

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07720

研究課題名(和文) 遺伝子操作による狂犬病生ワクチンの安全性の向上と免疫効果の増強

研究課題名(英文) Improved safety and immunogenicity of rabies live vaccine by a reverse genetics approach

研究代表者

伊藤 直人 (ITO, Naoto)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20334922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、狂犬病ワクチン株のERA株の遺伝子操作により、生ワクチンの安全性・免疫効果の向上を試みた。新規の弱毒変異の導入により、高度かつ安定な弱毒性状を持つ生ワクチン候補株を作ることができた。一方、コドン最適化されたG遺伝子を持つ候補株を作出したものの、G蛋白質の高発現化・免疫効果の増強は確認できなかった。以上の成績は、今後、遺伝子操作により狂犬病生ワクチンを開発する上で、重要な基盤情報となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, by using a reverse genetics system of the live rabies vaccine strain ERA, we aimed to improve safety and immunogenicity of live rabies vaccine. By introducing a novel attenuating mutation into the viral genome, we have successfully established a live vaccine candidate that is highly and stably attenuated. Meanwhile, although we have generated a candidate with codon-optimized G gene, we were not able to observe increased expression level of G protein and enhanced immunogenicity. The findings above will be important fundamental information for development of live rabies vaccines by using a reverse genetics approach in the future.

研究分野：人獣共通感染症学

キーワード：狂犬病ワクチン

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は、重篤な神経症状とほぼ 100% の高い致死率を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。ワクチンの普及が不十分な発展途上国を中心として、毎年 5.9 万人が狂犬病の犠牲になっている。したがって、ワクチン普及率の改善が狂犬病の制圧における重要かつ緊急の課題となっている。

現在、主流の不活化狂犬病ワクチンと比較して、狂犬病生ワクチンには、高い免疫効果、安価かつ経口投与が可能といった大きな利点がある半面、安全性に懸念がある。具体的には、野生動物の経口免疫に使用されている現行の生ワクチン株、SAG2 株は、ウイルス G 蛋白質 333 位 (G333) の変異 (Glu) のみにより弱毒化されている。したがって、生ワクチン接種動物の体内において、この Glu が強毒型の Arg もしくは Lys に逆変異した場合、本株は強毒化する。

SAG2 株の G333 に存在する Glu (コドン GAA) が Arg (AGA) に逆変異するためには 2 塩基置換が必要となるため、この逆変異の発生確率は低い。一方、Lys (AAA) への逆変異については、1 塩基置換で起こるため、発生リスクが高い。すなわち、SAG2 株には潜在的な安全性の懸念が存在する。本研究では、狂犬病ウイルス経口ワクチン株である ERA 株の遺伝子操作により、より安全性の高い生ワクチン候補株を作出する。具体的には、Arg および Lys への逆変異のいずれにも 2 塩基配列を必要とする Leu を G333 に導入する。さらに、以前、研究代表者らが報告した N 蛋白質上の弱毒変異 [文献 1] も同時に導入する。

狂犬病ワクチンの免疫効果は、ウイルス中和抗体誘導能に強く依存する。したがって、感染細胞において、中和抗体の標的であるウイルス G 蛋白質を高発現する生ワクチン候補株を作出することで、免疫効果の向上が期待できる。本研究では、ERA 株の G 遺伝子のコドンを哺乳類細胞に最適化することで、G 蛋白質の高発現化による免疫効果の向上が可能かどうかについても検討する。

2. 研究の目的

本研究では、高い安全性および免疫効果を有する生ワクチン候補株の開発を目的とする。具体的には、以下の 2 点の達成目標について検討を行なった。

(1) 新規の弱毒変異の導入により、高度かつ安定な弱毒化を達成する。

(2) コドン最適化により G 蛋白質を高発現させ、中和抗体誘導能の増強を達成する。

3. 研究の方法

(1) 狂犬病ウイルスの遺伝子操作

本研究では、狂犬病生ワクチン株の ERA 株の遺伝子操作系 [文献 2] を活用した。本系を用いて、G333 に Leu (コドン: UUG) を保有する ERA-G333Leu 株を作出した。な

