

20020403

別紙2

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業
バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成15(2003)年4月

目次

I. 総括研究報告書	
バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発	1
松浦 善治	
II. 分担研究報告書	
1. バキュロウイルスを利用したターゲッティングベクターの開発	9
松浦 善治・森石 恆司・宮沢 孝幸	
2. バキュロウイルスを利用したウイルス様中空粒子ベクターの開発に関する研究	14
武田 直和	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
IV. 研究成果の刊行物・別冊	別添

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発

主任研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨

昆虫ウイルスであるバキュロウイルスが広範な哺乳動物に外来遺伝子を効率よく導入できることが明らかとなり、ヒトの遺伝子治療用ベクターとしての可能性が注目されている。バキュロウイルス粒子表面の外被蛋白質を目的の蛋白質に改変することにより、ターゲッティング可能なバキュロウイルスベクターの開発に成功した。また、組換えバキュロウイルスによって、E型肝炎ウイルス(HEV)の構造蛋白質を中空粒子として発現した。クリオ電顕と画像解析による粒子の三次構造解析、および産生された粒子のアミノ酸配列から、N末端、C末端、および内部中空の3箇所に外来遺伝子を導入可能な部位があることが明らかになった。中空粒子をマウスに経口投与したところ、血中にIgMとIgGのみならず、腸管にIgAが産生されることが観察され、HEV中空粒子は粘膜ワクチンとしての可能性が示唆された。

分担研究者

森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
宮沢孝幸 大阪大学微生物病研究所 助手
武田直和 国立感染症研究所 室長

られていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) ウイルス遺伝子は130kbpもあり、大きな(<15kbp) 外来遺伝子を挿入できる、2) ウイルスの遺伝子は全く哺乳動物細胞では発現しないため、細胞傷害性がほとんどなく有害な免疫応答の誘導もない、3) 組換えウイルスを短時間で作製できる、4) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない、5) 各種ウイルスの構造蛋白質を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現すると、中空ウイルス様粒子を大量に産生できる等の利点が考えられる。一方、欠点としては、バキュロウイルスは生体の補体系で不活化され易いことが指摘されている。

本研究はバキュロウイルスの特性を再考し、目的のリガンドを被ったターゲッティングベクター、昆虫細胞で産生させたウイルス様粒子を利用したベクター、さらに、極めて安定な多角体に包埋された耐熱性ベクターの開発を目的とする。

B. 研究方法

1) ターゲッティングベクターの構築

バキュロウイルスはその外被蛋白質(gp64)が動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して感染するため、遺伝子導入に特異性を持たせることは困難である。そこで、バキュロウイ

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究がスタートして10年が経過し、必ずしも満足できる成績ではないものの、本治療法が今世紀の先端医療の要となることは疑いの余地はない。遺伝子治療の成否を握るのは、安全に効率よく標的細胞へ遺伝子を導入できる、大きな組み込み容量を持った遺伝子導入ベクターの開発である。これまでの遺伝子治療用ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、そしてアデノ随伴ウイルスなどが主に利用されてきた。しかしながら、自立増殖ウイルスの出現や、ランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化等の安全性の問題、遺伝子導入効率や特異的な遺伝子導入法の改善の余地、ならびに、細胞毒性や免疫反応の誘導、中和抗体による不活化等の多くの難問が山積している。これらの問題を解決するには、既存のウイルスベクターにはない特徴を保持した、新しいウイルスベクター系の開発が必要である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスに注目している。

バキュロウイルスは、環状二本鎖DNAを遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考え

ルスの gp64 遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、狙った細胞だけに目的遺伝子を導入できるベクターの開発を試みた。一例としてバキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させ、代わりにレトロウイルスでもよく利用される水疱性口内炎ウイルスの G 蛋白質 (VSVG) を持ったシュードタイプウイルスを以下の手法で作製する。

(1) gp64 遺伝子欠損ウイルスの作製

バキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させるため、gp64 遺伝子領域を多角体プロモーターと緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子に置換したプラスミドベクターを作製する。このプラスミドとバキュロウイルス DNA を昆虫細胞にトランスフェクトすると、相同組換えが生じ、gp64 遺伝子領域を多角体プロモーターと GFP 遺伝子に置換された組換えウイルスが作製できる。

(2) このウイルスは gp64 遺伝子を欠損するため、そのままでは感染性を示さない。そこで、gp64 蛋白質を一過性に昆虫細胞で発現させて、上記の組換えウイルスを作製すると、一過性に粒子表面に gp64 蛋白質を被ったウイルスが作製できる。一回だけ昆虫細胞に感染できる。

(3) 外来遺伝子を組み込んだウイルスの作製

次に、哺乳動物細胞に導入したい遺伝子を挿入する。多角体遺伝子領域にルシフェラーゼ遺伝子をニワトリのアクチンプロモーターの下流に挿入したプラスミドを、gp64 蛋白質を発現するプラスミドとウイルス DNA とともに昆虫細胞に導入すると、相同組換えを起こし、一過性にウイルス粒子表面に gp64 蛋白質を被った組換えウイルスが作製できる。

(4) VSVG を被ったウイルスの作製

最後に、VSVG を一過性に被ったシュードタイプウイルスを作製する。VSVG 蛋白質を一過性に発現させた昆虫細胞に上記のウイルスを感染させると、VSVG を被ったシュードタイプウイルスを得ることができる。このウイルスが設計どおりに粒子表面に発現させた VSVG を介して細胞に遺伝子を導入していることを、抗 gp64 抗体と抗 VSVG 抗体を用いた中和試験で確認する。

2) ウイルス様粒子の作製

(1) 組換え HEV 中空粒子

HEV はエンベロープを持たない直径約 30nm の小型の球形ウイルスである。ゲノムは約 7.2kb のプラス一本鎖 RNA で、5'末端に Cap を、3'末端にポリアデニル酸をもつ。HEV 感染カニクイザルの胆汁から RNA を抽出し、

RT-PCR 法で構造蛋白領域をコードする ORF2 全領域を増幅した。ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させたフラグメントをトランスファーベクター pVL1393 にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出した。ブランククローニングで純化後、昆虫細胞 Tn5 細胞を感染させた。およそ 7 日間培養し、上清に遊離してきた浮上密度 1.285g/cm³、直径約 23-24nm のウイルス様中空粒子 (Virus-like particles, VLP) を塩化セシウム平衡密度勾配遠心で精製し、純度の高い粒子を得た。クリオ電顕とコンピュータによる画像解析で三次構造を推定した。

(2) 抗体検出 EIA

精製した組換え HEV (rHEV) VLP を抗原として 96 穴マイクロプレートにコーティングした。マウス血清をこのマイクロプレート上で 2 倍階段希釈し、パーオキシダーゼをラベルした抗マウス IgM、および抗マウス IgG を反応させた。基質 OPD の吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。

(3) マウスの経口免疫

10, 50, および 100 μ g の rHEV VLP を 500 μ l の PBS(-) に溶解し、4 週令の雌の BALB/c マウスにカテーテルで経口投与した。各容量、10 匹のマウスを用いた。対照として 500 μ l の PBS(-) を与えた。投与日を 0 日とし、11, 25 および 51 日に同量の rHEV VLP を経口投与した。血液および糞便を 1 週ごとに採取した。糞便は PBS(-) で 10% 乳剤を調製し、血清とともに -20 $^{\circ}$ C に保存した。血清中の IgM 抗体、IgG 抗体、IgA 抗体、および糞便中の IgA 抗体を EIA で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存した。実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号) の通知を踏ま

えつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

C. 研究結果

(1) gp64 遺伝子を欠損し、一過性に gp64 蛋白質を被ったウイルスの作製

まず、バキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させるため、gp64 遺伝子領域を多角体プロモーターと緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子に置換したプラスミドベクター pUC Δ 64/GFP を作製した。このプラスミドと多角体プロモーターの下流に β ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルス

(AcLacZ) DNA を昆虫細胞にコトランスフェクトすると、相同組換えが生じ、組換えウイルス Ac Δ 64/GFP/LacZ が作製できる。このウイルスは gp64 遺伝子を欠損するため、そのままでは感染性を示さない。そこで、gp64 蛋白質を一過性に昆虫細胞で発現できるように、gp64 遺伝子をアクチンプロモーターの下流に挿入した pA3Fb/gp64 を作製し、このプラスミドと pUC Δ 64/GFP および AcLacZ DNA を昆虫細胞に導入することにより一過性にウイルス粒子表面に gp64 蛋白質を被った、Ac Δ 64/GFP/LacZ*64 (*は一過性の意味とする) を作製した。このウイルスは、見かけ上は野生型のウイルスと同じであるが、gp64 遺伝子を欠損しているため、一回だけしか昆虫細胞に感染できない。

(2) 外来遺伝子を組み込んだウイルスの作製

次に、哺乳動物細胞に導入したい遺伝子を挿入する訳であるが、まず、蛍のルシフェラーゼ遺伝子を導入した。AcLacZ の LacZ 遺伝子領域を制限酵素で 1 箇所切断した直鎖状のウイルス DNA と多角体遺伝子領域に蛍のルシフェラーゼ遺伝子をニワトリのアクチンプロモーター (CAG プロモーター) の下流に挿入したプラスミド pAcCAG-Luc を gp64 蛋白質をコードする pA3Fb/gp64 とともに昆虫細胞に導入すると、昆虫細胞内で相同組換えを起こし、しかも一過性にウイルス粒子表面に gp64 蛋白質を被った、Ac Δ 64/GFP/CAG-Luc*64 が作製できる。

(3) VSVG を被ったシュードタイプウイルスの作製

最後に、gp64 蛋白質の代わりにウイルス粒子表面に提示したい蛋白質の選択であるが、まずは VSVG を一過性に被ったシュードタイプウイルスを作製した。pA3Fb に VSVG 遺伝子を導入した pA3Fb/VSVG を昆虫細胞にトランスフェクトし、24 時間後に Ac Δ

64/GFP/CAG-Luc*64 を感染させると、VSVG を被ったシュードタイプウイルス、Ac Δ 64/GFP/CAG-Luc*VSVG を得ることができると確認された。

Ac Δ 64/GFP/CAG-Luc*64 による遺伝子導入は抗 gp64 抗体によって中和されるが、Ac Δ 64/GFP/CAG-Luc*VSVG による遺伝子導入は抗 gp64 抗体では阻止できず、抗 VSVG 抗体で中和されたことから、設計どおりに粒子表面に発現させた VSVG を介して遺伝子が導入されていることが確認された。

(4) 組換え中空粒子の構造

HEV 構造蛋白質は、N 末端側 111 個のアミノ酸を欠失させることによって、初めて粒子構造を形成できるようになった。これまでの血清学的な性状解析から、この組換え粒子はネイティブな HEV 粒子と区別できない抗原性と免疫原性を持った粒子であることが明らかになっている。この粒子が担う抗原構造をさらに詳細に明らかにするため、クリオ電子顕微鏡による撮影と画像解析による構造解析を行った。解像度は 22 オングストロームである。その結果、rHEV VLP は正二十面体の 2 回対称軸上に突出したダイマーをもつ T=1 粒子の三次構造であることが推定された。中空粒子の中心から 50 オングストロームの蛋白殻底から 135 オングストロームの最大突出部を占める蛋白殻はダイマーが 30 ユニット集合して形成されていた。いまだネイティブな HEV 粒子の微細構造や構成蛋白質の性状が明らかになっていないので、組換え粒子がネイティブな HEV 粒子と同じ構造であるかどうかは現時点では結論できないが、類似の構造を持つことが想像される。また、内部は完全な中空であることから、この粒子を乖離し、再構成することによって目的とする遺伝子を内部に取り込むことが可能である。

(5) rHEV VLP を経口投与したマウスの免疫応答

組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞の 7 日目の培養上清を 1000x g で遠心して、組換えバキュロウイルスを除き、塩化セシウム平衡密度勾配遠心で純度の高い粒子を得た (通常 10 の 7 乗個の Tn5 細胞あたり 1 mg の精製粒子が得られる)。患者回復期血清を用いた免疫電子顕微鏡で特異的な凝集がみられ、この粒子を用いた EIA によって急性期の患者血清と感染サル血清から特異的抗 HEV-IgM および抗 HEV-IgG 抗体を、回復期の患者血清と感染サル血清から特異的抗 HEV-IgG 抗体を検出した。したがってこの中空粒子はネイティブ

な粒子に近い抗原性を持つと考えられる。

経口免疫ワクチンとしての免疫学的基礎を得るため、rHEV VLPを四週齢のBALB/cを用い、一匹あたり10、50、100ugのVLPを経口投与した。産生される抗体を追跡し、ワクチンとして利用することが可能であるかを検討した。初回免疫を0日として11、25、および51日目に追加免疫を行った。経時的に尾動脈から採血して血清を分離した。同時に糞便を採集し10%乳剤を調製した。血中のIgG抗体、IgM抗体、IgA抗体、および便中のIgA抗体を測定した結果、50ugのVLPを投与したマウス群が最も良い応答を示した。初回免疫1週後の血中には既に特異的IgMが認められ、IgG抗体も3週後には産生されていた。便中のIgA抗体も5週後には有意に上昇し、経口投与による明らかな免疫効果が観察された。血中IgM抗体は急速に消失したが、IgGは4回の経口投与後少なくとも3ヶ月間、糞便中のIgAも一ヶ月程度持続した。追加免疫によってIgGとIgA抗体ではブースター効果も認められた。一方、対照として腹腔投与したマウスでは、血中の抗HEV IgM、IgG抗体の誘導は認められたものの、腸管IgAは全く誘導されていなかった。経口免疫によって特異的な腸管免疫が誘導されることから、粘膜ワクチンとして可能性が示唆された。

D. 考察

粒子表面に提示させる蛋白質の改変により特異性を付与できるばかりでなく、受容体の検索も可能である。また、導入する遺伝子を工夫することにより、遺伝子治療や遺伝子クローニングのみならず、ウイルスの受容体を被ったバキュロウイルスを作製すれば、慢性感染した細胞のみを生体から排除できる(エイズやC型肝炎への応用)ばかりでなく、抗癌療法等の幅広い応用が期待できる。

