

令和 4 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20200

研究課題名(和文) 外来遺伝子を安定発現する増殖型フラビウイルスベクターの開発

研究課題名(英文) Development of self-replicable flavivirus vector stably expressing foreign gene

研究代表者

小瀧 将裕 (Kotaki, Tomohiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10758816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：フラビウイルスは安全性、腫瘍溶解性などの点で優れた増殖型ウイルスベクターとなり得る。しかし、外来遺伝子を安定的に発現するベクターは成功例がない。本研究ではRNA変異原を用いた網羅的な変異ウイルス作製により、外来遺伝子を安定化する変異の同定を試みた。リバビリンの存在下でレポーター遺伝子を有するフラビウイルスを10回継代し、依然としてレポーター遺伝子を有するウイルス3種類を単離した。これらのウイルスに共通した変異が、RNA依存性RNAポリメラーゼ活性のあるNS5に導入されていた。その領域に変異を有するウイルスをリバースジェネティクス法により作製し、実際に外来遺伝子が安定化するかを検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子導入法の開発は遺伝子治療、ワクチン開発などに有用である。DNAプラスミド、mRNA、ウイルスベクターなどの戦略があるが、ウイルスベクターは導入効率および選択的指向性の面で有望である。フラビウイルスはすでに弱毒生ワクチンが実用化されている。また、ジカウイルスは腫瘍溶解性を示すことが報告されている。以上のことから、フラビウイルスは優れた増殖型ウイルスベクターとなり得る。本研究により実用的なウイルスベクター開発の基礎的検討を行うことで、腫瘍溶解性の高いウイルスの作製あるいはフラビウイルスの2価ワクチンなどに応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：Flavivirus can be an excellent proliferative viral vector because of its safety and oncolytic phenotype. However, there are still no successful examples of proliferative flavivirus vectors that stably express foreign genes. Therefore, in this study, we attempted to identify mutations that stabilize foreign genes by comprehensively producing mutant viruses using RNA mutagens. Flaviviruses carrying the reporter gene were passaged 10 times in the presence of ribavirin, and three viruses still carrying the reporter gene were isolated. Mutations common to these viruses were introduced into NS5, which has RNA-dependent RNA polymerase activity. A virus having a mutation in that region was generated by the reverse genetics method, and the stabilization of foreign genes is being investigated.

研究分野：生体材料

キーワード：フラビウイルス ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

遺伝子導入法の開発は遺伝子治療、ワクチン開発などに有用である。DNA プラスミド、mRNA、ウイルスベクターなどの戦略があるが、ウイルスベクターは導入効率および選択的指向性の面で有望である。フラビウイルスは安全性、腫瘍溶解性などの点で優れた増殖型ウイルスベクターとなり得る。しかし、ベクター中の外来遺伝子は RNA 組換えにより速やかに排除される。外来遺伝子を安定的に発現するベクターは未だに成功例がない。RNA 組換えの機構は不明な点が多いことが、ベクター開発の妨げとなっている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では変異原を用いて網羅的に変異ウイルスを作製することで、RNA 組換えを防ぎ、外来遺伝子を安定化する変異を同定する。そして、同定した変異を利用して、外来遺伝子を安定発現する増殖型フラビウイルスベクターの開発を行う。

また、フラビウイルス弱毒ワクチンの安全性を活かした非増殖型ウイルスベクターへの応用を考え、SARS-CoV-2 S タンパクを発現するフラビウイルスレプリコン (レプリコンワクチン) を構築した。

3. 研究の方法

(1) 変異原を使用した変異ウイルス作製

変異原の存在下でウイルスベクターを継代し、全ゲノムに渡って変異を持つウイルスを作製する。変異原には、RNA 合成時に取り込まれることで変異を導入する、リバピリンを用いる。ウイルスベクターには、赤色蛍光タンパク質(mScarlet)を導入した弱毒生ワクチン株を使用する。リバピリン存在下でウイルスを 10 回継代後、依然として mScarlet を発現するウイルスを選択する。ウイルスの全ゲノム解析を行い、遺伝子を安定化する変異を同定する。

(2) SARS-CoV-2 S タンパクを発現するフラビウイルスレプリコンワクチンの構築

SARS-CoV-2 S タンパクを発現するフラビウイルスレプリコンを構築した。細胞内でのタンパク発現、レプリコン RNA 量をウエスタンブロット、免疫蛍光抗体法、リアルタイム PCR にて解析した。また、マウスへ接種し、免疫誘導の上昇を ELISA、中和試験、ELISpot にて解析した。

