

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02342

研究課題名（和文）遺伝子操作系によるロタウイルス・ワクチン開発プラットフォームの確立

研究課題名（英文）Establishment of the system for developing rotavirus vaccines by using a reverse genetics system

研究代表者

杉山 誠（Sugiyama, Makoto）

岐阜大学・大学本部・副学長

研究者番号：80196774

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、鳥類由来ロタウイルスA（RVA）P0-13株の高い増殖性に着目し、本株の遺伝子操作系を樹立した上で、野外流行株の多様な抗原性に対応する実用的なワクチン開発に応用することを目的とした。P0-13株の各ゲノムRNA分節を発現するプラスミドを培養細胞内に導入した結果、感染性ウイルスの回収が確認できた。すなわち、P0-13株の遺伝子操作系を樹立することに成功した。プラスミドから回収されたウイルスは、親株と同様の遺伝子構成および生物性状を有していることが確認された。さらに、本系におけるウイルス回収効率を向上させた上で、任意の遺伝子変異を有するウイルスの作出にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において樹立したP0-13株の遺伝子操作系は、鳥類由来RVAでは世界で初めての成功である。本系は、野外流行株の様々な抗原性を付与したロタウイルスワクチンを開発する上で極めて有用なツールになると期待できる。また、鳥類由来ウイルスを含むRVA全般の複製および病原性に関する分子機序を解明する上でも極めて重要な技術基盤となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, focusing on the avian rotavirus A (RVA) P0-13 strain, which propagates efficiently in culture cells, we tried to establish a reverse genetics system of this strain and then to employ the system for developing rotavirus vaccines with various antigenicities of field epidemic strains. After introducing plasmids expressing genomic RNA segments of the P0-13 strain into cultured cells, we found that infectious viruses were recovered, indicating successful establishment of a reverse genetics system of the P0-13 strain. We confirmed that the virus recovered from the plasmids had the same genetic composition and biological properties as the parent strain. Furthermore, after improving virus recovery efficiency in this system, we succeeded in producing a mutant having a discretionary nucleotide substitution.

研究分野：人獣共通感染症学

キーワード：ロタウイルス ワクチン 遺伝子操作系

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルス A (RVA) 感染症は、ヒトを含む動物の主に幼若個体が罹患するウイルス性急性胃腸炎である。細菌などの二次感染により重症化した場合、死に至る症例もある。したがって、RVA 感染症は、公衆衛生および家畜衛生の両者において重要な疾病に位置づけられる。

現在までに、ヒトや一部の家畜を対象としたロタウイルスワクチンが実用化されている。一方、いずれのワクチンも生産性、免疫効果、安全性などに改善すべき点がある。例えば、①大部分のウイルス株の組織培養での増殖性が低いため、ワクチンの生産性の確保が困難であること、②野外流行株と高い抗原適合性を持つワクチン株の選択が困難であること等が問題点として挙げられる。

以前、研究代表者らの研究室では、我国のドバトの糞便より RVA の P0-13 株の分離に成功した。その後の検証により、組織培養における P0-13 株の増殖性は、他のウイルス株と比較して非常に高いことが判明した。このような本株の特性は、ワクチンの生産性向上において極めて有用である。その一方で、P0-13 株の抗原性状は、哺乳動物由来ウイルスと大きく異なる。本株をワクチン株とするためには、遺伝子改変により P0-13 株の抗原性状をこれらの野外流行株に適合させる必要がある。すなわち、P0-13 株をロタウイルスワクチン開発に応用するためには、本株の遺伝子操作系の樹立が必須となる。

2. 研究の目的

本研究では、増殖性が極めて高い P0-13 株の遺伝子操作系を樹立した上で、高い増殖性を有し、かつ防御抗原領域が組み換え可能な同株、すなわち流行している RVA の多様な抗原性に対応する実用的なワクチン株の作出系「ワクチン開発プラットフォーム」を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) P0-13 株の遺伝子操作系の確立

