

令和元年9月3日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10040

研究課題名(和文) 遺伝子工学的的手法による新規ムンプスワクチン開発

研究課題名(英文) Development of new mumps vaccine induced by genomic recombinant virus vector system

研究代表者

伊藤 尚志 (Ito, Takashi)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号：90383629

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)：ムンプスは特徴的な耳下腺炎などを呈しワクチンによる予防が必須であるが、接種後髄膜炎や高接種率地域でのアウトブレイクが絶えない。より安全性と免疫原性が高いワクチン開発を目的とし、麻疹AIK-C株をベクターとしムンプスF、HN、N蛋白を発現する組換えウイルスとAIK-C株外殻蛋白をムンプスF、HNに置き換えたキメラウイルスを作製した。各感染性ウイルス粒子を回収後、感染細胞上で各挿入蛋白発現を確認した。各ウイルスをコットンラットに筋注接種し、ムンプス血清抗体価の上昇を確認した。遺伝子工学的的手法で作製した組換えおよびキメラウイルスは、免疫原性を有した新規ムンプスワクチン候補となりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムンプスは多くが自然軽快するものの、重篤な後遺症を残す症例が存在する。またワクチン接種後の無菌性髄膜炎は接種率低下の一因と考えられる。このため、本研究で行った新規概念によるワクチン開発は、さらなる接種率の向上と感染患者数減少が期待できる。安全性が確認されている麻疹AIK-C株をベクターとし、確立したリバースジェネティクス法を用い作製する組換えウイルスと、同じパラミクソ科ウイルス弱毒生ワクチン株である麻疹AIK-CとムンプスHoshino株によるキメラウイルスは、既存のムンプス弱毒生ワクチンと比較し免疫原性を保ち、ワクチン接種による無菌性髄膜炎を引き起こさない新規ワクチン候補となり得る。

研究成果の概要(英文)：Mumps is common infection caused by mumps virus and clinically bring about parotitis. Vaccination is necessary to prevent from mumps, however, there experience meningitis after vaccination and frequent mumps outbreak. Since development of more safe and high-immunogenicity vaccine have been necessary for mumps, we construct the recombinant AIK-C measles strain which encoded the mumps F, HN and N protein, and chimeric AIK-C measles vector virus replacing their surface protein gene by mumps F and HN protein gene. After corrected each infectious virus, we checked each mumps and measles protein expression in cell which infected recombinant and chimeric virus by immune-staining and hemagglutination test. Using the cotton rat model, mumps and measles antibody were detected in serum of cotton rats intramuscularly immunized each recombinant virus. In conclusion, there are certain possibilities that each recombinant and chimeric virus can one of the effective mumps vaccine candidate.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：ムンプスウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ムンプスウイルスはパラミクソウイルス科ブラウイルス属に属し、流行性耳下腺炎(ムンプス)の原因ウイルスとして知られる。ムンプスは小児に好発し、感染したムンプスウイルスは上気道粘膜で増殖した後、耳下腺、唾液腺、中枢神経系、内耳、精巣、卵巣、乳腺などの臓器で増殖する。特に、ムンプスウイルスは中枢神経系に親和性が高く、自然感染では約 10% の頻度で無菌性髄膜炎を呈する。ムンプスの多くは自然軽快するものの、一部が無菌性髄膜炎や脳炎・脳症を発症し、さらに不可逆性の難聴や精巣炎の原因となる。ムンプス感染予防には弱毒生ワクチンが有効であり世界中でムンプスワクチンが接種されているが、ムンプスワクチンを積極的に導入している諸外国においても地域ごとにアウトブレイクの報告が相次ぎ、現行の弱毒生ワクチンの免疫原性が十分とはいえない。日本では、ムンプスワクチンは単独任意接種の扱いであり、諸外国と比べ接種率は非常に低く、年間を通してムンプス感染が報告されている。さらに、世界中で様々なムンプス弱毒生ワクチンが用いられているが、それぞれ一定の割合でワクチン接種後の無菌性髄膜炎発症が報告されている (Anders H, et al. Lancet. 2008)。このため、高い免疫原性を保持し、無菌性髄膜炎を生じないワクチン開発が望まれるが、従来の弱毒生ワクチン株の開発方法では免疫原性、弱毒化の安全域が狭く、新規概念によるムンプスワクチン開発が必要である

2. 研究の目的

従来の弱毒生ワクチンと異なる遺伝子工学的手法を用いた新規ムンプスワクチン作製を研究目的とする。麻疹 AIK-C 株をウイルスベクターとし、ムンプスワクチン株 (Hoshino 株) の外殻蛋白で中和活性を担う F、HN 蛋白領域、細胞障害性 T リンパ球活性のターゲットと考えられる NP 蛋白領域をそれぞれ遺伝子工学的的手法により挿入した組換えウイルス、麻疹 AIK-C 株の F、H 蛋白遺伝子の ectodomain (細胞外領域) をムンプスウイルス F、HN 蛋白の ectodomain に置き換えたキメラウイルス、をそれぞれ作製し、各々の免疫原性を検討した。

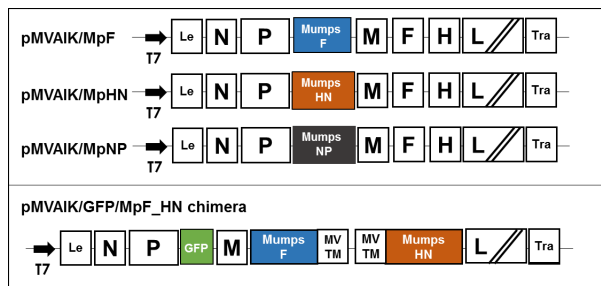
3. 研究の方法

本研究期間内で、(1)組換えウイルス (MVAIK/MpF, HN, NP)、キメラウイルス (MVAIK/MpF_HN chimera) の作製、(2)感染細胞における各組換えおよびキメラウイルスの性状解析、(3)コottonラットへの接種および免疫原性の解析、を行った。

(1) 組換えウイルス (MVAIK/MpF, HN, NP)、キメラウイルス (MVAIK/MpF_HN chimera) の作製

ムンプス F、HN、NP 領域遺伝子クローニング後、組換えウイルスおよびキメラウイルスの全長 cDNA 構築を行った (図 1)。リバーシジェネティック法で、各感染性ウイルス粒子を回収した。

図 1 組換えウイルス、キメラウイルス全長 cDNA



(2) 感染細胞における各組換えおよびキメラウイルスの性状解析

各組換えウイルスを Vero、B95 細胞へ感染させ、特異抗体を用いた免疫染色を行い、各々の発現蛋白を確認した。キメラウイルスも同様に回収したウイルスを Vero 細胞に感染させ、特異抗体を用いた免疫染色、モルモット赤血球を用いた赤血球凝集試験を行い、各蛋白発現を確認した。さらに 33、35、37、39 条件下で感染細胞を培養し、特異的細胞変性効果 (CPE) をもとに、各キメラウイルスの温度感受性を確認した。

(3) コottonラットへの接種および免疫原性の解析

麻疹感受性動物として知られるコottonラットに、各組換えウイルスとキメラウイルスを接種し、経時的血清抗体価を測定した。

4. 研究成果

当初の予定通り、組換えウイルス (MVAIK/MpF, HN, NP)、キメラウイルス (MVAIK/MpF_HN chimera; chimera F+HN) の全長 cDNA を作製、リバーシジェネティック法を用い感染性ウイルス粒子を回収した。キメラウイルスは詳細な解析を行うため、さらに麻疹 F 蛋白のみムンプス F 蛋白に置換したキメラウイルス (MVAIK/MpF_F chimera: chimera F) と、同様に麻疹 H 蛋白のみムンプス HN 蛋白に置換したキメラウイルス (MVAIK/MpH_HN chimera: chimera HN) を作製、ウイルス回収後、感染細胞を用いて免疫染色を行った。キメラウイルスの感染細胞における

免疫染色の結果を図2に示す。いずれのキメラウイルスも抗麻疹N蛋白抗体で染色を認めるのに対し、抗麻疹H蛋白抗体では麻疹H蛋白を発現する chimera Fのみ染色を認める。モルモット赤血球を用いた赤血球凝集試験の結果(図3) ムンプスHN蛋白を有するムンプスワクチン株、野生株、chimera F+HN、chimera HNのみ特有の赤血球凝集(HA試験陽性)を認めることがわかった。

図2 キメラウイルス感染細胞における免疫染色 (Vero細胞 2×10^5 fixed, m.o.i. 0.1)

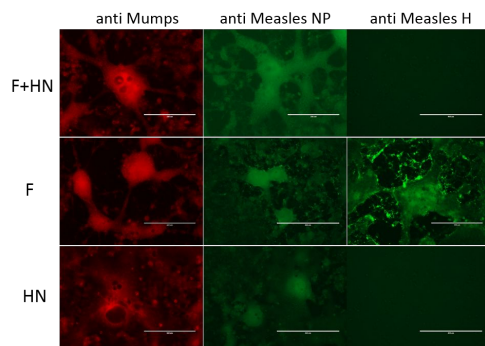
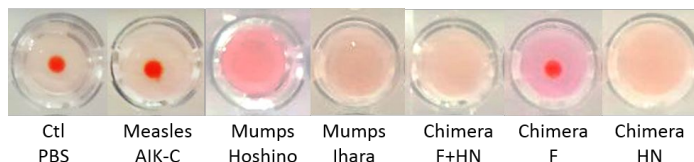


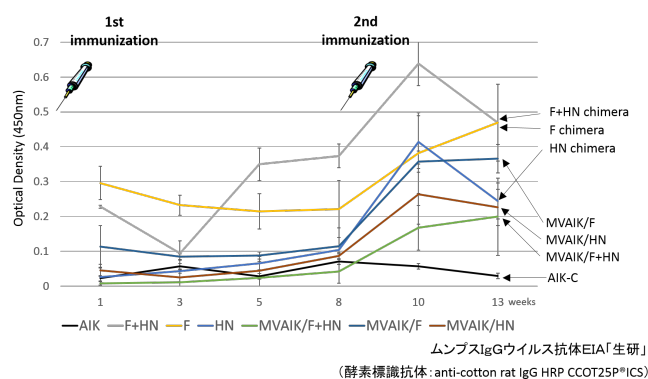
図3 赤血球凝集試験 (guinea pig 0.4% RBC solution)



さらに、33、35、37、39条件下で感染細胞を培養し、特異的細胞変性効果を判定したところ、ムンプスHoshino株は全ての温度でウイルス増殖を認めるのに対し、麻疹AIK-C株、各キメラウイルスは39でウイルス増殖を認めないことがわかった。以上より、作製したキメラウイルスは、当初の設計通り外殻蛋白のみ麻疹からムンプスウイルスに置き換わり、それ以外は麻疹ワクチン株の性状を保持したウイルスであることが確認された。

作製した組換えウイルスとキメラウイルスをコットンラットに筋注接種し、血清抗体価を測定した(図4)。陰性コントロールの麻疹AIK-C群に比較し、各組換えウイルスおよびキメラウイルスで抗体価は上昇し、特に2回目追加接種後さらに上昇を認めた。

図4 ムンプス血清抗体価 (EIA法)



これらの結果を踏まえ、現在細胞免疫能測定、組織サイトカイン測定などを行っている。本研究で作製した組換えおよびキメラウイルスは、免疫原性を保持した新規ワクチン候補となり得ることが示唆され、今後既存の弱毒生ワクチンとの比較検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

発表者 伊藤尚志、発表演題「麻疹AIK-C外殻タンパク細胞外ドメインをムンプスHoshino株F、HNタンパクに組換えたキメラウイルスの開発」第20回日本ワクチン学会 2016年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：澤田 成史
ローマ字氏名：Sawada Akihito
所属研究機関名：北里大学
部局名：北里生命科学研究所
職名：助教
研究者番号（8桁）：40726535

研究分担者氏名：中山 哲夫
ローマ字氏名：Nakayama Tetsuo
所属研究機関名：北里大学
部局名：北里生命科学研究所
職名：特任教授
研究者番号（8桁）：60129567

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。