組換えバキュロウイルスでE型肝炎ウイルスの構造蛋白を発現すると、ウイルス様中空粒子が産生される。粒子形成には、遺伝子のN末端を欠失させた遺伝子を用いることが必須である。実際、精製した粒子の構成蛋白を分離し、N末端のアミノ酸配列を解析してみると、112番目のアミノ酸である。ところが、興味深いことに、C末端のアミノ酸配列は均一ではなく、いずれも約60アミノ酸欠損していた。手持ちのクリオ電顕とアミノ酸配列のデータから、粒子形成に必要なアミノ酸配列を特定することはできていないが、進行中のX線結晶解析で明らかにしていきたい。また、欠損した両末端への

外来性遺伝子の導入も検討していきたい。

rHEV VLPは内部が中空であることが明らかになったので、ベクターとして外来性遺伝子を挿入できる部位は、遺伝子の両末端と、粒子の中空内部の3箇所である。

rHEV VLPは、経口投与と腹腔内注射の結果、投与ルートに関わらず特異的にマウスの免疫反応を誘導する。特筆すべきは、これらの抗体の誘導にはアジュバントが全く必要なかったこと、さらに経口投与において腹腔投与では認められなかった腸管IgAの産生が誘導できたことである。腸管IgA抗体がHEV感染に対していかなる免疫防御の役割を担当するかはまだはっきり分かっていない。しかしながら、E型肝炎ウイルスの第一義の感染部位が腸管上皮であることを考えると、ワクチンの有効性を評価する上では大きな利点である。粒子内部に取り込まれた外来遺伝子が、経口投与によって腸管上皮で発現するか否か、興味のあるところである。

本研究が対象としE型肝炎ウイルスの中空粒子は、ウイルス遺伝子を有しない、ウイルス様粒子として産生される。したがって、通常の経口ワクチンと異なり、投与されたウイルスが増殖することは全くない。よって、AIDS患者のように免疫不全であったり、免疫欠損の個体にも投与することが可能である。利点のひとつである。

E. 結論

バキュロウイルスのgd64遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、狙った細胞だけに目的遺伝子を導入できるベクターを開発した。

組換えバキュロウイルスで産生したE型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子は、クリオ電顕による三次構造解析から、内部が完全な中空であることが確認された。中空粒子は経口投与によって血中抗体と腸管分泌抗体の両者を誘導できた。中空粒子の内部に目的遺伝子を格納することによって、腸管上皮細胞に遺伝子を導入するベクターとして使える可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

これまでE型肝炎は輸入感染症と考えられてきたが、わが国にも少なからず存在することが明らかになってきている。海外渡航歴の全くない人がE型肝炎と診断される例がわが国でも確認されるようになってきた。非A非B非C型急性肝炎と診断された場合、原因のひとつとしてE型肝炎を疑うべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Fukuta M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., and Kaibuchi K. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*, **109**, 837-885 (2002).
- Moriishi K., Koura M., and Matsuura Y. Induction of Bad-mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection: Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family. *Virology*, **292**, 258-271 (2002).
- Ishii K., Ueda Y., Matsuo K., Matsuura Y., Kitamura T., Kato K., Izumi Y., Someya K., Ohsu T., Honda M., and Miyamura T. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: Application as a new replication-deficient viral vector. *Virology*, **302**, 433-444 (2002).
- Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimura S., Koike K., and Miyamura T. Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C core protein. *Virology*, **304**, 415-424 (2002).
- Burioni R., Matsuura Y., Mancini N., Tani H., Miyamura T., Valardo P.E., and Clementi M. Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived from a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype. *J. Virol*, **76**, 11775-11779 (2002).
- Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor a modulates its transcriptional activity. *Hepatology*, **35**, 937-946 (2002).
- Aizaki H., Harada T., Otsuka M., Seki N., Matsuda M., Li Y-W., Kawakami H., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Expression profiling of liver cell lines expressing entire- or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology*, **36**, 1431-1438 (2002).
- Dubourdeau M., Miyamura T., Matsuura Y., Alric L., Pipy B., and Rousseau D. Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21^{waf1} down-regulation; effect of transforming growth factor β . *J of Hepatology*, **37**, 486-492 (2002).
- Matsui M., Moriya O., Abdel-Aziz N., Matsuura Y., Miyamura T., and Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine*, **21**, 211-220 (2002).
- Miyamura T., and Matsuura Y. Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*. (Margolis H.S., Alter M.J., Liang T. J., and Dienstag J.L. ed.) International Medical Press, Atlanta, 289-293 (2002).
- 松浦善治、C型肝炎ウイルスの感染機構、ウイルス、**52**,185-190 (2002).
- 松浦善治、C型肝炎ワクチンの開発、総合臨床、**51**,1919-1923 (2002).
- Utagawa ET, Nakazawa E. Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T: Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J. Virol. Methods* 2002;100: 49-56.
- Someya Y, Takeda N. Miyamura T: Identification of Active-Site Amino Acid Residues in the Chiba Virus 3C-Like Protease. *J. Virol.* 2002;76: 5949-5958.
- Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N. Ishaque SM, Hasan M; Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66: 721-724.
- Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S,

- Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, Takeda N, Yasutomi Y: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002;293: 273-280.
- Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinihara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100: 107-114.
- Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK: Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40: 2459-2465.
- Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N: Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* 2002;299: 225-239.
- Ishko H, Shimada Y, Yanoha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002;185: 744-754.
- Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Yamazaki S, Takeda N: Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirolgy* 2002;45: 136-141.
- 2. 学会発表**
- Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M., Murakami K., Ishii K., Nagamori S., Kawakami H., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., and Miyamura T.: Production and release of infectious HCV particles from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. 9th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Diego, USA, July, 2002.
- Kimura-Someya T., K., Ishii, T., Miyamura, and Y. Matsuura: Membrane topology of E1 glycoprotein of HCV on the endoplasmic reticulum. *Ibid.*
- Okabayashi T., Moriishi K., and Matsuura Y., Nuclear localization of flavivirus core proteins. *Ibid.*
- Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Moriya K., Koike K., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Suzuki R., Suzuki T., T., Miyamura T., and Matsuura Y.: Nuclear localization of HCV core protein through PA28 γ -dependent pathway. *Ibid.*
- Matsuura Y.: Infection mechanisms of hepatitis C virus. 2nd Symposium of High Technology Research Center, Chiba, Japan, Jan, 2003.
- Yatsuhashi H, Yano K, Koga M, Ishibashi H, M. Y, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Kahn M: Hepatitis E in Japan, ASM 102nd General Meeting, Salt Lake City, 2002 May.
- Kamata K, Kato D, Sato T, Gondaira F, Takasugi K, Sato S, Natori K, Kitamoto N, Miyamura T, Tanaka T, Takeda N: Development of an ELISA-Based Assay for the Detection and Genogrouping of Norwalk-Like Virus in Stools using Genogroup I and II-Specific Monoclonal Antibodies. *Ibid.*
- Li T-C, Takeda N, Xing L, Haag L, Nilsson JC, R H., Miyamura T: Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Human Polyomavirus BK Generated by Recombinant Baculoviruses. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July.
- Kobayashi S, Sakae K, Kamata K, Sato T, Natori K, Takeda N: Development of immunomagnetic capture RT-PCR for detection of "Norwalk-like viruses" in foods. *Ibid.*
- Katayama K, Horikoshi-Shirato H, Oka T, Natori N, Takeda N, Miyamura T: Genotyping of "Norwalk-like viruses" based on phylogenetic analyses of 18 full genome sequences. *Ibid.*

