

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08457

研究課題名(和文) 迅速な組換え生ワクチン作製を可能とするプラットフォームの開発と検証

研究課題名(英文) Development and validation of a platform for rapid production of vaccinia virus-based recombinant live vaccine

研究代表者

吉河 智城 (Yoshikawa, Tomoki)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：20399463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高度に弱毒化されたワクシニアウイルス株LC16m8に外来遺伝子を簡単かつ速やかに組み込み可能なシステムを確立する。そのシステムを用いてラッサウイルスの遺伝子を導入した組換えm8を作製し、その免疫誘導能をマウスを用いて評価することでラッサワクチンとしての可能性を検討する。本研究では3種類のプラスミドを作製し、これを用いることで1週間あれば外来遺伝子をBACプラスミドに100%の確率で組み込める系を確立した。そして、このシステムを用いてラッサウイルスのNPまたはGP発現する組換えm8の作製に成功した。更にこのウイルスをマウスに免疫するとラッサウイルスに対する特異抗体が誘導されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症に対する最良の対策は予防であり、その中核をなすのはワクチンである。ワクシニアウイルス株の一つであるLC16m8は日本で樹立されたものであり、その高い安全性とワクチン効果により痘そうワクチンとして国内承認されている。本研究ではLC16m8のワクチンとしての能力を他の感染症に有効利用するため、外来遺伝子を迅速に導入できるシステムを確立した。また、ラッサ熱の原因であるラッサウイルスの遺伝子を保持する組換えLC16m8を作製し、これを免疫したマウスにラッサウイルスに対する特異抗体を誘導することに成功した。本研究成果は現COVID-19ワクチンへの応用も可能であり、現在研究中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is firstly to establish a system that can easily and rapidly introduce foreign genes into the highly attenuated vaccinia virus strain LC16m8. Next, using this system, recombinant m8s with the Lassa virus genes are generated and evaluated its immunogenicity by using mice to examine its potential as a Lassa vaccine candidate. In this study, three types of plasmids were created, and an improved system in which foreign genes can be incorporated into the BAC plasmid with 100% probability within one week was established. Recombinant m8s expressing Lassa virus NP or GP were successfully generated using the newly established system. Furthermore, specific antibodies against the Lassa virus were confirmed to be induced when mice were immunized with these viruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ワクチン ラッサ熱 ワクシニアウイルス

1. 研究開始当初の背景

感染症に対する最良の対策は予防であり、その中核をなすのはワクチンである。しかし、有効かつ安全性の高いワクチンを開発することは決して容易ではない。近年では分子生物学的手法を利用し、既に生ワクチンとして普及している弱毒化ウイルスなどをベクターとして組換えワクチンを作製することも多い。これは、その弱毒化ウイルス自身の免疫原性と安全性が高ければ様々な感染症へのワクチンとしての可能性を持つためである。例えば、痘そうワクチンとして使用された実績を持つワクシニアウイルスをベクターとして用いたラッサワクチンの研究は 1980 年代後半から 90 年代後半まで積極的に行われ、サルを用いた実験などでその有効性は実証されていた。しかし、この時に用いられたワクシニアウイルスは所謂第二世代のウイルス株であり、副反応が強く、健康なヒトであっても 100 万人に数人～数十人の割合で脳炎、全身性ワクシニア、ワクシニア性湿疹などが発生すること知られていた。更に、当時は HIV-1 感染者の増加が世界的な問題となってきており、ワクシニアウイルスをベクターとした組換えラッサ熱ワクチンは実用化困難であるという認識が一般化された。

そこで、本研究ではワクチンベクター株として細胞培養技術により高度に弱毒化された、第三世代ワクシニアウイルス株である LC16m8 (m8) に着目した。m8 は 1960 年代から 1970 年代初めにかけて日本で樹立された株であり、当時の痘そうワクチン株に比してより弱毒であることを目指して開発され、実際に弱毒化が達成された純国産のワクチン株である。実際に約 5 万名の小児に接種されたが前述のような重篤な副反応は一例も確認されなかった。一方でサルなどを用いた動物実験ではその免疫原性はそれまでのワクチン株と同等であることも確認されている。この m8 株が保持している安全性、免疫原性を有効利用する形で組換えワクチンを作製すれば実用化へ近づくことが出来ると考えている。

