

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380110

研究課題名 (和文) レトロウイルスを用いた DNA ワクチンに代わる新たな RNA ワクチンの開発

研究課題名 (英文) Development of RNA vaccine with fish retrovirus, a substitution of DNA vaccine, for fish viral diseases

研究代表者

西澤豊彦 (NISHIZAWA TOYOHICO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：10222184

研究分野：魚類病原微生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ワクチン・魚類ウイルス病・感染防御・レトロウイルス

## 1. 研究計画の概要

近年、魚介類の増養殖事業の発展につれウイルス病の発症件数が著しく増加し、これらウイルス病対策の確立が緊急かつ重要な課題となっている。ウイルス病の多くは、薬剤による治療が困難なことから、飼育環境からの原因ウイルスの排除を中心とした防除対策が確立されてきたが、他方では積極的な予防法であるワクチンの開発が切望されている。現在までに、マダイイリドウイルスの不活化ワクチンが市販され、サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (IHN) やヒラメのウイルス性出血性敗血症 (VHS) では DNA ワクチンの開発が進められ、各々感染防御効果が確認されている。しかしながら、不活化ワクチンは抗原となるウイルスを培養するために生産コストが高く、またウイルスに対する感染防御で重要と考えられている細胞性免疫の誘導には不向きである。一方、遺伝子組換え体である DNA ワクチンは、細胞性免疫の誘導に有効であるが、食の安全の面で実用化には多くのハードルが残されている。

そこで本研究では、従来のコンセプトと異なる新しいワクチン「RNA ワクチン」の開発・確立を目標とした。RNA ワクチンとは、発現させたい感染防御抗原遺伝子を mRNA としてウイルス粒子にパッキング後供給し、感染防御抗原遺伝子を標的細胞で発現させ、DNA ワクチンと同様の免疫を誘導するものである。具体的には、魚類のレトロウイルスである SnRV を RNA パッキング用ウイルス粒子原に用い、我が国の水産増養殖で甚大な被害をもたらしている IHNV、VHSV あるいは魚類ノダウイルス

(NNV) の RNA ワクチン開発を目指すものである。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 各ウイルス遺伝子のクローニング：レトロウイルスである SnRV の LTR、LTR+ $\phi$  配列および GagPol 遺伝子を、また IHNV、VHSV および魚類ノダウイルスの感染防御遺伝子を各々クローニングした。さらに、パッキング粒子産生用遺伝子として LTR-GagPol-LTR 等を、またパッキング用遺伝子として  $\phi$  配列を有する各ウイルス感染防御遺伝子を、各々 pCR-GFP プラスミドに組み込み、真核細胞における発現系を構築した。(2) 標的遺伝子をパッキングしたリアソータント粒子の形成：Lipofectamin および UV-不活化 SnRV を用いることで、魚類由来細胞である BF-2 細胞に標的遺伝子を効率よくインテグレーションさせる系を確立した。さらに、形質転換細胞を Geneticin (250  $\mu$ g/mL) 含有培地で 7～10 日間培養することにより標的細胞のクローニングが可能であることを確認した。

(3) *In vitro* におけるリアソータント粒子の感染性：リアソータント粒子を BF-2 細胞に接種することで、パッキングされた標的遺伝子が発現することを確認した。ただし、その発現量は微量であった。(4) レトロウイルスを応用した RNA ワクチンは、感染防御遺伝子を用いた「mRNA 型」のワクチンであるが、本研究過程で「ds-RNA 型」の RNA ワクチンを考案した。さらに、本「ds-RNA 型」ワクチンの感染防御効果が予想以上に高いことを実験的に確認した。「ds-RNA 型」ワクチンは、「mRNA 型」に比べ開発が容易であること、また様々なウイルス病への応用も可能であることから、現場での実用性の点で極めて有望な RNA ワクチンである

と考えられた。

### 3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

研究の進捗状況で示した如く、当初計画していた研究項目の目標は、おおむね達成したと考えている。但し、SnRV 粒子を用いた RNA ワクチンの発現効率が予想以上に低かったこと、また SnRV の感染宿主域が予想以上に狭まったことなど予想しなかった課題が新たに生じた。本ワクチンを養殖現場で使用するためには、これらの課題が大きな障害となる。本研究では、SnRV を用いた RNA ワクチン (m-RNA 型) の課題を克服するために、「ds-RNA 型」の RNA ワクチンを考案し、その効果について検討した。その結果、「ds-RNA 型」ワクチンの感染防御効果が予想以上に高いことが認められた。今後詳細な研究が必要ではあるが、本「ds-RNA 型」ワクチンが考案したことで、当初の計画以上に進展したと自己評価した。

### 4. 今後の研究の推進方策

「ds-RNA 型」ワクチンとは、本研究で開発してきた「mRNA 型」ワクチンの発想を発展させたものである。インターフェロン (IFN) 誘導物質である ds-RNA を投与することで魚を抗ウイルス状態とし、この間に養殖環境に存在する病原ウイルスで暴露することで、ウイルスによる魚の死亡を制御しながらウイルス感染を成立させ、最終的には病原ウイルスに対する免疫を成立させようとするものである。本法は「mRNA 型」ワクチンと比べ以下の点で優れている。(1) 遺伝子組み換え技術を必要としないこと、(2) ウイルスの培養ならびに不活化を必要としないこと、(3) 接種後速やかに消失するという RNA ワクチン最大の利点を継承していること、(4) 多様な魚種とウイルスに応用可能であることから、養殖現場での実用化が十分可能な「RNA ワクチン」である。今後は、「ds-RNA 型」ワクチンの実用化を視野に入れた研究を推進する予定である。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 11 件)

- 1) Kokawa, Y., Takami, I., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) A mixed infection in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* affected with viral nervous necrosis (VNN). *Aquaculture*, 284, 41-45. (査読有り)
- 2) Nishizawa, T., Kokawa, Y., Wakayama, T., Kinoshita, S. and Yoshimizu, M.

(2008) Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently infected with snakedhead retrovirus (SnRV). *Dis. Aquat. Org.*, 79 19-25. (査読有り)

- 3) Kim, W.-S., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2007) Non-specific adsorption of fish immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells. *Dis. Aquat. Org.*, 78, 55-59. (査読有り)
- 4) Kim, W.-S., Nishizawa, T., Oh, M.-J., Park, J.-W., Kurath, G. and Yoshimizu, M. (2007) Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) based on the glycoprotein gene. *Arch. Virol.*, 152: 2119-2124. (査読有り)
- 5) Nishizawa, T., Savaş, H., Işıdan, H., Üstündağ, C., Iwamoto, H. and Yoshimizu, M. (2006) Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from free-living turbot *Psetta maxima* in Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2373-2378. (査読有り)
- 6) Nishizawa, T., Kinoshita, S., Higashi, S., Kim, W.-S. and Yoshimizu, M. (2006) Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, 71, 267-272. (査読有り)

[学会発表] (計 18 件)

- 1) Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) Molecular Epidemiology of fish RNA viruses in the Far Eastern Asia. The 5th World Fisheries Congress, October 20-24, Yokohama, Japan.
- 2) Kim, H.J. and 3 others (2008) A live-vaccine of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. The 5th World Fisheries Congress, October 20-24, Yokohama, Japan.
- 3) Kokawa, Y. and 3 others (2008) A mixed infection in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* affected with viral nervous necrosis (VNN). The 5th World Fisheries Congress, October 20-24, Yokohama, Japan.
- 4) Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2007) Molecular Epizootiology of fish diseases by RNA viruses in the Far Eastern Asia. The 7th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. April 22-25, Oslo, Norway.