

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21380187

研究課題名(和文)鳥インフルエンザ制御を目指した新規ワクチン戦略基盤

研究課題名(英文)Basic study on novel vaccine strategy for avian influenza

研究代表者

堀本 泰介(Horimoto, Taisuke)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00222282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：H5N1亜型など鳥インフルエンザウイルスによるパンデミックの発生が危惧される。薬剤耐性ウイルスの出現からより効果的で安全なワクチンが求められている。本研究では、新しい非増殖型半生ワクチンを構築した。このワクチンは細胞に感染し防御免疫抗原を発現するがウイルス粒子は産生されず、高い安全性と防御効果が期待できる。非増殖型ウイルスとしてM2、NS2、NA、あるいはHA欠損ウイルスを構築した。それぞれの構築法やマウスでの免疫原性からHA膜融合能を欠損させた非増殖型ウイルスが半生ワクチンとして最も有望であった。この知見はワクチン戦略のブレイクスルーになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Avian influenza viruses such as H5N1 virus possess a pandemic potential. Possible emergence of drug-resistant viruses emphasizes the importance of influenza vaccines. However, low efficacy of the current inactivated vaccines and limited safety of the live attenuated vaccines provide a need for novel vaccine strategy against influenza. Here I generated replication-incompetent viruses, which infect cells once followed by expression of viral preventive antigens in animals, leading to a new vaccine with higher efficacy and safety. To this end, I produced replication-incompetent viruses such as M2-, NS2-, NA-, or HA-deletion construct by reverse genetics. These can replicate in each protein-expressed cell cultures, followed by intranasal inoculation into mice to evaluate their safety and vaccine efficacy. Conclusively replication-incompetent virus with defective HA fusion is promising as an alternative influenza vaccine.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症 鳥インフルエンザ ワクチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 今日、人類は新型H5N1インフルエンザによるパンデミック発生の脅威に晒されている。すでに実用化されている抗ウイルス薬は、それに対処しうる大きな武器であるが、昨年度来見られるヨーロッパにおける薬剤耐性H1N1ウイルスの侵淫率の予期せぬ上昇は、H5N1その他の耐性ウイルスの出現を予感させる。また、タミフルに起因する異常行動等の副作用の問題も論議の対象となっている。

(2) 一方、WHOを中心として人体用H5N1不活化プレパンデミックワクチンが開発され、先進国を中心に備蓄中であるが、免疫原性の低さを補うため添加されるアジュバントによる副作用や、抗原変異による有効性の不確かさが懸念される。また、ワクチン会社における生産容量が限られており、日本を含め全人口に対応することは到底不可能である。

(3) 低温馴化株をベースとしたH5N1生ワクチンが試作され米国で臨床試験中であるが、病原性復帰の可能性からポストパンデミックワクチンとしての使用しか見込まれない。また、わが国における生ワクチンの使用は、その安全性に対する承認過程の難しさから、実用化される見込みは極めて低い。

(4) 当研究室には、世界に先駆けて確立したリバースジェネティクス技術のノウハウがあり、インフルエンザウイルスを改変する技術を保有している。また、当研究室で解析しているゲノムパッケージング機構に関する知見の蓄積は、ウイルス改変技術をサポートする。

(5) 鳥インフルエンザ制御のブレイクスルーになりうる新規のワクチン戦略が人類共通の願いであり、早急に着手すべき課題である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、これまでに蓄積されてきたインフルエンザウイルスワクチン作製に関する実績、知識と技術を基盤にして、新しい鳥インフルエンザワクチンとして非増殖型半生ワクチンの構築を目標にする。

(2) このワクチンウイルスは細胞に感染し、防御免疫抗原を感染細胞上に発現するが、感染性ウイルス粒子は産生されない。したがって、安全性は極めて高く、一方では、タンパク質性アジュバント分子を同時に搭載・発現させることも可能であり、不活化ワクチンや生ワクチンを凌ぐ防御効果が期待できる。

3. 研究の方法

(1) リバースジェネティクスにより非増殖型インフルエンザウイルスを構築し、ワクチン効果を動物モデルで評価する。評価のため、ワクチン接種経路の検討を含め不活化ワクチンや生ワクチンとの比較実験を実施する。