- Wakuda M, Sasaki J, Urasawa T, Urasawa S, Takeda N, Taniguchi K: Completenucleotide sequence of Otofuke-like virus, a member of Norwalk-like viruses in Caliciviridae, detected in Japan. *Ibid*.
- 北川善紀、谷 英樹、林 昌宏、森石恆司、松浦善治: 新規シュードタイプバキュロウイルス作製系の開発 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月、札幌。
- 阿部隆之、北川善紀、辺見弘明、森石恆司、高久 洋、審良静男、松浦善治: バキュロウイルスエンベロープ蛋白質による自然免疫誘導機構の解析 同上。
- 山岸潤也、松浦善治: DNA マイクロアレイを用いたバキュロウイルス遺伝子発現の解析 同上。
- 林 昌宏、谷 英樹、鈴木健介、菰田泰正、森石恆司、鈴木亮介、染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治: HCV エンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプVSV 同上。
- 染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治: C型肝炎ウイルスE1エンベロープ蛋白質の小胞体における膜トポロジー 同上。
- 中井康介、森石恆司、染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治: C型肝炎ウイルスE1蛋白質とコア蛋白質との結合様式の解析 同上。
- 西村順裕、浜本いつき、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルスNS5A蛋白質と相互作用する宿主細胞蛋白質 同上。
- 鈴木亮介、坂本真一郎、堤武也、下池貴志、松浦善治、宮村達男、鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析 同上。
- 岡林環樹、森 嘉生、長谷部 太、小西英二、只野昌之、森石恆司、松浦善治: フラビウイルスコア蛋白質の核内移行の解析 同上。
- 森石恆司、岡林環樹、中井康介、鈴木亮介、宮村達男、松浦善治: HCV コア蛋白質の新しい核内移行・局在化機構 同上。
- 高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏 HIV CTL エピトープ表出E型肝炎ウイルス様中空粒子の経口投与による粘膜面におけるエピトープ特異的細胞性免疫の誘導 同上。
- 石古博昭、三浦里香、島田康司、山崎修道、武田直和 VP4塩基配列に基づく系統解析によって、ヒトライノウイルス87型はヒトエンテロウイルス68型に同定された 同上。
- 上。
- 内野清子、岩上泰雄、三好龍也、吉田永祥、前田章子、田中智之、鎌田公仁夫、北本憲利、名取克郎、武田直和 NLV 抗原検出ELISA法を用いた食中毒事例への対応と評価・問題点 同上。
- 影山 努、小嶋慈之、高井玲子、星野文則、福士秀悦、白土東子、岡 智一郎、片山和彦、武田直和 Norwalk-like viruses を genogroup 特異的に認識するモノクローナル抗体の作製 同上。
- 勢戸祥介、入谷展弘、名取克郎、武田直和、久保英幸、綾田 稔、小倉 壽、青木孝祐 大阪市内で検出した Alphatron type NV の遺伝子解析および抗原性の解析 同上。
- 植木 洋、有田富和、後藤郁男、山木紀彦、佐藤千鶴子、渡邊 節、沖村容子、秋山和夫、山本俊夫、白石廣行、武田直和 感染性胃腸炎患者・河川水・養殖カキから検出したNVの遺伝子解析 同上。
- 入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、青木孝祐、名取克郎、武田直和、瀬戸俊之、服部英司、綾田 稔、小倉 壽 乳幼児における Norwalk virus 感染に対する免疫応答 同上。
- 白土(堀越)東子、片山和彦、田村 克、名取克郎、岡 智一郎、武田直和、宮村達男 ノーウォーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討— 同上。
- 片山和彦、白土(堀越)東子、岡 智一郎、小嶋慈之、影山 努、福士秀悦、武田直和 Norwalk-like viruses の Full-length cDNA クローンをを用いた複製機構の解析 同上。
- 李 天成、武田直和、宮村達男 BK ウイルス様中空粒子の三次構造の解析及び診断への応用 同上。
- 保富康宏、高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男 E型肝炎ウイルス(HEV) ウィルス様中空粒子(VLP)をベクターとして用いた経口ワクチンの開発 同上。
- 武田直和 Histo-blood group antigens とノーウォークウイルスに対する感受性 同上。
- 小林慎一、榮 賢司、宮崎 豊、田中智之、名取克郎、武田直和 Immunomagnetic capture RT-PCR法による食品中のノーウォークウイルスの検出 第23回衛生微生物技術協議会、奈良、2002年7月。
- 田中智之、内野清子、岩上泰雄、吉田永祥、

鎌田公仁夫、名取克郎、武田直和 NLV 抗原検出 ELISA 法の普及とその意義 同上。岩上泰雄、内野清子、鎌田公仁夫)、北元憲利、阪本瑠子、家永信彦、武田直和、田中智之。小児下痢症の腸管内ウイルス重感染の可能性 第43回日本臨床ウイルス学会、秋田、2002年6月。

石井孝司、上田良昭、松浦善治、宮村達男、松尾和浩、大洲竹晃、本多三男：高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の解析とウイルスベクターとしての応用 第12回抗ウイルス化学療法研究会、平成14年3月、東京

松原尚子、片山和彦、白土東子、岡 智一郎、小川智子、武田直和、浜野国勝、福士秀悦、小嶋慈之、影山 努、高井礼子、星野文則、宮村達男 バキュロウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現 第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002年12月

Masaru Tamura, Katsuro Natori, Masahiko Kobayashi, Tatsuo Miyamura, Naokazu Takeda Soluble histone molecules inhibit attachment of Norwalk-like viruses to mammalian cells 同上。

H. 知的所有権の出願・登録状況

発明の名称：バキュロウイルスベクター、該バキュロウイルスベクターの製造方法及び該バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法

発明者：松浦善治

出願人：大阪 TLO

発明機関：大阪大学微生物病研究所

出願番号：特願 2002-278469

出願日：2002年9月25日

発明内容の概略：昆虫を宿主とするバキュロウイルスは、約130kbpの環状2本鎖DNAをゲノムとして持っている。近年、バキュロウイルスが昆虫細胞のみならず、広範な哺乳動物細胞にも複製することなく、効率よく外来遺伝子を導入できることが判明し、新しい遺伝子導入ベクターとして、一躍注目を浴びる事となった。しかしながら、バキュロウイルスはその外被蛋白質(gp64)が動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して感染するため、遺伝子導入に特異性を持たせることは困難であった。本発明はバキュロウイルスの gp64 遺

伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、狙った細胞だけに目的遺伝子を導入することを可能にする新技術である。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

バキュロウイルスを利用したターゲッティングベクターの開発

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授
森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
宮沢孝幸 大阪大学微生物病研究所 助手

研究要旨

昆虫ウイルスであるバキュロウイルスが広範な哺乳動物に複製することなく外来遺伝子を効率よく導入できることが明らかとなり、ヒトの遺伝子治療用ベクターとしての可能性が注目されている。バキュロウイルス粒子表面の外被蛋白質を目的の蛋白質に改変することにより、ターゲッティング可能なバキュロウイルスベクターの開発に成功した。