2. 研究の目的

既に m8 の全ゲノムを組み込んだ BAC プラスミドを作出し、これを用いた組換え m8 を作出するシステム (m8-BAC システム) を確立している。本研究では 1. m8-BAC システムに更なる改良を加えて病原体の遺伝子をごく簡単かつ速やかに組み込むことが可能な m8-BAC システムを作製する。次に 2. これを用いてラッサウイルスの遺伝子を導入した組換え m8 を作製し、3. マウスを用いて液性、細胞性免疫の誘導能及び感染防御免疫誘導能を評価することで、ラッサワクチンとしての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 外来遺伝子を簡単かつ速やかに組み込み可能な m8-BAC システムの確立

m8-BAC システムにより、例えばラッサウイルスの NP、GP 遺伝子を単独、又は両方組み込んだ感染性を持つ組換え m8 を作製することが出来る (図 1)。システムの中核をなす BAC プラスミド、pLC16m8.8S-BAC は大腸菌の遺伝学を応用した Red/ET 相同組換え法により遺伝子改変が可能である。改変された pLC16m8.8S-BAC のクローニングには、一般的なプラスミドを用いた遺伝子操作と同様に薬剤耐性遺伝子といった選択マーカーの利用が必須である。そこで迅速な pLC16m8.8S-BAC の改変を可能とするシステムの構築を行う。

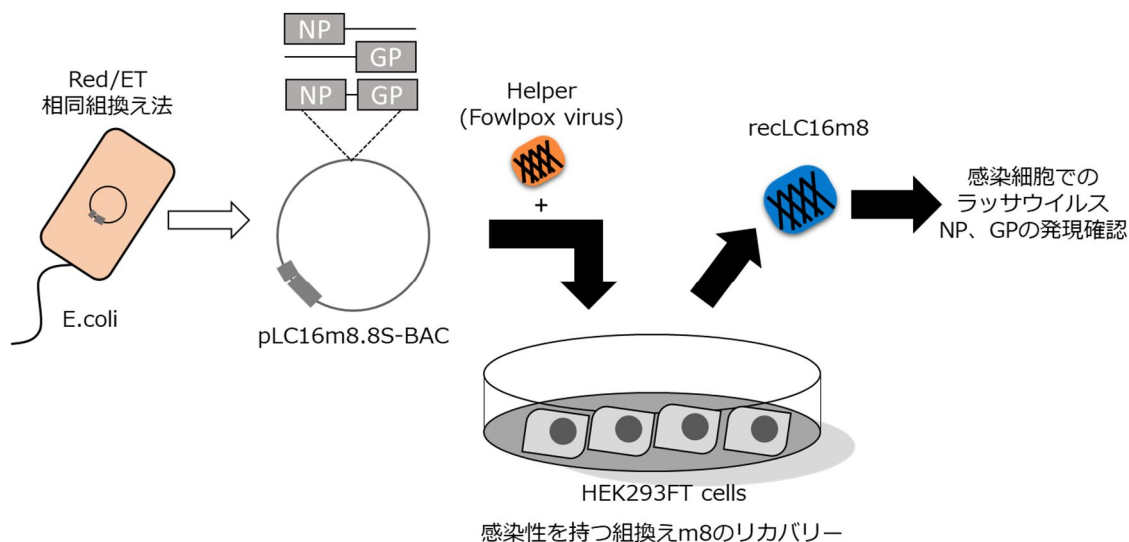
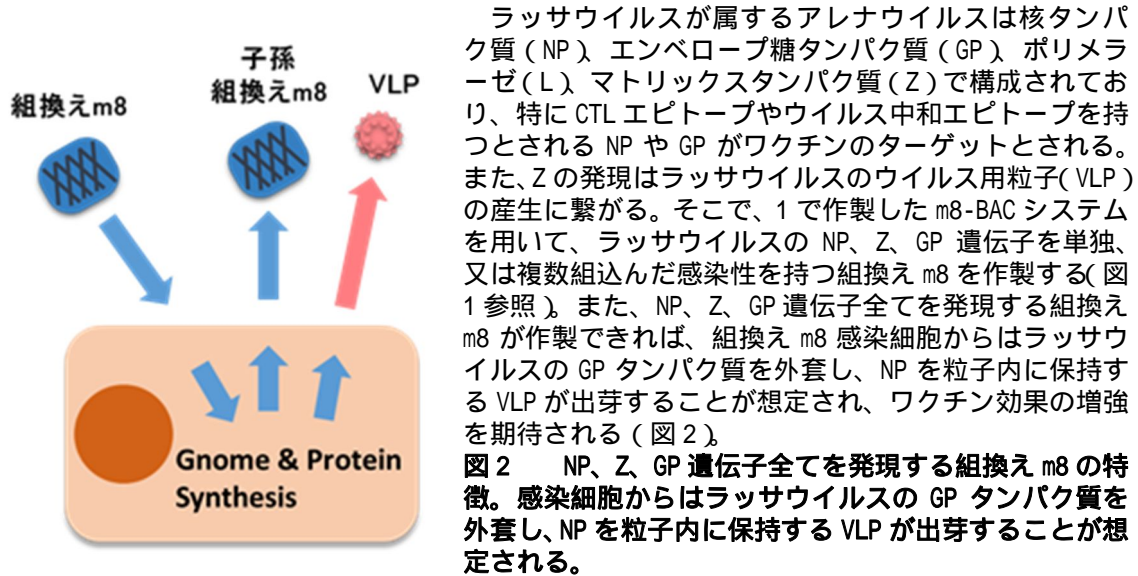


図1 ラッサウイルスの遺伝子を組み込んだ組換え m8 の作製。Red/ET 相同組換え法により、m8 の全ゲノムを保持する BAC プラスミド、pLC16m8.8S-BAC 内にラッサウイルス NP、GP 発現カセットを組み込む。精製した BAC プラスミドをヘルパーウイルス (鶏痘ウイルス) と共にトランスフェクションすることで組換え m8 をリカバリーする。リカバリーされたウイルスは更にクローニングすることで純化出来る。

(2) ラッサウイルスの遺伝子を組込んだ組換え m8 の作製



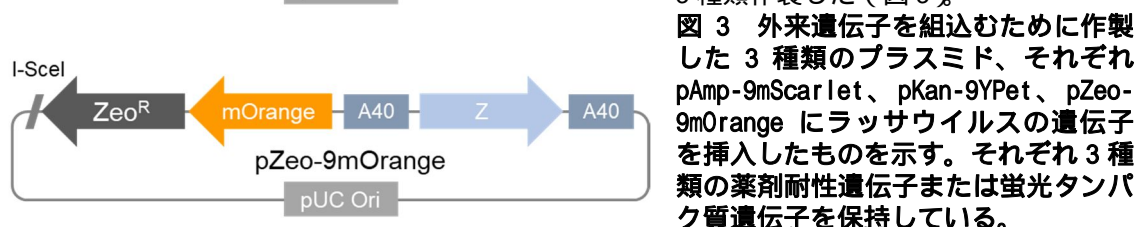
(3) 組換え m8 の特異的な液性、細胞性免疫応答誘導能、及び感染防御免疫誘導能の評価

作製した組換え m8 をマウスに感染させる。ヒトで行われている二又針を使用する接種法に近似し、かつこれまでのマウス実験から、他の接種経路と比較して有効であることが判明している皮下接種を用いる。ここでは免疫回数 (1 回、又は 2 回) 免疫ウイルス量を検討し、その特異抗体価をラッサウイルス NP、または GP を発現した培養細胞を用いた間接蛍光抗体法 (IFA 法) により評価する。特に GP についてはその中和抗体の誘導がワクチン効果の大きな指標となる。そこで、当研究部で既に確立されているラッサウイルス GP を外殻した水疱性口内炎ウイルス (VSV) シュードタイプを用いたバイオアッセイシステムを用いて、その中和抗体価の評価を行う。また、組換え m8 は生ワクチンとして使用することを想定しており、その細胞性免疫誘導能は液性免疫誘導能と共に重要な評価指標となる。そこで、ラッサウイルスの抗原に特異的な CD8 陽性 T 細胞数を、ELISPOT を用いて定量する。更に当研究部はラッサウイルスと同じアレナウイルス科に属し、抗原的に交叉性を持つモペイアウイルスを所有している。モペイアウイルスを型 IFN レセプターノックアウトマウスに経静脈接種すると、致死的ではないものの体内で増殖しウイルス血症を起こすことが知られている。そこで、このモペイアウイルス感染マウスモデルを用いて組換え m8 接種後にモペイアウイルスを感染させて血中のモペイアウイルス量の変化を測定することで感染防御免疫誘導能を評価する。

4. 研究成果

(1) 外来遺伝子を簡単かつ速やかに組込み可能な m8-BAC システムの確立

これまで一般的に BAC プラスミドに変異などを導入する際には pEP-Kan-S という、カナマイシン耐性遺伝子と制限酵素 I-SceI 切断サイトを持つプラスミドを鋳型として、PCR 等により得られた産物を用いていた。この方法は非常に優れた方法である一方で、最終的に薬剤耐性遺伝子カセットを BAC プラスミドから取り除く際には BAC プラスミドを保持する大腸菌がカナマイシン耐性を消失していることを確認する必要があり、判別に困難な時があった。これを克服するために、薬剤耐性遺伝子と同時に蛍光タンパク質遺伝子を発現するプラスミドを 3 種類作製した (図 3)。



これらのプラスミドはカナマイシン耐性遺伝子とアンピシリン、またはゼオシン耐性遺伝子のいずれかを保持していると同時に蛍光タンパク質遺伝子の mScarlet、YPet、そして mOrange 遺伝子のいずれかを保持している。これらのプラスミドによりラッサウイルスの NP、GP、そして Z を

pLC16m8.8S-BAC に導入したところ、一回目の組換えにより遺伝子導入が成功した場合には蛍光タンパク質遺伝子が発現するために大腸菌のコロニーが LED トランスイルミネーター上で蛍光を発していることが確認できた。更に、二回目の組換えによりラッサウイルスの遺伝子のみを保持し、薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質遺伝子カセットが除去された際には蛍光タンパク質遺伝子の発現がなくなるため、大腸菌のコロニーの蛍光も確認されなくなる。このシステムを利用することで、1週間でラッサウイルスの NP、または GP の遺伝子を保持する pLC16m8.8S-BAC を100%の確率で作製することが可能となった。これらのプラスミドは当然ラッサウイルスの遺伝子を組込む以外にも使用できるため、本研究により外来遺伝子を簡単かつ速やかに組み込み可能な m8-BAC システムが確立したと結論づけた。

(2) ラッサウイルスの遺伝子を組込んだ組換え m8 の作製

外来遺伝子を簡単かつ速やかに組み込み可能な m8-BAC システムを確立する際に作製したラッサウイルスの NP、GP を保持する BAC プラスミド、それぞれ pLC16m8.8S-B16-LassaNP と pLC16m8.8S-A46-LassaGP を用いて組換え m8 のリカバリーを行った。BAC プラスミドを 293FT 細胞にトランスフェクションすると同時にリカバリーに必須のポックスウイルス由来のタンパク質をトランスで供給するヘルパーウイルスとして鶏痘ウイルスを感染させて培養を行った。トランスフェクション/インフェクションから 4 日目位から細胞にプラークが確認された。6 日から 7 日目に細胞を回収し、これを m8 に感受性を持ちウイルスが効率よく増殖できるウサギ由来細胞株の RK13 細胞に感染させてプラーククロニング、ストックウイルスを作製した。これらの組換え m8、それぞれ vLC16m8.8S-LassaNP と vLC16m8.8S-LassaGP を RK13 細胞に感染させたときのラッサウイルス遺伝子の発現を免疫蛍光染色法 (IFA) により確認した (図 4)。ラッサウイルスの NP または GP に特異的な抗体を用いると、組換え m8 でのみウイルス遺伝子の発現が確認された。尚、現在ラッサウイルスの Z を発現する組換え m8 の作製、ならびに、NP、Z、GP 遺伝子全てを発現する組換え m8 の作製を行っている。

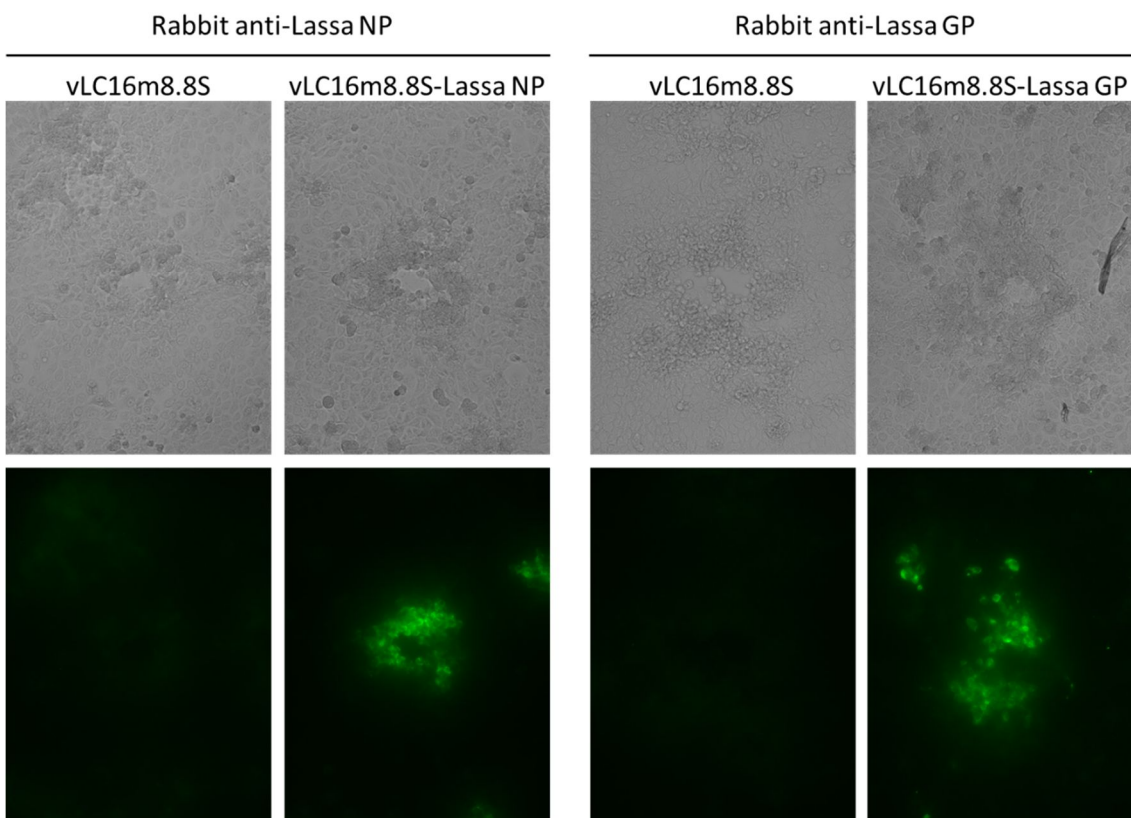


図 4 組換え m8 感染細胞でのラッサウイルス遺伝子の発現。pLC16m8.8S-BAC からリカバリーした野生型 m8 (vLC16m8.8S)、または vLC16m8.8S-LassaNP 若しくは vLC16m8.8S-LassaGP を感染させた RK13 細胞のラッサウイルス遺伝子の発現をウサギ抗ラッサウイルスの NP、または GP ポリクローナル抗体を用いて染色した。vLC16m8.8S-B16-LassaNP 若しくは vLC16m8.8S-B16-LassaGP の感染により出現したプラークでラッサウイルスの NP または GP の発現が確認できた。

(3) 組換え m8 の特異的な液性、細胞性免疫応答誘導能、及び感染防御免疫誘導能の評価

ラッサウイルスの NP または GP 遺伝子を組込んだ組換え m8 マウスに免疫し、組換え m8 液性免疫誘導能を検証した。6 週齢の ICR マウスに 2 週間間隔で 2 回、vLC16m8.8S-B16-LassaNP、または vLC16m8.8S-B16-LassaGP、若しくはこれら両方を免疫した。また陰性対照群として vLC16m8.8S を免疫した ICR マウスを用意した。2 回目の免疫から 2 週間後にマウスから血清を採取し、血清中に含まれるラッサウイルスの NP または GP2 に対する特異抗体価についてラッサウイルスの NP

または GP を発現した 293FT 細胞をスポットしたスライドを用いた IFA により測定した (図 5)。結果より免疫した組換え m8 により期待されるラッサウイルスの NP または GP に対する特異抗体が誘導されていることが明らかとなった。つまり、本研究で作製したラッサウイルスの NP または GP 遺伝子を保持する組換え m8 が免疫原性を有することがわかった。しかし、ラッサウイルス NP または GP を発現する組換え m8 を免疫したにもかかわらず、特異抗体の誘導が確認できなかったマウスが複数存在していることから、改善が必要であると考えられる。接種ウイルス量を増やす、接種回数を増やした実験を現在検討中である。また、今後は中和抗体、細胞性免疫の測定や、モペイアウイルスを用いた感染防御効果の評価を引き続き行う予定である。

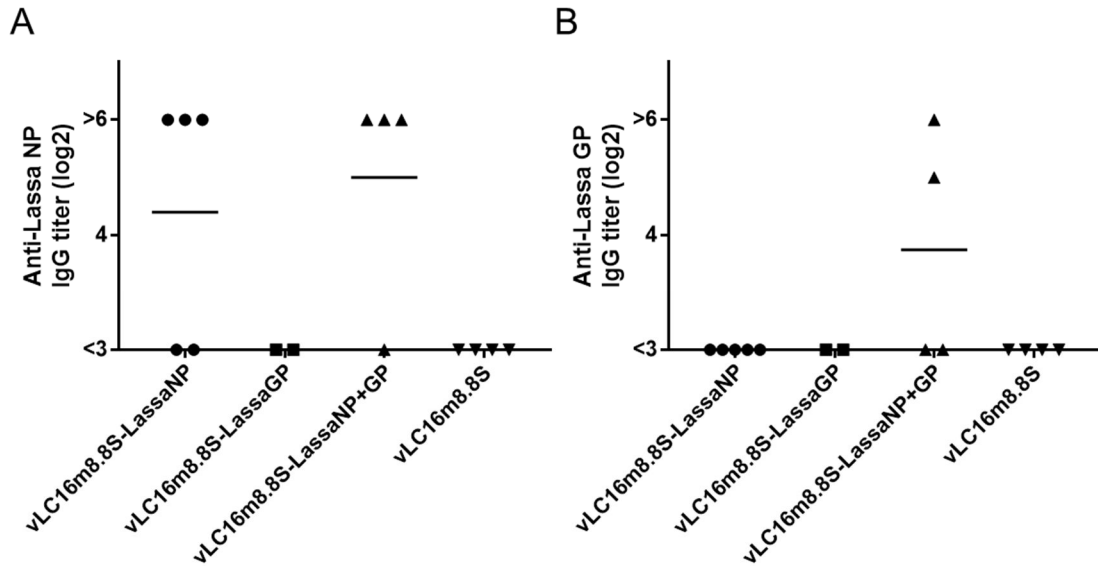


図5 組換え m8 を免疫したマウス血清中のラッサウイルスの NP または GP に対する特異抗体価。ラッサウイルスの NP または GP 遺伝子を保持する組換え m8 (vLC16m8.8S-LassaNP、vLC16m8.8S-LassaGP) または対照として野生型の m8 (vLC16m8.8S) を免疫したマウスから血清を採取し抗体価を測定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------