お、SAG2 株と同じ Glu を保有する ERA-G333Glu 株 (SAG2 株のモデル) 組換え型 ERA 株については、以前の研究 [文献 3] で樹立されたものを用いた。

遺伝子操作系を活用し、コドンをマウス細胞に最適化した G 遺伝子を保有する ERA-G333Leu 株 (ERA-G333LeuCO 株) についても作出した。なお、コドン最適化については、民間企業に受託して実施した。

いずれのウイルス株も、マウス神経芽細胞腫由来の NA 細胞を用いてストックウイルスを作製した。

(2) Vero 細胞における増殖性の検討

各ウイルス株を感染多重度 0.01 にて Vero 細胞に接種し、1、3、5 および 7 日後に培養上清を回収した。各培養上清のウイルス力価を、NA 細胞を用いたフォーカス・アッセイにより測定した。

(3) マウスにおける病原性の検討

各ウイルス株を 10^6 フォーカス形成単位 (FFU) の用量で 6 週齢マウス (ddY 系統、雄) に脳内接種した。その後、接種マウスの症状、体重、発症率・生存率の推移を 14 日間記録した。マウスが重篤な神経症状を発症し、背臥から 20 秒以内に起き上がれない場合は、人道的エンドポイントの対象とした。

(4) 弱毒性状の安定性の検討

狂犬病ウイルスの弱毒性状の安定性を評価するため、標準法である哺乳マウス脳連続継代法を使用した。ERA-G333Leu 株または ERA-G333Glu 株を哺乳マウスの脳で 10 回継代することで得られた各継代株を、 10^5 FFU の用量で 6 週齢マウス (ddY 系統、雄) に脳内接種することで病原性を評価した。同時に、継代前の各株の病原性についても検討した。

また、各継代株のゲノム全塩基配列を決定するため、次世代シーケンサー解析を行なった。次世代シーケンサーとして、Ion PGM (Ion Torrent) を用いた。

(5) 中和抗体誘導能の検討

$10^3 \sim 10^6$ FFU の ERA-G333Leu 株、もしくは ERA-G333Glu 株を 6 週齢マウス (ddY 系統、雄) の大腿筋に接種した。接種 4 週間後にマウスから採取された血清に含まれる中和抗体を概ね FAVN 法 [文献 4] に準じて測定した。同時に標準血清の中和抗体価を測定し、マウス血清の中和抗体価を国際単位 (IU) /ml に換算した。

(6) 感染防御能の検討

上記の免疫マウスに 50% 致死量の 25 倍量の CVS 株を免疫マウスに 0.1 ml 筋肉内接種した。接種 14 日後の免疫マウスの生存率に基づき、各ウイルス株の感染防御能を評価した。

4. 研究成果

(1) Vero 細胞における ERA-G333Leu 株の増殖性

Vero 細胞における ERA-G333Leu 株の増殖性を、ERA 株および ERA-G333Glu 株と比較した。その結果、いずれのウイルス株も類似した増殖曲線を描き、接種後 7 日目にはウイルス力価は、 10^7 FFU/ml 以上となった。以上より、ERA-G333Leu 株の増殖性は、他株と同等であることが明らかとなった。

(2) マウスにおける ERA-G333Leu 株の病原性

マウスへの脳内接種により、ERA-G333Leu 株の病原性を ERA 株および ERA-G333Glu 株と比較した。ERA 株を接種したマウスは継続的な体重減少を示し、接種後 11 日目に全個体が死亡した。一方、ERA-G333Leu 株および ERA-G333Glu 株を接種したマウスでは、いずれの個体も発症することなく生存した。以上より、ERA-G333Leu 株は、ERA-G333Glu 株と同様に、高度に弱毒化されていることが判明した。

(3) ERA-G333Leu 株の弱毒性状の安定性

哺乳マウス脳連続継代法を用いて、ERA-G333Leu 株および ERA-G333Glu 株の弱毒性状の安定性を評価した。ERA-G333Glu 株の脳継代株は、マウスに対する致死性を獲得し、接種後 11 日目に全個体を死滅させた。一方、ERA-G333Leu 株の脳継代株は、5 個体中 2 個体に一過性の体重減少を引き起こしたものの、致死性を示すことはなかった。以上より、ERA-G333Leu 株の弱毒性状は、ERA-G333Glu 株よりも安定であることが明らかとなった。

次世代シーケンス解析の結果、脳継代により、ERA-G333Glu 株の弱毒変異 Glu が強毒型の Lys に置換したことが示された。その他、病原性への影響が不明な 1 アミノ酸置換が G102 に確認された。一方、ERA-G333Leu 株の弱毒変異の Leu は、脳継代後も維持されていた。なお、脳継代後のウイルスには、G194 に既知の強毒変異 (Lys) [文献 5] を持つウイルスが約 60% 含まれていることが分かった。以上より、ERA-G333Leu 株の弱毒変異 Leu は、Glu よりも安定であることが判明した。

(4) ERA-G333Leu 株の免疫効果

ERA-G333Leu 株および ERA-G333Glu 株 ($10^3 \sim 10^6$ FFU) をマウスに筋肉内接種することで、両株の免疫効果を比較した。両株の免疫マウスの血清の中和抗体価は、いずれの用量を免疫した場合でも同等であった。いずれの株も 10^5 および 10^6 FFU で免疫した条件で、感染防御に十分と判断される 0.5

IU/ml 以上の中和抗体をマウス全個体に誘導した。以上より、ERA-G333Leu 株は、ERA-G333Glu 株と同等の中和抗体誘導能を持つことが明らかとなった。

上記の免疫マウスに強毒の CVS 株を接種することで、ERA-G333Leu 株および ERA-G333Glu 株の感染防御能を比較した。その結果、いずれの用量で免疫した場合でも、両株免疫マウスの生存率に顕著な差は認められなかった。なお、いずれの株の免疫マウスでも、 10^5 および 10^6 FFU の免疫条件では、全個体が生存した。以上より、ERA-G333Leu 株の感染防御能は、ERA-G333Glu 株と同等であることが分かった。

以上の成績より、ERA-G333Leu 株は、ERA-G333Glu 株と同等の免疫効果を有することが明らかとなった。

(5) ERA-G333LeuCO 株の G 蛋白質発現能

ERA-G333Leu 株の免疫効果をさらに向上させることを目的として、G 蛋白質のコードンをマウスに最適化した ERA-G333LeuCO 株の作出を試みた。

最初に、コードン最適化が G 蛋白質の発現量に及ぼす影響を、プラスミド発現系を用いて検討した。コードン最適化された ERA-G333Leu 株の G 遺伝子を保有する発現プラスミドを NA 細胞に導入した場合、非最適化の G 遺伝子を持つ発現プラスミドを導入した細胞よりも約 6 倍の高い G 蛋白質の発現が確認された (図 1)。したがって、コードン最適化による G 蛋白質の高発現化が確認された。

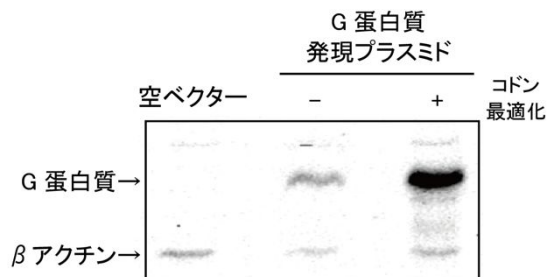


図 1. プラスミド導入 NA 細胞における G 蛋白質発現量の比較

ERA 株の遺伝子操作系を用いて、上記のコードン最適化された G 遺伝子を保有する ERA-G333LeuCO 株の作出に成功した。すなわち、G 遺伝子のコードン最適化は、ウイルスの生存性に影響しないことが判明した。次に、ERA-G333LeuCO 株に感染した NA 細胞における G 蛋白質の発現量を、ERA-G333Leu 株感染細胞と比較した。その結果、プラスミド発現系の結果とは異なり、ERA-G333LeuCO 株感染細胞において、G 蛋白質の発現上昇は確認できなかった (図 2)。むしろ、N 蛋白質を基準とした相対発現量では、ERA-G333LeuCO 株よりも ERA-G333Leu 株の G 蛋白質発現量が高い傾

向にあった。以上より、コドン最適化により G 蛋白質の発現量を増強した生ワクチン候補株は、作出することができなかった。

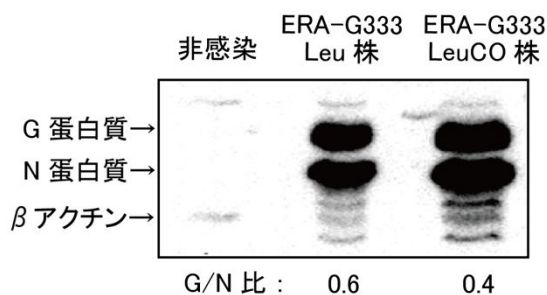


図 2. 各株感染 NA 細胞における G 蛋白質発現量の比較

(6) ERA-G333LeuCO 株の病原性および免疫効果

ERA-G333LeuCO 株の G 蛋白質発現量が ERA-G333Leu 株よりも低い傾向にあった事実より、当初の想定とは違う形で、コドン最適化が ERA-G333LeuCO 株の生物性状に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで ERA-G333LeuCO 株のマウスにおける病原性および免疫効果を検討することにした。

ERA-G333LeuCO 株を脳内接種されたマウスは、ERA-G333Leu 株感染マウスと同様に、いかなる症状も示さなかった。すなわち、コドン最適化は、ウイルスの病原性に顕著な変化をもたらさないと考えられた。

次に、マウスに筋肉内接種することで、ERA-G333LeuCO 株の感染防御能を検討した。その結果、CVS 株を用いた攻撃後の ERA-G333LeuCO 株免疫マウスの生存率は、ERA-G333Leu 株免疫マウスよりも若干高い傾向にあった(図 3)。しかし、両者の生存率に統計学的な有意差は認められなかった。以上より、コドン最適化は、ウイルスの免疫効果に影響しないと考えられた。

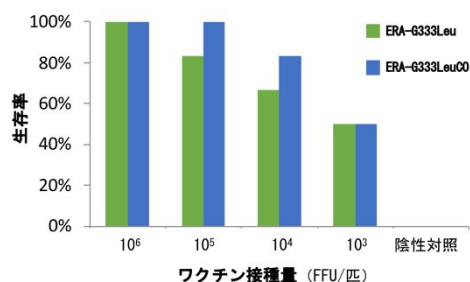


図 3. 攻撃後の免疫マウスの生存率

(7) ERA-N273/394-G333Leu 株の作出

ERA-G333Leu 株を哺乳マウス脳で連続継代した場合、G194 に強毒変異が出現し、わずかながら強毒化が確認された。そこで本株の安全性をさらに向上させる目的で、以前、研究代表者らが N 蛋白質 273 および 394 位 (N273/394) に同定した新規の弱毒変異[文

献 1] を追加で導入することにした。その結果、N および G 蛋白質の両者に弱毒変異を有する ERA-N273/394-G333Leu 株を作出することができた。

(8) 考察および今後の課題

以前の研究において、遺伝子操作により作出された新規の狂犬病生ワクチン候補株のほとんどが、G333 に SAG2 株と同じ Glu を保有する。この Glu を弱毒変異として用いた場合、2 塩基置換を要求する Arg への逆変異は起こりにくい一方、1 塩基置換で発生する Lys への逆変異の可能性は十分に考えられる。実際、研究代表者らの以前の研究[文献 3] ならびに本研究において、ERA-G333Glu 株が哺乳マウスの脳における連続継代後に G333 に Lys を獲得したことが確認されている。そこで本研究では、G333 に Leu を導入することで、Arg および Lys への逆変異のいずれにも 2 塩基置換が必要となる ERA-G333Leu 株を作出した。哺乳マウス脳連続継代法により検討した結果、ERA-G333Leu 株の弱毒性状の安定性が ERA-G333Glu 株よりも著しく高いことが判明した。以上より、G333 への Leu を導入することで、従来の SAG2 株よりも安定に弱毒化された生ワクチン候補株を得ることができると考えられた。