サル由来 RVA である SA11 株の遺伝子操作系[文献 1]に準じて、P0-13 株の本系の確立を試みた。すなわち、以前、当研究室において構築した P0-13 株の各ゲノム分節を発現する計 11 種類のプラスミド（ゲノムプラスミド）を、T7 RNA ポリメラーゼ恒常発現する BHK/T7-9 細胞に導入した後、同細胞を CV-1 細胞と共培養した。その後、共培養した細胞の凍結融解液を MA104 細胞に接種し、細胞変性効果（CPE）の出現の有無を判定した。CPE が観察された細胞の培養上清を MA104 細胞に接種し、VP6 に対する単クローン抗体を用いた免疫染色を実施することで、感染性ウイルス（rP0-13 株）の回収の成否を判断した。この実験を繰り返し実施することで、rP0-13 株の回収効率の評価を実施した。回収された rP0-13 株を再度、MA104 細胞に接種することでストックウイルスを調整した。

(2) rP0-13 株のゲノム構成および生物性状の検討

rP0-13 株のストックウイルスから抽出されたゲノム RNA の電気泳動パターンを親株 (wtP0-13 株) および SA11 株と比較した。また、培養細胞における rP0-13 株および wtP0-13 株の増殖性を比較した。具体的には、各株を MA104 細胞に接種し (MOI=0.01)、感染 0、1、2、3 日後における培養上清のウイルス感染価を測定した。さらに、上記の感染 MA104 細胞に出現した各株の CPE の形態を比較した。

(3) rP0-13 株 VP4 および NSP4 遺伝子へのマーカー配列の導入

rP0-13 株がプラスミドから回収されたことを証明するため、wtP0-13 株が保有しない配列、いわゆる遺伝子マーカーを rP0-13 株のゲノムに導入することを試みた。具体的には、wtP0-13 株の VP4 遺伝子上に存在する制限酵素 PstI サイトを消失させる同義置換をゲノムプラスミドに導入した。同様に、wtP0-13 株 NSP4 遺伝子上に存在する EcoRV サイトを消失させたゲノムプラスミドも構築した。これらのマーカー保有ゲノムプラスミドを、前述の方法に従って、他の 10 分節のゲノムプラスミドと共導入することで、感染性ウイルスの回収を試みた。

(4) rP0-13 株の回収効率の改善

Sánchez-Tacuba ら[文献 2]の報告した SA11 株の遺伝子操作系改良法に概ね準じて、rP0-13 株の回収効率の改善を試みた。すなわち、培養細胞へのプラスミド導入の際に、計 11 種類のゲノムプラスミドに加えて、RNA キャッピング酵素と T7 ポリメラーゼをそれぞれ発現するプラスミド 2 種を追加導入した。5 回の繰り返し実験により、本改良法による感染性ウイルスの回収成功率を算出した。

(5) rP0-13 株 NSP5 遺伝子へのマーカー配列の導入

wtP0-13 株 NSP5 遺伝子上の EcoRI サイトを消失させる同義置換をゲノムプラスミドに導入した上で、上記の改良法を用いて、上記遺伝子マーカーを保有する rP0-13 株 (rP0-13m 株) を作出した。rP0-13m 株および wtP0-13 株のゲノム RNA を鋳型として RT-PCR 法により NSP5 遺伝子 cDNA を増幅した。その後、同 cDNA に対して EcoRI 処理を行うことで、マーカー配列の有無を確認した。さらに、常法に従い、上記 cDNA の塩基配列を決定することでマーカー配列を確認した。

(6) rP0-13m 株のゲノム構成および生物性状の検討

rP0-13 株に対して実施した前述の方法により、rP0-13m 株のゲノム構成および生物性状を検討した。

4. 研究成果

(1) P0-13 株の遺伝子操作系の確立

凍結溶解液の接種の翌日から MA104 細胞に、細胞の円形化・剥離を特徴とする明瞭な CPE が確認された。接種後 2~3 日目には、培養容器内のほぼすべての細胞が CPE によって剥離した。一方、陰性対照では、観察期間を通して CPE は認められなかった。また、CPE を示した細胞の培養上清を接種した MA104 細胞において、ウイルス抗原 (VP6) に陽性を示す細胞が複数確認された (図 1)。なお、これらのウイルス回収実験は、wtP0-13 株を保有しない研究分担者の研究室で実施されたため、同株のコンタミネーションの可能性はない。以上の成績より、ゲノムプラスミドの細胞内導入によって、感染性を持つ rP0-13 株が回収されたことが明らかとなった。すなわち、P0-13 株の遺伝子操作系の確立に成功した。

一方、上記の遺伝子操作系を用いてウイルス回収実験を繰り返し実施した結果、その効率が極めて低いことが明らかとなった。具体的には、ほぼ同一の条件で計 15 回のウイルス回収実験を繰り返した結果、rP0-13 株の回収したのはわずか 3 回であった。