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究がスタートして10年が経過し、必ずしも満足できる成績ではないものの、本治療法が今世紀の先端医療の要となることは疑いの余地はない。遺伝子治療の成否を握るのは、安全に効率よく標的細胞へ遺伝子を導入できる、大きな組み込み容量を持った遺伝子導入ベクターの開発である。これまでの遺伝子治療用ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、そしてアデノ随伴ウイルスなどが主に利用されてきた。しかしながら、自立増殖ウイルスの出現や、ランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化等の安全性の問題、遺伝子導入効率や特異的な遺伝子導入法の改善の余地、ならびに、細胞毒性や免疫反応の誘導、中和抗体による不活化等の多くの難問が山積している。これらの問題を解決するには、既存のウイルスベクターにはない特徴を保持した、新しいウイルスベクター系の開発が必要である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスに注目している。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。

本研究はバキュロウイルスの特性を再考し、目的のリガンドを被ったターゲッティングベクターの開発を目的とする。

B. 研究方法

ターゲッティングベクターの構築

バキュロウイルスはその外被蛋白質 (gp64) が動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して感染するため、遺伝子導入に特異性を持たせることは困難である。そこで、バキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、狙った細胞だけに目的遺伝子を導入できるベクターの開発を試みた。

一例としてバキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させ、代わりにレトロウイルスでもよく利用される水疱性口内炎ウイルスの G 蛋白質 (VSVG) を持ったシールドタイプウイルスを以下の手法で作製する。

(1) gp64 遺伝子欠損ウイルスの作製

バキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させるため、gp64 遺伝子領域を多角体プロモーターと緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子に置換したプラスミドベクターを作製する。このプラスミドとバキュロウイルス DNA を昆虫細胞にトランスフェクトすると、相同組換えが生じ、gp64 遺伝子領域を多角体プロモーターと GFP 遺伝子に置換された組換えウイルスが作製できる。

(2) このウイルスは gp64 遺伝子を欠損するため、そのままでは感染性を示さない。そこで、gp64 蛋白質を一過性に昆虫細胞で発現させて、上記の組換えウイルスを作

製すると、一過性に粒子表面に gp64 蛋白質を被ったウイルスが作製できる。一回だけ昆虫細胞に感染できる。

(3) 外来遺伝子を組み込んだウイルスの作製

次に、哺乳動物細胞に導入したい遺伝子を挿入する。多角体遺伝子領域にルシフェラーゼ遺伝子をニワトリのアクチンプロモーターの下流に挿入したプラスミドを、gp64 蛋白質を発現するプラスミドとウイルス DNA とともに昆虫細胞に導入すると、相同組換えを起こし、一過性にウイルス粒子表面に gp64 蛋白質を被った組換えウイルスが作製できる。

(4) VSVG を被ったウイルスの作製

最後に、VSVG を一過性に被ったシュードタイプウイルスを作製する。VSVG 蛋白質を一過性に発現させた昆虫細胞に上記のウイルスを感染させると、VSVG を被ったシュードタイプウイルスを得ることができる。このウイルスが設計どおりに粒子表面に発現させた VSVG を介して細胞に遺伝子を導入していることを、抗 gp64 抗体と抗 VSVG 抗体を用いた中和試験で確認する。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存した。実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号)の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

C. 研究結果

(1) gp64 遺伝子を欠損し、一過性に gp64 蛋白質を被ったウイルスの作製

まず、バキュロウイルスの gp64 遺伝子

を欠損させるため、gp64 遺伝子領域を多角体プロモーターと緑色蛍光蛋白質

(GFP) 遺伝子に置換したプラスミドベクター pUCΔ64/GFP を作製した。このプラスミドと多角体プロモーターの下流に β ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルス (AcLacZ) DNA を昆虫細胞にコトランスフェクトすると、相同組換えが生じ、組換えウイルス AcΔ64/GFP/LacZ が作製できる。このウイルスは gp64 遺伝子を欠損するため、そのままでは感染性を示さない。そこで、gp64 蛋白質を一過性に昆虫細胞で発現できるように、gp64 遺伝子をアクチンプロモーターの下流に挿入した pA3Fb/gp64 を作製し、このプラスミドと pUCΔ64/GFP および AcLacZ DNA を昆虫細胞に導入することにより一過性にウイルス粒子表面に gp64 蛋白質を被った、AcΔ64/GFP/LacZ*64 (*は一過性の意味とする) を作製した。このウイルスは、見かけ上は野生型のウイルスと同じであるが、gp64 遺伝子を欠損しているため、一回だけしか昆虫細胞に感染できない。

(2) 外来遺伝子を組み込んだウイルスの作製

次に、哺乳動物細胞に導入したい遺伝子を挿入する訳であるが、まず、蛍のルシフェラーゼ遺伝子を導入した。AcLacZ の LacZ 遺伝子領域を制限酵素で 1 箇所切断した直鎖状のウイルス DNA と多角体遺伝子領域に蛍のルシフェラーゼ遺伝子をニワトリのアクチンプロモーター(CAG プロモーター)の下流に挿入したプラスミド pAcCAG-Luc を gp64 蛋白質をコードする pA3Fb/gp64 とともに昆虫細胞に導入すると、昆虫細胞内で相同組換えを起こし、しかも一過性にウイルス粒子表面に gp64 蛋白質を被った、AcΔ64/GFP/CAG-Luc*64 が作製できる。

(3) VSVG を被ったシュードタイプウイルスの作製

最後に、gp64 蛋白質の代わりにウイルス粒子表面に提示したい蛋白質の選択であるが、まずは VSVG を一過性に被ったシュードタイプウイルスを作製した。pA3Fb に VSVG 遺伝子を導入した pA3Fb/VSVG を昆虫細胞にトランスフェクトし、24 時間後に AcΔ64/GFP/CAG-Luc*64 を感染させると、VSVG を被ったシュードタ

イプウイルス、AcΔ64/GFP/CAG-Luc*VSVGを得ることができる。

AcΔ64/GFP/CAG-Luc*64による遺伝子導入は抗gp64抗体によって中和されるが、AcΔ64/GFP/CAG-Luc*VSVGによる遺伝子導入は抗gp64抗体では阻止できず、抗VSVG抗体で中和されたことから、設計どおりに粒子表面に発現させたVSVGを介して遺伝子が導入されていることが確認された。

D. 考察

粒子表面に提示させる蛋白質の改変により特異性を付与できるばかりでなく、受容体の検索も可能である。また、導入する遺伝子を工夫することにより、遺伝子治療や遺伝子クローニングのみならず、ウイルスの受容体を被ったバキュロウイルスを作製すれば、慢性感染した細胞のみを生体から排除できる（エイズやC型肝炎への応用）ばかりでなく、抗癌療法等の幅広い応用が期待できる。

E. 結論

バキュロウイルスのgp64遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、狙った細胞だけに目的遺伝子を導入できるベクターを開発した。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukuta M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., and Kaibuchi K. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*, **109**, 837-885 (2002).
Moriishi K., Koura M., and Matsuura Y. Induction of Bad-mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection: Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family. *Virology*, **292**, 258-271(2002).
Ishii K., Ueda Y., Matsuo K., Matsuura Y., Kitamura T., Kato K., Izumi Y.,

Someya K., Ohsu T., Honda M., and Miyamura T. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: Application as a new replication-deficient viral vector. *Virology*, **302**, 433-444 (2002).

Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimura S., Koike K., and Miyamura T. Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C core protein. *Virology*, **304**, 415-424 (2002).

Burioni R., Matsuura Y., Mancini N., Tani H., Miyamura T., Varaldo P.E., and Clementi M. Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived from a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype. *J. Virol*, **76**, 11775-11779 (2002).

Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor a modulates its transcriptional activity. *Hepatology*, **35**, 937-946(2002).

Aizaki H., Harada T., Otsuka M., Seki N., Matsuda M., Li Y-W., Kawakami H., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Expression profiling of liver cell lines expressing entire- or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology*, **36**, 1431-1438 (2002).

Dubourdeau M., Miyamura T., Matsuura Y., Alric L., Pipy B., and Rousseau D. Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21^{waf1} down-regulation; effect of transforming growth factor β. *J of Hepatology*, **37**, 486-492 (2002).

Matsui M., Moriya O., Abdel-Aziz N., Matsuura Y., Miyamura T., and

Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine*, 21, 211-220 (2002).

Miyamura T., and Matsuura Y. Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*. (Margolis H.S., Alter M.J., Liang T. J., and Dienstag J.L. ed.) International Medical Press, Atlanta, 289-293 (2002).

松浦善治, C型肝炎ウイルスの感染機構、ウイルス、52,185-190 (2002).

松浦善治, C型肝炎ワクチンの開発、総合臨床、51,1919-1923 (2002).

2. 学会発表

Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M., Murakami K., Ishii K., Nagamori S., Kawakami H., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., and Miyamura T.: Production and release of infectious HCV particles from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. 9th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Diego, USA, July 7-11, 2002.

Kimura-Someya T., K., Ishii, T., Miyamura, and Y. Matsuura: Membrane topology of E1 glycoprotein of HCV on the endoplasmic reticulum. *Ibid.*

Okabayashi T., Moriishi K., and Matsuura Y., Nuclear localization of flavivirus core proteins. *Ibid.*

Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Moriya K., Koike K., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Suzuki R., Suzuki T., T., Miyamura T., and Matsuura Y.: Nuclear localization of HCV core protein through PA28 γ -dependent pathway. *Ibid.*

Matsuura Y.: Infection mechanisms of hepatitis C virus. 2nd Symposium of High Technology Research Center,

Chiba, Japan, Jan 28-29, 2003.

北川善紀、谷 英樹、林 昌宏、森石恆司、松浦善治: 新規シュードタイプバキュロウイルス作製系の開発 第50回日本ウイルス学会、平成14年10月、札幌。

阿部隆之、北川善紀、辺見弘明、森石恆司、高久 洋、審良静男、松浦善治: バキュロウイルスエンベロープ蛋白質による自然免疫誘導機構の解析 同上。

山岸潤也、松浦善治: DNAマイクロアレイを用いたバキュロウイルス遺伝子発現の解析 同上。

林 昌宏、谷 英樹、鈴木健介、菰田泰正、森石恆司、鈴木亮介、染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治: HCV エンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプ VSV 同上。

染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治: C型肝炎ウイルス E1 エンベロープ蛋白質の小胞体における膜トポロジー 同上。

中井康介、森石恆司、染谷友美、石井孝司、宮村達男、松浦善治: C型肝炎ウイルス E1 蛋白質とコア蛋白質との結合様式の解析 同上。

西村順裕、浜本いつき、森石恆司、松浦善治: C型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質と相互作用する宿主細胞蛋白質 同上。

鈴木亮介、坂本真一郎、堤武也、下池貴志、松浦善治、宮村達男、鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析 同上。

岡林環樹、森 嘉生、長谷部 太、小西英二、只野昌之、森石恆司、松浦善治: フラビウイルスコア蛋白質の核内移行の解析 同上。

森石恆司、岡林環樹、中井康介、鈴木亮介、宮村達男、松浦善治: HCV コア蛋白質の新しい核内移行・局在化機構 同上。

石井孝司、上田良昭、松浦善治、宮村達男、松尾和浩、大洲竹晃、本多三男: 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の解析とウイルスベクターとしての応用 第12回抗ウイルス化学療法研究会、平成14年3月、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

発明の名称: バキュロウイルスベクター、該バキュロウイルスベクターの製造方法及び該バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法

発明者：松浦善治

出願人：大阪 TLO

発明機関：大阪大学微生物病研究所

出願番号：特願 2002-278469

出願日：2002年9月25日

発明内容の概略：昆虫を宿主とするバキュロウイルスは、約130kbpの環状2本鎖DNAをゲノムとして持っている。近年、バキュロウイルスが昆虫細胞のみならず、広範な哺乳動物細胞にも複製することなく、効率よく外来遺伝子を導入できることが判明し、新しい遺伝子導入ベクターとして、一躍注目を浴びる事となった。

しかしながら、バキュロウイルスはその外被蛋白質（gp64）が動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して感染するため、遺伝子導入に特異性を持たせることは困難であった。本発明はバキュロウイルスのgp64遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって、狙った細胞だけに目的遺伝子を導入することを可能にする新技術である。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

バキュロウイルスを利用したウイルス様中空粒子ベクターの開発に関する研究

分担研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
協力研究者 李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨 組換えバキュロウイルスによって、E型肝炎ウイルスの構造蛋白を中空粒子として発現した。クリオ電顕と画像解析による粒子の三次構造の解析、および産生された粒子のアミノ酸配列から、外来遺伝子導入部位が、N末端、C末端、および内部中空の3箇所にあることが明らかになった。中空粒子をマウスに経口投与したところ、血中IgM抗体、IgG抗体のみならず、腹腔内注射では誘導できない腸管IgA抗体が産生されることを観察した。腸管特異的な粘膜ワクチンとしての可能性が示唆された。

A. 研究目的

E型肝炎はE型肝炎ウイルス(Hepatitis E virus, HEV)の感染によって引き起こされる急性肝炎である。E型肝炎は発展途上国で常時散発的に発生している疾患であるが、ときとして飲料水などを介し大規模な流行を引き起こすことが知られている。先進国において、E型肝炎は輸入感染症と思われていたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性E型肝炎患者が発見されており、日本にでもすでに土着している可能性が高い。また、養豚からもヒトのHEVと遺伝学的に近縁のウイルスが検出され、人獣共通感染症の可能性が指摘されている。

HEVは口から体内に進入し、レセプターを解して腸管上皮細胞に結合して感染が開始されると考えられている。その後の詳細なメカニズムは不明であるが、おそらくパイエル板を経由して血管内に侵入し、いわゆるウイルス血症をひき起こす。この後のメカニズムもよくわかっていないが、循環している過程で、おそらく門脈を介して肝臓に到達し、肝細胞の細胞質で増殖すると考えられている。したがって、E型肝炎ウイルス粒子は腸管上皮細胞と肝細胞に高い特異性を有していると考えられ、これらの臓器への遺伝子導入に有用な素材としての可能性を有している。我々は先に、組換えバキュロウイルスで構造蛋白を発現するとE型肝炎ウイルス様の中空粒子が産生されることを見出した。本研究では、クリオ電顕と画像解析によって三次構造を解析し、中空粒子の構造を明らかにするとともに、外来遺伝子が導入可能な部位を検討した。また、マウスに中空粒子を経口投与し、HEV

特異抗体が誘導できるかを評価し、消化器粘膜を経由した食べるワクチンとしての有効性を検討した。

B. 研究方法

1) 組換え HEV 中空粒子

HEVはエンベロープを持たない直径約30nmの小型の球形ウイルスである。ゲノムは約7.2kbのプラス一本鎖RNAで、5'末端にCapを、3'末端にポリアデニル酸をもつ。HEV感染カニクイザルの胆汁からRNAを抽出し、RT-PCR法で構造蛋白領域をコードするORF2全領域を増幅した。ORF2のN末端から111アミノ酸を欠失させたフラグメントをトランスファーベクターpVLI393にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出した。プラーククローニングで純化後、昆虫細胞Tn5細胞を感染させた。およそ7日間培養し、上清に遊離してきた浮上密度1.285g/cm³、直径約23-24nmのウイルス様中空粒子(Virus-like particles, VLP)を塩化セシウム平衡密度勾配遠心で精製し、純度の高い粒子を得た。クリオ電顕とコンピュータによる画像解析で三次構造を推定した。

2) 抗体検出 EIA

精製した組換えHEV(rHEV)VLPを抗原として96穴マイクロプレートにコーティングした。マウス血清をこのマイクロプレート上で2倍階段希釈し、パーオキシダーゼをラベルした抗マウスIgM、および抗マウスIgGを反応させた。基質OPDの吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。

3) マウスの経口免疫

10, 50, および 100 µg の rHEV VLP を 500 µl の PBS(-) に溶解し、4 週令の雌の BALB/c マウスにカテーテルで経口投与した。各容量、10 匹のマウスを用いた。対照として 500 µl の PBS(-) を与えた。投与日を 0 日とし、11、25 および 51 日に同量の rHEV VLP を経口投与した。血液および糞便を 1 週ごとに採取した。糞便は PBS(-) で 10% 乳剤を調製し、血清とともに -20°C に保存した。血清中の IgM 抗体、IgG 抗体、IgA 抗体、および糞便中の IgA 抗体を EIA で測定した。

C. 研究結果

1) 組換え中空粒子の構造

HEV 構造蛋白は、N 末端側 111 個のアミノ酸を欠失させることによって、初めて粒子構造を形成できるようになった。これまでの血清学的な性状解析から、この組換え粒子はネイティブな HEV 粒子と区別できない抗原性と免疫原性を持った粒子であることが明らかになっている。この粒子が担う抗原構造をさらに詳細に明らかにするため、クリオ電子顕微鏡による撮影と画像解析による構造解析を行った。解像度は 22 オングストロームである。その結果、rHEV VLP は正二十面体の 2 回対称軸上に突出したダイマーをもつ T=1 粒子の三次構造であることが推定された。中空粒子の中心から 50 オングストロームの蛋白殻底から 135 オングストロームの最大突出部を占める蛋白殻はダイマーが 30 ユニット集合して形成されていた。いまだネイティブな HEV 粒子の微細構造や構成蛋白の性状が明らかになっていないので、組換え粒子がネイティブな HEV 粒子と同じ構造であるかどうかは現時点では結論できないが、類似の構造を持つことが想像される。また、内部は完全な中空であることから、この粒子を乖離し、再構成することによって目的とする遺伝子を内部に取り込むことが可能である。

2) rHEV VLP を経口投与したマウスの免疫応答

組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞の 7 日目の培養上清を 1000xg で遠心して、組換えバキュロウイルスを除き、塩化セシウム平衡密度勾配遠心で純度の高い粒子を得た（通常 10 の 7 乗個の Tn5 細胞あたり 1 mg の精製粒子が得られる）。患者回復期血清を用いた免疫電子顕微鏡で特異的な凝集がみられ、この粒

子を用いた EIA によって急性期の患者血清と感染サル血清から特異的抗 HEV-IgM および抗 HEV-IgG 抗体を、回復期の患者血清と感染サル血清から特異的抗 HEV-IgG 抗体を検出した。したがってこの中空粒子はネイティブな粒子に近い抗原性を持つと考えられる。

経口免疫ワクチンとしての免疫学的基礎を得るため、rHEV VLP を四週齢の BALB/c を用い、一匹あたり 10、50、100 µg の VLP を経口投与した。産生される抗体を追跡し、ワクチンとして利用することが可能であるかを検討した。初回免疫を 0 日として 11、25、および 51 日目に追加免疫を行った。経時的に尾動脈から採血して血清を分離した。同時に糞便を採集し 10% 乳剤を調製した。血中の IgG 抗体、IgM 抗体、IgA 抗体、および便中の IgA 抗体を測定した結果、50 µg の VLP を投与したマウス群が最も良い応答を示した。初回免疫 1 週後の血中には既に特異的 IgM が認められ、IgG 抗体も 3 週間には産生されていた。便中の IgA 抗体も 5 週間には有意に上昇し、経口投与による明らかな免疫効果が観察された。血中 IgM 抗体は急速に消失したが、IgG は 4 回の経口投与後少なくとも 3 ヶ月間、糞便中の IgA も一ヶ月程度持続した。追加免疫によって IgG と IgA 抗体ではブースター効果も認められた。一方、対照として腹腔投与したマウスでは、血中の抗 HEV IgM、IgG 抗体の誘導は認められたものの、腸管 IgA は全く誘導されていなかった。経口免疫によって特異的な腸管免疫が誘導されることから、粘膜ワクチンとして可能性が示唆された。

D. 考察

組換えバキュロウイルスで E 型肝炎ウイルスの構造蛋白を発現すると、ウイルス様中空粒子が産生される。粒子形成には、遺伝子の N 末端を欠失させた遺伝子を用いることが必須である。実際、精製した粒子の構成蛋白を分離し、N 末端のアミノ酸配列を解析してみると、112 番目のアミノ酸である。ところが、興味深いことに、C 末端のアミノ酸配列は均一ではなく、いずれも約 60 アミノ酸欠損していた。手持ちのクリオ電顕とアミノ酸配列のデータから、粒子形成に必要なアミノ酸配列を特定することはできていないが、進行中の X 線結晶解析で明らかにしていきたい。また、欠損した両末端への外来性遺伝子の導入も検討していきたい。rHEV VLP は内部が中空であることが明らかになったので、ベクターとして外来性遺伝子を挿入できる部位は、遺伝子の両末端と、粒子の中空内部の 3 箇

所である。

rHEV VLPは、経口投与と腹腔内注射の結果、投与ルートに関わらず特異的にマウスの免疫反応を誘導する。特筆すべきは、これらの抗体の誘導にはアジュバントが全く必要なかったこと、さらに経口投与において腹腔投与では認められなかった腸管IgAの産生が誘導できたことである。腸管IgA抗体がHEV感染に対していかなる免疫防御の役割を担当するかはまだはっきり分かっていない。しかしながら、E型肝炎ウイルスの第一義の感染部位が腸管上皮であることを考えると、ワクチンの有効性を評価する上では大きな利点である。粒子内部に取り込まれた外来遺伝子が、経口投与によって腸管上皮で発現するか否か、興味のあるところである。

本研究が対象としE型肝炎ウイルスの中空粒子は、ウイルス遺伝子を有しない、ウイルス様粒子として産生される。したがって、通常の経口ワクチンと異なり、投与されたウイルスが増殖することは全くない。よって、AIDS患者のように免疫不全であったり、免疫欠損の個体にも投与することが可能である。利点のひとつである。

E. 結論

組換えバキュロウイルスで産生したE型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子は、クリオ電顕による三次構造解析から、内部が完全な中空であることが確認された。中空粒子は経口投与によって血中抗体と腸管分泌抗体の両者を誘導できた。中空粒子の内部に目的遺伝子を格納することによって、腸管上皮細胞に遺伝子を導入するベクターとして使える可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

これまでE型肝炎は輸入感染症と考えられてきたが、わが国にも少なからず存在することが明らかになってきている。海外渡航歴の全くない人がE型肝炎と診断される例がわが国でも確認されるようになってきた。非A非B非C型急性肝炎と診断された場合、原因のひとつとしてE型肝炎を疑うべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T: Application of an automated specimen search system installed in a

transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J. Virol. Methods* 2002;100: 49-56.

2. Someya Y, Takeda N, Miyamura T: Identification of Active-Site Amino Acid Residues in the Chiba Virus 3C-Like Protease. *J. Virol.* 2002;76: 5949-5958.
3. Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66: 721-724.
4. Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, Takeda N, Yasutomi Y: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002;293: 273-280.
5. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinihara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100: 107-114.
6. Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK: Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40: 2459-2465.
7. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N: Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* 2002;299: 225-239.
8. Ishko H, Shimada Y, Yanoha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N: Molecular diagnosis of

human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002;185: 744-754.

9. Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Yamazaki S, Takeda N: Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirolgy* 2002;45: 136-141.

2. 学会発表

国際学会

1. Yatsushashi H, Yano K, Koga M, Ishibashi H, M. Y, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Kahn M: Hepatitis E in Japan
2. -Incidence and Comparison of HEV Markers between Japan and Bangladesh-. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Meeting 2002, Taipei, Taiwan, 2002 Sept 26-29.
3. Kamata K, Kato D, Sato T, Gondaira F, Takasugi K, Sato S, Natori K, Kitamoto N, Miyamura T, Tanaka T, Takeda N: Development of an ELISA-Based Assay for the Detection and Genogrouping of Norwalk-Like
4. Virus in Stools using Genogroup I and II-Specific Monoclonal Antibodies. ASM 102nd General Meeting, Salt Lake City, 2002 May 20-23.
5. Li T-C, Takeda N, Xing L, Haag L, Nilsson JC, R H., Miyamura T: Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Human Polyomavirus BK Generated by Recombinant Baculoviruses. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.
6. Kobayashi S, Sakae K, Kamata K, Sato T, Natori K, Takeda T: Development of immunomagnetic capture RT-PCR for detection of "Norwalk-like viruses" in foods. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.
7. Katayama K, Horikoshi-Shirato H, Oka T, Natori N, Takeda N, Miyamura T: Genotyping of "Norwalk-like viruses" based on phylogenetic

analyses of 18 full genome sequences. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July 27-Aug 1.

8. Wakuda M, Sasaki J, Urasawa T, Urasawa S, Takeda N, Taniguchi K: Completenucleotide sequence of Otofuke-like virus, a member of Norwalk-like viruses in Caliciviridae, detected in Japan. XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 2002 July-27-Aug 1.

国内学会

1. 松原尚子、片山和彦、白土東子、岡 智一郎、小川智子、武田直和、浜野国勝、福士秀悦、小嶋慈之、影山 努、高井礼子、星野文則、宮村達男 パキキュロウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月 11-14
2. Masaru Tamura, Katsuro Natori, Masahiko Kobayashi, Tatsuo Miyamura, Naokazu Takeda Soluble histone molecules inhibit attachment of Norwalk-like viruses to mammalian cells 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月 11-14
3. 李 天成、武田直和、宮村達男 HEV そのウイルス学 宮川庚子記念研究財団ワークショップ「日本の E 型肝炎」、横浜、2002 年 10 月 26 日
4. 高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏 HIV CTL エピトープ表出 E 型肝炎ウイルス様中空粒子の経口投与による粘膜面におけるエピトープ特異的細胞性免疫の誘導 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日.
5. 石古博昭、三浦里香、島田康司、山崎修道、武田直和 VP4 塩基配列に基づく系統解析によって、ヒトライノウイルス 87 型はヒトエンテロウイルス 68 型に同定された 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日.
6. 内野清子、岩上泰雄、三好龍也、吉田永祥、前田章子、田中智之、鎌田公仁夫、北本憲利、名取克郎、武田直和 NLV 抗原検出 ELISA 法を用いた食中毒事例へ

の対応と評価・問題点 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。

7. 影山 努、小嶋慈之、高井玲子、星野文則、福士秀悦、白土東子、岡 智一郎、片山和彦、武田直和 Norwalk-like viruses を genogroup 特異的に認識するモノクローナル抗体の作製 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
8. 勢戸祥介、入谷展弘、名取克郎、武田直和、久保英幸、綾田 稔、小倉 壽、青木孝祐大阪市内で検出した Alphatron type NV の遺伝子解析および抗原性の解析 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
9. 植木 洋、有田富和、後藤郁男、山木紀彦、佐藤千鶴子、渡邊 節、沖村容子、秋山和夫、山本俊夫、白石廣行、武田直和 感染性胃腸炎患者・河川水・養殖カキから検出した NV の遺伝子解析 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
10. 入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、青木孝祐、名取克郎、武田直和、瀬戸俊之、服部英司、綾田 稔、小倉 壽 乳幼児における Norwalk virus 感染に対する免疫応答 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
11. 白土(堀越)東子、片山和彦、田村 克、名取克郎、岡 智一郎、武田直和、宮村達男 ノーウォーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
12. 片山和彦、白土(堀越)東子、岡 智一郎、小嶋慈之、影山 努、福士秀悦、武田直和 Norwalk-like viruses の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
13. 李 天成、武田直和、宮村達男 BK ウイルス様中空粒子の三次構造の解析及び診断への応用 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。
14. 保富康宏、高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男 E型肝炎ウイルス(HEV)ウイルス様中空粒子(VLP)をベクターとして用いた経口ワクチンの開発 第50

回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002年10月16-18日。

15. 武田直和 Histo-blood group antigens とノーウォークウイルスに対する感受性 14回ウイルス性下痢症研究会、札幌、2002年10月15日
16. 小林慎一、榮 賢司、宮崎 豊、田中智之、名取克郎、武田直和 Immunomagnetic capture RT-PCR 法による食品中のノーウォークウイルスの検出 第23回衛生微生物技術協議会、奈良、2002年7月11-12日。
17. 田中智之、内野清子、岩上泰雄、吉田永祥、鎌田公仁夫、名取克郎、武田直和 NLV 抗原検出 ELISA 法の普及とその意義 第23回衛生微生物技術協議会、奈良、2002年7月11-12日。
18. 岩上泰雄、内野清子、鎌田公仁夫)、北元憲利、阪本瑠子、家永信彦、武田直和、田中智之。小児下痢症の腸管内ウイルス重感染の可能性 第43回日本臨床ウイルス学会、秋田、2002年6月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし