に血清を採取し中和抗体法を行ったが、4 倍希釈血清中の中和抗体は陰性だった。



乳飲みマウスより成獣マウスでの方がロタウイルス感染に対する抗体産生が高い報告を確認し(Ward RL, et al. J Virol 1990)、成獣マウス(8週齢)に4週間隔で3回 rSA11-gD2 を経口接種し、その4週後に血清を採取したが、中和抗体は2倍希釈血清でも陰性だった。

b) 成獣マウス

続けて、ELISA 法によって乳飲みマウスおよび成獣マウスでの rSA11-gD2 接種後の血清を用いて抗 gD2 IgG および IgA を測定した。IgA は有意な抗体産生が認められなかったが、IgG は成獣マウスにおいて有意な抗体産生が確認された。乳のみマウスでは、臨床症状としての下痢は惹起するものの、免疫応答が不十分で HSV-2 gD に対する抗体誘導は確認できなかった。今後は、この系を用いて腔液中の IgG、IgA 抗体価を測定し、十分な粘膜免疫応答が確認できたらチャレンジ試験へ向かう予定である。



【引用文献】

1. Analysis of rotavirus antigenemia and extraintestinal manifestations in children with rotavirus gastroenteritis. Sugata K, Taniguchi K, Yoshikawa T et al. Pediatrics 2008 ;122:392-7.
2. A role of matrix metalloproteinase in pathogenesis of *Rotavirus* antigenemia. Kawamura Y, Sugata K, Yoshikawa T et al. J Med Virol 2012 ;84:986-91. doi: 10.1002/jmv.23296
3. Nationwide survey for rotavirus-associated encephalitis/encephalopathy and sudden unexpected death in Japan. Kawamura Y, Matsuoka E, Yoshikawa T et al. Brain Develop 2013 S0387-7604(13)00234-9.
4. Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. Kanai Y, Komoto S, Taniguchi K et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2017 Feb;114(9):2349-2354.
5. A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase. Komoto S, Taniguchi K et al. J Virol Methods. 196:36-39 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshikawa Tetsushi, Ihira Masaru, Higashimoto Yuki, Hattori Fumihiko, Miura Hiroki, Sugata Ken, Komoto Satoshi, Taniguchi Koki, Iguchi Akihiro, Yamada Masafumi, Ariga Tadashi	4. 巻 91
2. 論文標題 Persistent systemic rotavirus vaccine infection in a child with X linked severe combined immunodeficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 1008 ~ 1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Upachai S, Singchai P, Ide T, Fukuda S, Ruchusatsawast K, Sriwantana B, Tatsumi M, Motomura K, Takeda N, Murata T, Sangkitporn S, Taniguchi K, Yoshikawa T.	4. 巻 92
2. 論文標題 High prevalence of equine-like G3P[8] rotavirus in children and adults with acute gastroenteritis in Thailand.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ihira Masaru, Kawamura Yoshiki, Miura Hiroki, Hattori Fumihiko, Higashimoto Yuki, Sugata Ken, Ide Tomihiko, Komoto Satoshi, Taniguchi Koki, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 64
2. 論文標題 Molecular characterization of rotaviruses obtained from patients with rotavirus associated encephalitis/encephalopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 541 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Saori, Tacharoenmuang Ratana, Ide Tomihiko, Kawamura Yoshiki, Motomura Kazushi, Tatsumi Masashi, Takeda Naokazu, Murata Takayuki, Yoshikawa Tetsushi, Uppapong Ballang, Taniguchi Koki, Komoto Satoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Full genome characterization of novel DS-1-like G9P[8] rotavirus strains that have emerged in Thailand	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0231099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井平 勝 (Ihira Masaru) (10290165)	藤田医科大学・保健学研究科・教授 (33916)	
研究分担者	三浦 浩樹 (Miura Hiroki) (10751761)	藤田医科大学・医学部・助教 (33916)	
研究分担者	東本 祐紀 (Higashimoto Yuki) (20569701)	藤田医科大学・医療科学部・助教 (33916)	
研究分担者	谷口 孝喜 (Taniguchi Koki) (40094213)	藤田医科大学・医学部・名誉教授 (33916)	
研究分担者	河本 聡志 (Komoto Satoshi) (60367711)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	
研究分担者	菅田 健 (Sugata Ken) (60454401)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------