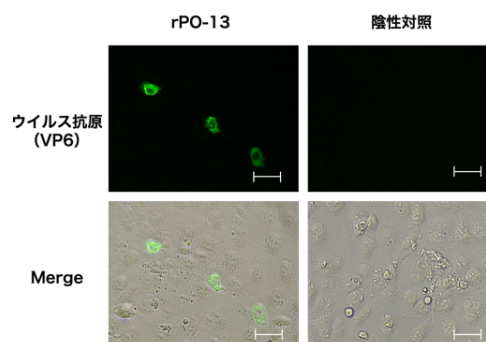


図1. rP0-13株を接種したMA104細胞に認められたウイルス抗原陽性細胞

rP0-13株をMA104細胞に接種した後、細胞に重層培地を加え、37°Cで培養した。2日後に、この細胞を用いて間接蛍光抗体法を行った。その際、一次抗体として抗P0-13株VP6単クローン抗体を使用した。また、ウイルス希釈液を接種された細胞を陰性対照として用いた。バーは50μmを示す。

(2) rP0-13 株のゲノム構成および生物性状の検討

上記の実験によって作出された rP0-13 株のゲノム構成を wtP0-13 株と比較するため、両株のゲノム RNA の電気泳動パターンを比較した。rP0-13 株のゲノム RNA の電気泳動パターンは、wtP0-13 株のものと同一であり、サル由来 SA11 株のパターンとは異なっていた。(図 2)。

さらに、両株の生物性状を比較するため、MA104 細胞における増殖曲線を作成し比較した (図 3)。その結果、rP0-13 株の増殖曲線は、wtP0-13 株のものと極めて類似していた。接種 5 日目の培養上清中の rP0-13 株の感染価 (5.7×10^6 FFU/ml) は、wtP0-13 株 (6.7×10^6 FFU/ml) と同等であった。また、MA104 細胞に出現した両株の CPE の形態にも顕著な差は認められなかった (データ未掲載)。

以上の成績より、rP0-13 株のゲノム構成および生物性状が wtP0-13 株と極めて類似していることが明らかとなった。

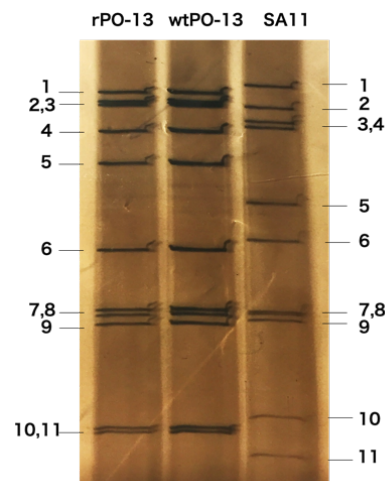


図2. 各株のゲノムRNAの泳動パターン

8%ポリアクリルアミドゲルを用いて、rP0-13株、wtP0-13株およびSA11株から抽出されたゲノムRNAの電気泳動を行った。左右に遺伝子分節を番号で示した。

(3) rP0-13 株 VP4 および NSP4 遺伝子へのマーカー配列の導入

次に、rP0-13 株に遺伝子マーカーを導入することを試みた。最初に、VP4 をコードするゲノムプラスミドに同義置換を導入した上で、感染性ウイルスの回収を行った。その結果、同一条件で実施した遺伝子マーカーを保有しない rP0-13 株の回収には成功したものの、複数回の試行にもかかわらず、遺伝子マーカーを有するウイルスの回収には至らなかった。次に、マーカーの導入部位がウイルス回収の成否に影響した可能性を考慮し、NSP4 遺伝子への同義置換の導入も試みたものの、成功には至らなかった。以上より、本研究では、VP4 および NSP4 遺伝子にマーカー配列を有する P0-13 株を作出することができなかった。

(4) rPO-13 株の回収効率の改善

最近、Sánchez-Tacuba ら[文献 2]が SA11 株の遺伝子操作系の改良法を樹立したことを報告した。この報告では、ゲノムプラスミドからのゲノム RNA の転写およびその翻訳を促進する目的で、T7 RNA ポリメラーゼおよび RNA キャッピング酵素を発現するプラスミドを、11 種類のゲノムプラスミドと共導入する方法が使用されている。

そこで上記の改良法に準じて、rPO-13 株の遺伝子操作系の改良を試みた。その結果、5 回の繰り返し実験のすべてにおいて、同株の回収に成功した。一方、従来法によりウイルス回収を試みた結果、5 回の実験のうち 2 回のみで成功が確認された。以上の成績より、rPO-13 株の遺伝子操作系において、ウイルス回収効率を著しく向上させることに成功した。

(5) rPO-13 株 NSP5 遺伝子へのマーカー配列の導入

上記で樹立された rPO-13 株の遺伝子操作系改良法を用いて、遺伝子マーカーを有する rPO-13 株の作出を試みた。その際、NSP5 遺伝子をマーカー挿入の対象として選択した (図 4)。wtPO-13 株 NSP5 遺伝子に存在する EcoRI サイトを消失させる同義置換をゲノムプラスミドに導入した後、これを他の 10 種類のゲノムプラスミドと培養細胞に共導入することで感染性ウイルス (rPO-13m 株) の回収を試みた。その結果、凍結溶解液を接種した MA104 細胞に明瞭な CPE が出現し、その培養上清中に感染性を有する rPO-13m 株が存在することが確認された。

次に、rPO-13m 株が遺伝子マーカーを保有するかどうかを検討する目的で、同株のストックウイルスから抽出されたゲノム RNA を鋳型として RT-PCR 法を行い、NSP5 遺伝子領域 cDNA を増幅した。その結果、予想されるサイズと一致した約 0.7 kbps の DNA の増幅が認められた (図 4B、レーン 5)。同様の方法で得られた wtPO-13 株および rPO-13 株の増幅 cDNA が EcoRI 処理によって切断されたのに対し (レーン 2 および 4)、rPO-13m 株の cDNA は切断されなかった (レーン 6)。さらに、シークエンス解析により、rPO-13m 株 NSP5 遺伝子には EcoRI サイトが存在しないことが確認された (データ未掲載)。以上より、rPO-13m 株は、NSP5 遺伝子に目的の遺伝子マーカーを保有していることが明らかとなった。

(6) rPO-13m 株のゲノム構成および生物性状の検討

rPO-13m 株のゲノム構成を wtPO-13 株および rPO-13 株と比較する目的で、各株のゲノム RNA の電気泳動パターンを検討した。その結果、各株のゲノム電気泳動パターンに顕著な違いは認められなかった (データ未掲載)。さらに、MA104 細胞における各株の増殖曲線は、極めて類似していることが明らかとなった (データ未掲載)。また、MA104 細胞に出現した各株の CPE の形態に顕著な違いは認められなかった (データ未掲載)。以上の成績より、rPO-13m 株は、wtPO-13 株および rPO-13 株と類似したゲノム構成および生物性状を有することが示された。

(7) 考察および今後の課題

本研究では、鳥類由来 RVA の PO-13 株の遺伝子操作系を確立した。これまで、鳥類由来 RVA の本系の樹立を試みた報告[文献 3]があるものの、その樹立に成功したという報告は存在しない。したがって本課題は、鳥類由来 RVA の遺伝子操作系の樹立に成功した世界で初めての研究

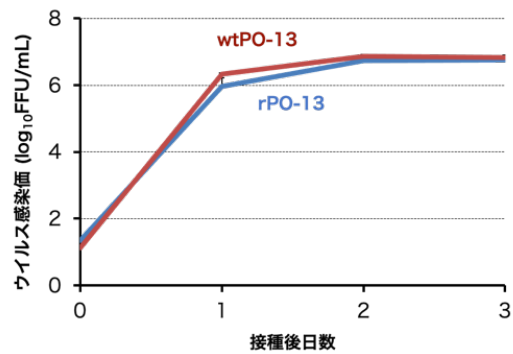


図3. MA104細胞におけるrPO-13株およびwtPO-13株の増殖曲線

rPO-13株およびwtPO-13株をMOI = 0.01の条件でMA104細胞に接種し、フォーカスアッセイにより接種後0、1、2および3日の培養上清のウイルス感染価を測定した。エラーバーは標準誤差を示す。