(2) ワクチン効果が認められたワクチンウイルスに関して、遺伝子の安定性や培養条件などを検討し、それらの効率の良い作製方法を最適化する。

(3) これまでに報告のないウイルスの弱毒化の方法を検討する。そのワクチン効果を動物実験で検証する。

4. 研究成果

(1) 初年度は、非増殖性半生ワクチンウイルスの効率のよい作製方法を検討した。非増殖型ワクチンウイルスとしては、増殖に必須な遺伝子を欠損させる必要があるが、そのウイルス力価を動物に接種可能レベルまで上昇させる必要がある。そのためには正常なタンパク質を発現する培養細胞の樹立が必要である。まず、すでに樹立してある M2 恒常発現 MDCK 細胞を用いて M2 欠損ウイルスについて検討したところ、その増殖性はかなり減少するため、半生ウイルスとしての応用は困難である可能性が示された。そこで、次に、別の増殖必須遺伝子である NS2 欠損ウイルスについて検討を行った。そのため、変異ウイルスを増幅するのに必要な NS2 恒常発現細胞の作製を試みたものの、NS2 タンパク質自体がもつ細胞毒性が強いため、通常のプラスミド法では樹立は困難であると判断した。そこで、発現性の弱いレトロウイルスベクターを用いて NS2 発現細胞の作製を検討し、細胞の樹立に成功した。

(2) 次年度は、このNS2発現細胞を用いてNS2欠損非増殖型ウイルスの構築を試みた。しかしやはり、満足のいくウイルス力価の獲得は困難であると判断された。

そこで次に、HAタンパク質を標的とした非増殖性半生ワクチンウイルスとしてHA開裂欠損変異体の作製を試みた。HAの開裂はウイルスの感染性に必須であるため、開裂欠損によりウイルスの非増殖性が保証される。その方法としてHA開裂部位に存在するアルギニン残基を欠損させた変異遺伝子を構築した。効率のよい作製方法を検討し、HA開裂欠損変異体をレスキュー、増殖させるため野生型のHAを恒常的に発現するMDCK細胞を確立し、HA開裂欠損変異体を増幅することが可能になった。上清に得られたウイルスを正常細胞に感染させたところ、HAの発現が認められるとともに、もはや感染性のウイルスは産生されないことが確認できた。次に、このHA開裂欠損変異ウイルスをマウスに経鼻接種したところ、血中抗体の産生が認められた。マウスからは感染

性ウイルスは回収されなかった。これらの成績は、このHA開裂欠損変異ウイルスが半生ワクチンとして応用できる可能性を示すものである。

(3) 前年度、その有用性が示唆された HA 開裂欠損変異体のワクチン能についての詳細な免疫学的性状解析を実施した。この HA 開裂欠損変異ウイルスをマウスに経鼻接種したところ、IgA を含む局所抗体および血中抗体の産生のみならず細胞性免疫も誘導することが明らかとなり、野生株による攻撃実験において、対照の不活化ワクチンより高いワクチン効果が認められた。しかし、十分なワクチン能を付与するには高いウイルス量を必要とすること、複数回接種が必要であることなどの問題点が示唆された。

そこでさらに、別の非増殖性半生ワクチンウイルスとして NA 欠損ウイルスの構築を検討し、その作成に必要となる NA 恒常発現 MDCK 細胞の樹立を考えた。従来の報告では NA タンパク質はアポトーシス誘導性を持つためその恒常発現細胞の樹立は達成されていない。しかし、本研究では、その発現量を抑えた形での NA 恒常発現細胞の樹立に初めて成功した。

(4) 本年度は、NA 恒常発現細胞を用いて半生ウイルスが作製できるかを検討した。その結果、NA 遺伝子を欠損するウイルスは、弱いながらも細胞での自立増殖が見られ増殖型であることが判明した。したがって、目的とする非増殖性半生ワクチンの構築には合致しないと判断した。しかし一方、この実験を進める中で、NA 恒常発現細胞において野生型ウイルスとは異なるブラック表現型を有する変異株の選択に成功した。このウイルスを解析したところ、HA タンパク質のレセプター結合部位に含まれる 190 番目のアミノ酸がグルタミン酸からリジンに変異していることを発見した。この変異は自然分離株には見られない変異である。解析の結果、変異株のレセプター特異性は野生型と変わらないものの、そのレセプター結合力は強くなっていた。そこでこの変異株が新しい生ワクチンウイルスとして応用可能であるかを検証するため、そのワクチン能をマウスモデルにて評価した。この NA 変異株はマウスの肺での増殖能が低く、その結果、弱毒化していた。変異株を経鼻接種したマウスは、野生株の攻撃を完全に防御したことより、これまでにない弱毒生ワクチンとしての応用性が考えられた。

