

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659309

研究課題名(和文) ヒトの体内で増殖不可能なヒトサイトメガロウイルスワクチンの作成

研究課題名(英文) Construction of attenuated human cytomegalovirus vaccine strain which cannot replicate in human tissues

研究代表者

磯村 寛樹 (Isomura, Hiroki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20294415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス複製が進行するにも関わらず、宿主のヒトサイトメガロウイルス(HCMV)に対する細胞障害性T細胞(CTL)が誘導できる弱毒HCMVであり、体内では増殖が不可能なDisabled Infectious Single Cycle(DISC)ワクチンとしての応用が期待できる。このDISCワクチンは、体内で増殖しないために安全性が高く、宿主免疫の誘導効率が高いという特徴を有するものである。

研究成果の概要(英文)：We constructed the attenuated human cytomegalovirus vaccine which cannot replicate in human tissues. HCMV DNA replication and late gene transcription are not completely linked. Viral-encoded trans-acting factors are required. Recombinant viruses proficient in major immediate early and early viral gene expression and defective in late gene expression are therapeutic disabled infectious single cycle(DISC)vaccine candidates for the induction of cell-mediated and humoral immunity.

研究分野：衛生学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：サイトメガロウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、UL128-131 が欠損していない臨床分離株の HCMV ゲノム全長が BAC クローニングされた TB40EBAC4 が Koznowski らのグループによって作成された (Schuessler et al, J. Virol. 82:11239-11246, 2008)。同様の臨床分離株を用いた FIX-BAC は米国で特許出願されているものの (US20040087001 A1)、TB40E BAC4 自体はこれまで特許出願はなされていない。私達は Koznowski らから TB40EBAC4 の譲渡を受けている。そこで、今回の申請では TB40EBAC4 を用いて、臨床分離株をベースに UL79, 87, あるいは 95 を欠損した DISC ワクチンを作成することを目標とする。

2. 研究の目的

これまで実験室株をベースにして作成してきた DISC ワクチンと同様の方法で TB40EBAC4 を用いて UL79, 87, あるいは 95 を欠損した組換え BAC DNA を大腸菌の中で作成することを試みた。これは前回と同じ手法を用いるため、必ず達成できる。そして UL79, 87, あるいは 95 は前述のように HCMV の増殖に必須であるために、UL79, 87, あるいは 95 を発現する HCMV 感染許容細胞を作成し、UL79, 87, あるいは 95 欠損 HCMV BAC DNA を遺伝子導入するが、これまで用いていた HCMV 感染許容細胞であるヒト胎児繊維芽 (HFF) 細胞で HCMV を培養すると、高率に UL128-131 が欠損することが知られている。そこで、この問題をクリアーするために、

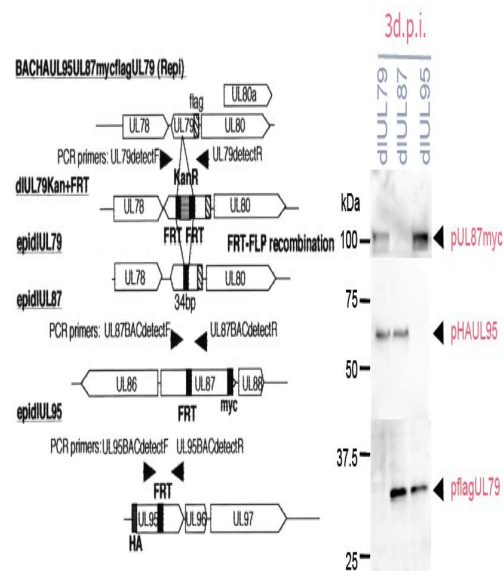
ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を購入して組換え HCMV BAC DNA を遺伝子導入して DISC ワクチンの作成を試みた。UL128-131 は血管内皮への感染に必要であることがすでに知られており、HUVEC には実験室株は感染することができないにも関わらず、HCMV 臨床分離株は感染することができる。今回の申請ではこれがスムーズに成功

するかどうかのポイントになる。私達はこれまでに HFF 細胞へ約 280kbp ある HCMV BAC DNA を遺伝子導入する方法として、リン酸カルシウム法を用いてきた。しかし、HUVEC への HCMV BAC DNA の遺伝子導入がこれまでのリン酸カルシウム法で行なえるのかどうかは不明である。そこで、リン酸カルシウム法の他に 1. BTX (BM Equipment), 2. NEPA21 (ネッパジーン), 3. Neon (Invitrogen), 4. Amaxa (Lonza) 等の各社の最適化された機械を使用して、HUVEC の HCMV BAC DNA の遺伝子導入方法の確立について検討を行った。

3. 研究の方法

1. DISC ワクチンの安全性の検討

DISC ワクチンがどうして DNA 複製が進行するにも関わらず、後期遺伝子は発現しないのか、その分子基盤は依然明らかでない。そこで、UL79, 87, 及び 95 が感染細胞内でそれぞれ、相互作用し、複合体を形成しているかどうか検討した。これまでに作成した UL79, 87, 及び 95 に flag, myc, 及び HA エピトープを in frame に挿入した Towne 株由来の組換え HCMV BAC DNA に UL79, 87, あるいは 95 を欠損した組換えウイルスをすでに私達が確立した方法を用いて作成した (図 1)。

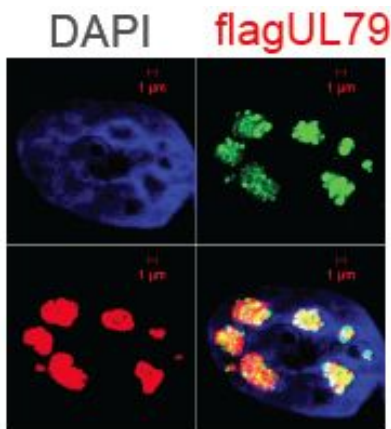


(図 1)

4. 研究成果

UL79, 87, 及び 95 は核内でウイルス複製の場 “Replication compartments (RCs)” にリクルートされることを既に見いだしているため、それぞれの因子を欠損した組換えウイルスで他の 2 つの因子が RCs にリクルートされるかどうかを検討した。その結果図 2 のようになり、UL87 と 95 が RCs にリクルートされるためには UL79 が必須であることがわかった。

図 2



さらに UL79, 87, 95 が複合体を形成しているかどうかを免疫沈降法で調べたところ、UL79, 87, 95 感染細胞で、DNA 非依存的に複合体を形成していることが明らかになった。以上の結果から、UL79, 87, 95 は HCMV 感染細胞で複合体を形成し、UL79 が三者複合体を RCs にリクルートしているのではないかと考えられた。

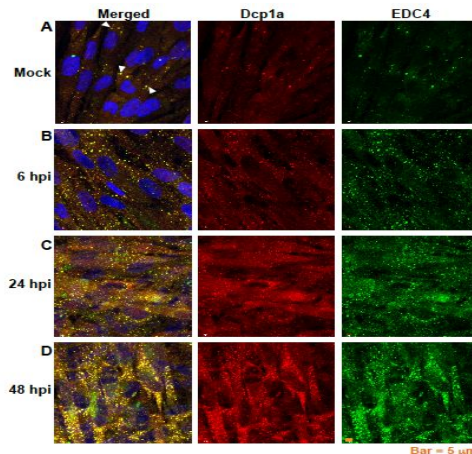
そこで、図 3 に示す様に、DISC ワクチンは生ワクチンと比較しても安全性が高く、免疫不全のヒトでも使用可能であると考えられるが、その中でも UL79 欠損の DISC ワクチンが最も安全性が高いのではないかと考えられた。

図 3

欠損ウイルス 蛋白	dlUL79	dlUL87	dlUL95
UL79	(-)	あり	あり
UL87	なし	(-)	なし
UL95	なし	あり	(-)

2. DISC ワクチンの安全性の検討-DISC ワクチン株は宿主ストレス応答を惹起するのか。

私達はこれまでに HCMV が感染許容細胞である HFF 細胞に感染すると宿主細胞に Processing bodies が大量に形成されることを明らかにしてきた(図 4、Seto E et al., *Virology in press*)。



(図 4)

3. TB40EBAC4 ウイルスの培養条件の確立

TB40E は HFF 細胞で継代を繰り返すと相同組換えによって、UL128-131 が欠損してしまうことが知られているため、内皮細胞で培養することが必要であることが知られている。当初の計画ではヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 細胞を使用する予定であったが、最近、免疫正常者でのサイトメガロウイルスによる角膜内皮炎が報告されるようになったため、初代培養細胞として、角膜内皮細胞を用いる事とした。

実験用ヒト角膜を米国より購入し、角膜内皮細胞を分離、培養する方法を眼科から当講座に所属する大学院生とともに確立した。

そこで、TB40EBAC4 を角膜内皮細胞に感染させたところ、HCMV 前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子に特異的な抗体を用いた Western blot 解析で、前初期蛋白 IE1, IE2, 初期蛋白 UL44, delayed 初期遺伝子 pp65 蛋白、後期蛋白 pp28 が発現することがわかった

以上の結果より、TB40EBAC4 の角膜内皮細胞への感染によって、TB40EBAC4 の溶解感染が成立することが、明らかになった。

5 . 主な発表論文等 (計 1 件)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Seto E, Inoue T, Nakatani Y, Yamada M, and Isomura H*: Processing bodies accumulate in human cytomegalovirus- infected cells and do not affect viral replication at high multiplicity of infection, **Virology, *in press*** (*: corresponding author)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯村 寛樹 (ISOMURA HIROKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20294415