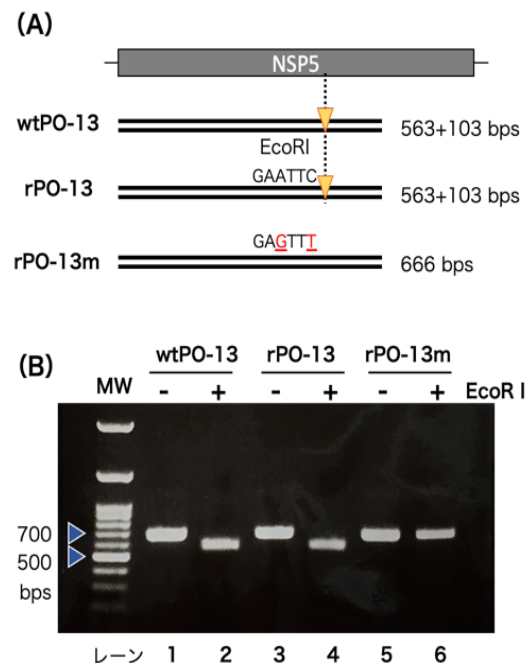


図4. rPO-13m株NSP5遺伝子上のマーカー配列の確認

(A) RT-PCR法によるNSP5遺伝子の増幅領域およびrPO-13m株に導入した遺伝子マーカー (赤字) の位置関係
(B) 増幅産物を制限酵素EcoRIで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、マーカー配列の存在を確認した。MW: 分子量マーカー

である。

本研究において当初樹立された P0-13 株の遺伝子操作系には、ウイルスの回収効率が低いという問題が存在した。一方、Sánchez-Tacuba らの報告[文献 2]を参考として、T7 RNA ポリメラーゼおよび RNA キャッピング酵素を発現するプラスミドを本系に応用した結果、ウイルス回収効率に著しい改善が認められた。すなわち、従来法では、ゲノムプラスミドからの RNA の転写効率の低さ、ならびにその転写産物の翻訳効率の低さがウイルス回収に影響したことが強く示唆された。T7 RNA ポリメラーゼおよび RNA キャッピング酵素のどちらが rP0-13 株の回収効率の改善に大きく寄与したかという点については、今後、検討を行う予定である。

本研究では、樹立された遺伝子操作系（従来法）を用いて、VP4 および NSP4 遺伝子にマーカ配列を有する P0-13 株の作出を試みたものの、いずれも成功には至らなかった。一方で、改良された本系を用いて、NSP5 遺伝子にマーカ配列を有する rP0-13m 株の作出には成功した。これらの成績は、VP4 および NSP4 遺伝子に導入したマーカ配列がそれぞれの遺伝子機能に何らかの影響を及ぼし、結果としてウイルスが回収できなかった可能性を示している。同時に、従来法のウイルス回収効率が低かったことで、これらの遺伝子にマーカを持つウイルスが回収できなかった可能性もある。これらの可能性を検証するためには、改良された遺伝子操作系を用いて、VP4 および NSP4 遺伝子にマーカ配列を有する P0-13 株の回収が可能かどうか検討する必要があると考えられた。

今回、P0-13 株の遺伝子操作系の樹立に成功したことにより、本研究課題の大きな目標のひとつを達成することができた。一方で、本系のウイルス回収効率の改善および遺伝子マーカの挿入に予想以上に多くの時間が必要となったため、本系を用いたロタウイルスワクチンの開発については十分に進展しておらず、今後の課題となっている。現在、当初の計画に基づき、ヒト由来 RVA の Wa 株の抗原性を P0-13 株に付与したキメラウイルスの作製を実施している。

[引用文献]

- 文献 1: Komoto *et al.*, J. Virol. 2017
文献 2: Sánchez-Tacuba *et al.*, J. Virol. 2020
文献 3: Patzina-Mehling *et al.*, Virus Res. 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱田 七々実、福田 佐織、河本 聡志、岡田 和真、西山 祥子、伊藤 直人、高橋 龍樹、杉山 誠
2. 発表標題 トリロタウイルスP0-13株におけるリバースジェネティクス法の確立
3. 学会等名 第162回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田茉莉花、福田佐織、藤井祐至、濱田七々実、西山祥子、高橋龍樹、河本聡志、杉山誠、伊藤直人
2. 発表標題 リバースジェネティクス法を用いた鳥類ロタウイルスP0-13株への遺伝子マーカーの導入
3. 学会等名 第164回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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	伊藤 直人 (Ito Naoto) (20334922)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	
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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	西山 祥子 (Nishiyama Shoko) (90817058)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (13701)	
研究分担者	岡田 和真 (Okada Kazuma) (50806354)	岐阜大学・応用生物科学部・研究員 (13701)	

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