(5) 最終年度は、これまでの本研究で半生ワクチンとして最も有望な結果が得られたHA開裂欠損変異体について更なる検討を行った。HAの膜融合能を欠損させる方法として、HAタンパク質の開裂性をなくす方法ではなく、HAタンパク質上の膜融合ペプチドを欠損させた欠損変異体を構築し、それを用いて非増殖ウ

イルスを構築した。HA恒常発現MDCK細胞にて変異体を増幅し、マウスモデルでそのワクチン能を検証した。その結果、複数回の経鼻接種により、強毒株の攻撃を完全にブロックした。したがって、HA膜融合能欠損ウイルスの構築には複数の方法が応用できることが示され、この戦略が今後のワクチン開発に貢献する知見として応用可能であることが示された。さらに、欠損部位にGFP遺伝子を挿入した非増殖型ウイルスの構築にも成功し、培養細胞上でGFPの発現も認められた。この結果は、今後のマーカーワクチン構築の可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計16件)

Mohamed YM, Bangphoomi N, Yamane D, Suda Y, Kato K, Horimoto T, Akashi H: Physical interaction between bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 4A and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). Arch Virol 2014. in press. 査読有

Horimoto T, Gen F, Murakami S, Iwatsuki-Horimoto K, Kato K, Akashi H, Hisasue M, Sakaguchi M, Kawaoka Y, Maeda K: Serological evidence of infection of dogs with human influenza viruses in Japan. Vet Rec 174: 96, 2014. doi: 10.1136/vr.101929. 査読有

Ozawa, M, Shimojima M, Goto H, Watanabe S, Hatta Y, Kiso M, Furuta Y, Horimoto T, Peters NR, Hoffmann MF, Kawaoka Y: A cell-based high-throughput screening system for influenza A viral RNA transcription/replication inhibitors. Sci Rep 3: 1106, 2013. doi: 10.1038/srep01106. 査読有

Gen F, Yamada S, Kato K, Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T: Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. Arch Virol 158: 1003-1011, 2013. doi: 10.1007/s00705-012-1577-3. 査読有

Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura K, Shimojima M, Kawaoka Y: Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in Vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. J Virol 86: 1405-1410, 2012. doi: 10.1128/JVI.06009-11. 査読有

Katsura H, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Watanabe S, Sakabe S, Hatta Y, Murakami S, Shimojima M, Horimoto T, Kawaoka Y: A replication-incompetent

virus possessing an uncleavable hemagglutinin as an influenza vaccine. *Vaccine* 30: 6027-6033, 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.059. 査読有

Kiso M, Ozawa M, Le MQ, Imai H, Takahashi K, Kakugawa S, Noda T, Horimoto T, Kawaoka Y: Effect of an asparagine-to-serine mutation at position 294 in neuraminidase on the pathogenicity of highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *J Virol* 85: 860-866, 2011. doi: 10.1128/JVI.00047-11. 査読有

Horimoto T, Maeda K, Murakami S, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Sashika M, Ito T, Suzuki K, Yokoyama M, and Kawaoka Y: Highly pathogenic avian influenza virus infection in feral raccoons, Japan. *Emerg Infect Dis* 17: 714-717, 2011. doi: 10.3201/eid1704.101604 査読有

堀本泰介: インフルエンザワクチン 日生研だより 57: 64-69, 2011. 査読無

Sakabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Nidom CA, Le QM, Takano R, Kubota-Koketsu R, Okuno Y, Ozawa M, Kawaoka Y: A cross-reactive neutralizing monoclonal antibody protects mice from H5N1 and pandemic (H1N1) 2009 virus infection. *Antiviral Res* 88: 249-255, 2010. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.09.007. 査読有