4. 研究成果

(1) 変異原を使用した外来遺伝子安定ウイルスの作製

1. 変異原の存在下でレポーターウイルスを継代
Revertant が主流になってくる

2. 限界希釈により、外来遺伝子を安定発現する
ウイルスを単離する

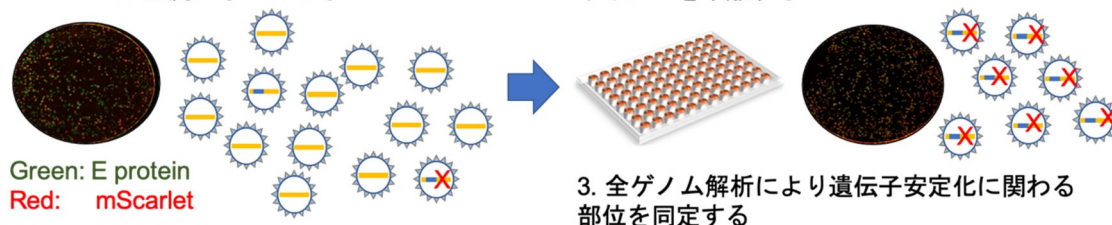


図1. 外来遺伝子安定発現ウイルスの作製および遺伝子安定化に関与する部位の同定

変異原であるリバピリンの存在下で、レポーター遺伝子を有するフラビウイルスを10回継代した。結果、ほとんどのウイルスがレポーター遺伝子発現を失った(図1)。レポーター遺伝子を失ったウイルスは増殖が早く、主流になったと考えられる。そこで、ウイルス液の限界希釈によるウイルス単離を行い、さらにリバピリンの存在下で10回継代した。依然としてレポーター遺伝子を保有するウイルス3種類を単離し、全ゲノム解析を行った。

単離した3株のうち、少なくとも2株で共通して変異が導入されている部位を6箇所同定した(C、prM、E、NS4B、NS5の2箇所)。そのうち、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)活性のあるNS5タンパク質に着目をした。これらの変異はRdRPで比較的保存度の低いThumb領域(変異箇所1)あるいは高度に保存されているMotif A領域(変異箇所2)に導入されていた(図2)。その領域に変異を有するウイルスをリバースジェネティクス法により作製したところ、RNA複製能の低下を確認した。増殖型ウイルスベクターの作製に向けて、外来遺伝子の安定性を検討している。

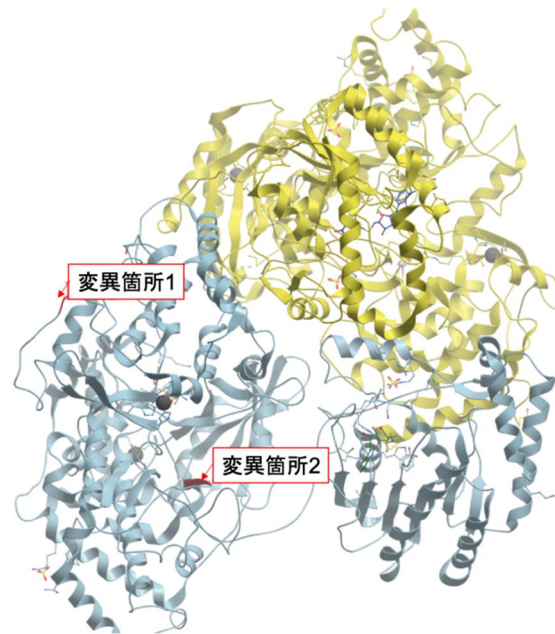


図2. NSP5に導入された変異の箇所

(2) SARS-CoV-2 Sタンパクを発現するフラビウイルスレプリコンワクチンの構築

SARS-CoV-2 Sタンパクを発現するフラビウイルスレプリコンRNAを構築した。構築したレプリコンRNAを培養細胞内に導入したところ、Sタンパクの発現およびRNAの自己増殖を確認した(図3A-C)。このレプリコンをマウスに接種したところ、Sタンパクに対する免疫応答の上昇が確認された(図3D-G)。本研究をもとに、増殖型フラビウイルスベクターへの応用を検討している。

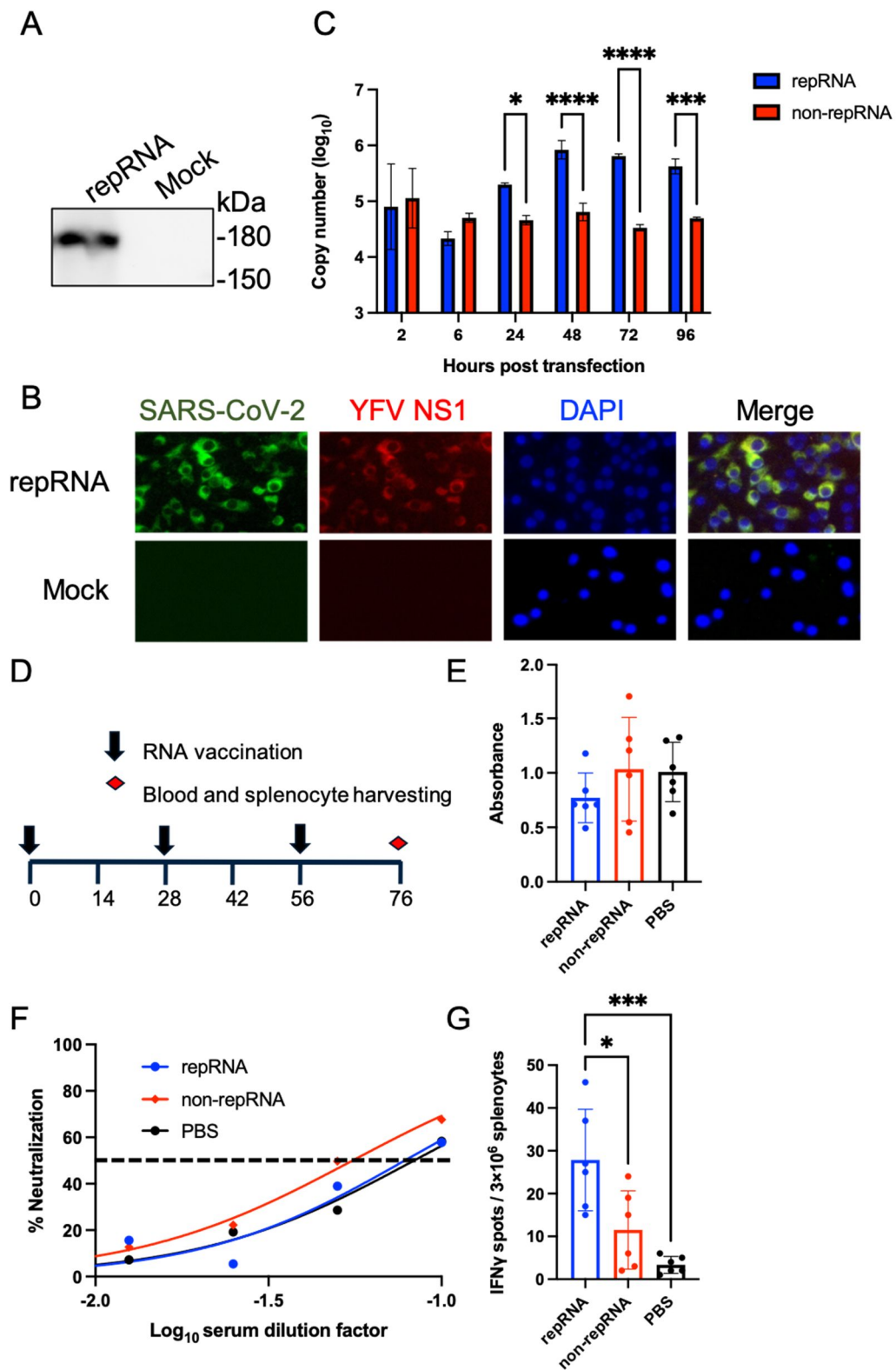


図3. SARS-CoV-2 Sタンパクを発現するレプリコンの構築

(A)ウエスタンブロットによるSタンパク発現確認 (B)免疫蛍光抗体法によるSタンパク発現確認 (C)リアルタイムPCRによるRNA量の測定 (D) マウスへのレプリコン接種スケジュール (E) ELISAによる抗体誘導量の測定 (F) 免疫血清の中和試験 (G) ELISpotによる細胞生免疫誘導の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kotaki Tomohiro, Kurosu Takeshi, Grinyo-Escuer Ariadna, Davidson Edgar, Churrotin Siti, Okabayashi Tamaki, Puiprom Orapim, Mulyatno Kris Cahyo, Sucipto Teguh Hari, Doranz Benjamin J., Ono Ken-ichiro, Soegijanto Soegeng, Kameoka Masanori	4. 巻 11
2. 論文標題 An affinity-matured human monoclonal antibody targeting fusion loop epitope of dengue virus with in vivo therapeutic potency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92403-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kotaki Tomohiro, Yamanaka Atsushi, Konishi Eiji, Kameoka Masanori	4. 巻 294
2. 論文標題 A potent neutralizing mouse monoclonal antibody specific to dengue virus type 1 Mochizuki strain recognized a novel epitope around the N-67 glycan on the envelope protein: A possible explanation of dengue virus evolution regarding the acquisition of N-67 glycan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198278 ~ 198278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2020.198278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kotaki Tomohiro, Xie Xuping, Shi Pei-Yong, Kameoka Masanori	4. 巻 11
2. 論文標題 A PCR amplicon-based SARS-CoV-2 replicon for antiviral evaluation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82055-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小瀧 将裕, 高澤 駿太, 亀岡 正典
2. 発表標題 Fosmidを用いたSARS-CoV-2レプリコンの構築
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	テキサス大学		