ERA-G333Leu 株の脳継代株は、G194 に既知の強毒変異 (Lys) [文献 5] を獲得していた。この変異を獲得した場合、G333 の弱毒変異が維持されていたとしても、ウイルスは用量非依存的な致死性をマウスに示すようになる。本研究において、ERA-G333Leu 株の脳継代株に致死性は確認されなかったものの、同継代株はわずかに強毒化していた。すなわち、ERA-G333Leu 株がマウスを発症させなかったのに対し、同継代株は一部のマウス個体に一過性の体重減少をもたらした。この強毒化に G194 の Lys が関与する可能性が考えられた。同変異がウイルスの致死性に関与する可能性を考慮すると、追加の遺伝子操作を行い、さらに ERA-G333Leu 株の安全性を高める必要があると考えられた。

本研究では、G333 に Leu を導入することで、生ワクチン株の安全性の向上を試みた。一方、Leu 以外にも Phe、Ser、Ile、Thr、Val および Ala が Arg および Lys への逆変異に 2 塩基置換を要求する。したがって、今後、これら 6 種類のアミノ酸についても、弱毒変異としての有用性を検討する必要がある。高度な弱毒化を達成しながら、G194 の Lys 変異の発生も抑制するようなアミノ酸が同定されれば理想的な弱毒変異となる。

今回、コドン最適化により G 蛋白質の発現能を高めた生ワクチン候補株を作出することで、免疫効果の強化を試みた。しかし、プラスミド発現系によりコドン最適化の効果を確認できたものの、ERA-G333LeuCO 株の G 蛋白質発現能の増強は達成できな

った。その理由は現在も不明である。以前の報告 [文献 6] では、コドン最適化を用いて CVS 株の G 蛋白質の発現量を増加させることに成功している。一方、CVS 株の G 蛋白質の発現量は、ERA 株よりも低いことが報告されている [文献 7] したがって、本来の G 蛋白質の発現量が少ない、特定のウイルス株のみ、コドン最適化による G 蛋白質の発現増強が可能であると推定された。

本研究では、ERA-G333Leu 株の安全性をさらに向上させる目的で、ERA-N273/394-G333Leu 株を作出した。以前、研究代表者らは、N273/394 への弱毒変異の導入により G194 の Lys 変異による強毒化を緩和できることを報告した [文献 3] したがって、ERA-N273/394-G333Leu 株は、ERA-G333Leu 株よりも高い安全性を持つと予想される。現在、ERA-N273/394-G333Leu 株の安全性に加え、Vero 細胞における増殖性、ならびに免疫効果について詳細に検討している。

<引用文献>

- 文献 1: Masatani *et al.*, *Virus Res.*, 2011.
文献 2: Yang *et al.*, *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2014.
文献 3: Nakagawa *et al.*, *Vaccine*, 2017.
文献 4: Cliquet *et al.*, *J. Immunol Methods.* 1998.
文献 5: Faber *et al.*, *J. Virol.*, 2005.
文献 6: Wirblich and Schnell., *J. Virol.*, 2011.
文献 7: Préhaud *et al.*, *J. Virol.*, 2003.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Nakagawa, K, Nakagawa, K, Omatsu, T, Katayama, Y, Oba, M, Mitake, H, Okada, K, Yamaoka, S, Takashima, Y, Masatani, T, Okadera, K, Ito, N, Mizutani, T, Sugiyama, M. Generation of a novel live rabies vaccine strain with a high level of safety by introducing attenuating mutations in the nucleoprotein and glycoprotein. *Vaccine*, 査読有、Vol. 35、No. 42、2017、pp5622-5628.

[学会発表](計 2 件)

出向 李恵子、伊藤 直人、岡本 卓也、岡田 和真、中川 賢人、五藤 秀男、杉山 誠、コドン最適化による狂犬病生ワクチンの免疫効果増強の試み、第 16 回狂犬病研究会、2017 年 4 月 5 日、国立感染症研究所 戸山庁舎

岡本 卓也、伊藤 直人、岡田 和真、中川 賢人、杉山 誠、安全な弱毒性状を有する狂犬病生ワクチン ERA-G333Leu 株の作出、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6

日～2016 年 9 月 8 日、日本大学 生物資源科学部

[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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 直人 (ITO, Naoto)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：20334922

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

岡田 和真 (OKADA, Kazuma)
中川 賢人 (NAKAGAWA, Kento)