Imai H, Shinya K, Takano R, Kiso M, Muramoto Y, Sakabe S, Murakami S, Ito M, Yamada S, Le MT, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Takahashi K, Omori Y, Noda T, Shimojima M, Kakugawa S, Goto H, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kawaoka Y: The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog* 6: e1001106, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1001106. 査読有

Haga T, Horimoto T: Animal models to study influenza virus pathogenesis and control. *The Open Antimicrobial Agents Journal Special Issues*: 15-21, 2010. 査読有

Horimoto T: Pandemic influenza. *The Open Antimicrobial Agents Journal Special Issues*: 9-14, 2010. 査読有

Kakugawa S, Shimojima M, Goto H, Horimoto T, Oshimori N, Neumann G, Yamamoto T, Kawaoka Y: The MAPK-activated kinase RSK2 plays a role in innate immune responses to influenza virus infection. *J Virol* 83: 210-2517, 2009. doi: 10.1128/JVI.02416-08. 査読有

Fujii K, Ozawa M, Iwatsuki-Horimoto

K, Horimoto T, Kawaoka Y: Incorporation of Influenza A virus genome segments does not absolutely require wild-type sequences. *J Gen Virol* 90: 1734-1740, 2009. doi: 10.1099/vir.0.010355-0. 査読有

村上晋、堀本泰介、河岡義裕: H5N1インフルエンザワクチン メディカルバイオ 6: 55-59, 2009. 査読無

[学会発表](計9件)

光井英晃、玄文宏、村上晋、須田遊人、加藤健太郎、明石博臣、河岡義裕、堀本泰介: A型インフルエンザウイルスのHA遺伝子非コード領域の機能解析 第61回日本ウイルス学会 2013.11.11. 神戸国際会議場(神戸)

光井英晃、玄文宏、須田遊人、加藤健太郎、明石博臣、河岡義裕、堀本泰介: A型インフルエンザウイルス(H1N1)のHA遺伝子非コード領域の機能解析 第156回日本獣医学会 2013.9.20. 岐阜大学(岐阜)

前田健、下田宙、米満研三、寺田豊、野口慧多、高野愛、小寺祐二、竹田努、小野文子、高井伸二、吉川泰弘、岩附研子、河岡義裕、堀本泰介: 野生イノシシにおけるA型インフルエンザウイルス感染 第156回日本獣医学会 2013.9.20. 岐阜大学(岐阜)

堀本泰介、玄文宏、岩附研子、木曾真紀、村上晋、加藤健太郎、久末正晴、阪口雅弘、明石博臣、伊藤壽啓、河岡義裕、前田健: わが国の哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染 第60回日本ウイルス学会総会 2012.11.14. 大阪国際会議場(大阪)

玄文宏、山田晋弥、岩附研子、加藤健太郎、明石博臣、河岡義裕、堀本泰介: NA発現細胞で高い増殖性を示すインフルエンザウイルスHA変異株の性状解析 第60回日本ウイルス学会総会 2012.11.14. 大阪国際会議場(大阪)

堀本泰介、玄文宏、岩附研子、加藤健太郎、久末正晴、阪口雅弘、明石博臣、伊藤壽啓、前田健: わが国の哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染 第154回日本獣医学会 2012.9.15. 岩手大学(盛岡)

Katsura H, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Watanabe S, Sakabe S, Horimoto T, Kawaoka Y: A replication-incompetent virus possessing an uncleavable HA as an influenza vaccine. XVth International Congress of Virology 国際ウイルス学会 2011.9.13. 札幌コンベンションセンター(北海道)

堀本泰介、山尾僚子、前田健、大川朝子、岩附研子、加藤健太郎、明石博臣、河岡義裕: 国内のペット犬におけるインフルエンザウイルス感染 第58回日本ウイルス

学会 2010.11.8. あわぎんホール(徳島)
村上晋、堀本泰介、桂廣亮、下島昌幸、
河岡義裕: Vero 細胞における高増殖性インフルエンザワクチンシードウイルス開発のための基礎研究 第57回日本ウイルス学会 2009.11.26. 都市センターホテル(東京)

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀本 泰介 (HORIMOTO, Taisuke)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 00222282

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: