

200500647A

厚生労働科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための基盤的

技術開発の研究(H16－新興－17)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森本 金次郎

平成18(2006)年 3月

## 目次

|   |       |    |
|---|-------|----|
| I. 総括研究報告   | ----- | 1  |
| ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための<br>基盤的技術開発の研究<br>主任研究者： 森本 金次郎   |       |    |
| II. 分担研究報告  | ----- | 17 |
| 1. センダイウイルスベクターの開発および応用に関する研究<br>分担研究者： 加藤 篤  |       |    |
| 2. 麻疹ウイルスベクターの開発および応用に関する研究<br>分担研究者： 加藤 篤  | ----- | 24 |
| 3. 狂犬病ウイルスベクターの改良<br>主任研究者： 森本 金次郎  | ----- | 29 |
| 4. 日本脳炎ウイルス抗原を発現するセンダイウイルス作製のための組<br>換えセンダイウイルスベクターの作製<br>分担研究者： 倉根 一郎  | ----- | 35 |
| 5. デングウイルスワクチン評価のための小動物感染モデルの構築<br>分担研究者： 高崎 智彦   | ----- | 43 |
| 6. サイトメガロウイルスワクチンの評価法の開発に関する研究<br>分担研究者： 井上 直樹  | ----- | 46 |
| 7. 天然痘ワクチン接種および非接種サルにおけるサル痘ウイルス<br>感染時の血中各種サイトカインレベルの Multiplex による解析<br>－新規天然痘ワクチン評価のための基礎的研究－<br>分担研究者： 西條 政幸 | ----- | 54 |
| 8. ウイルス感染において共通の分子パターン(二本鎖 RNA)に対する<br>ミクログリアの活性化機序の解析<br>主任研究者： 森本 金次郎   | ----- | 60 |
| 9. 狂犬病ウイルス粒子に対する樹状細胞の免疫応答<br>分担研究者： 西園 晃  | ----- | 64 |
| 10. RS ウイルスのインターフェロン活性からの回避機構<br>分担研究者： 錫谷 達夫   | ----- | 72 |
| 11. ヒト $\gamma$ 1/ $\kappa$ ライブラリーの構築から中和活性を有するヒト型<br>モノクローナル Fab 抗体の作成と完全型 IgG1 抗体への変換<br>分担研究者： 西園 晃          | ----- | 79 |

## ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための 基盤的技術開発の研究

主任研究者：森本金次郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第三室）

### 要旨

本研究はウイルスベクターを利用することにより、ワクチン開発を迅速化するような基盤的技術開発を行なうものである。単独のウイルス感染では困難なワクチン開発における様々なステップ（検査診断技術、ワクチン評価法、抗体産生、弱毒化等）を、ウイルスベクターを利用する等の新たな技術導入により克服することを目指している。また、個々のウイルスでなされた技術を其処に留まることなく広く応用できる技術として捉えながら研究開発を進めていくことである。

本年度の研究において以下の成果が得られた。1) 狂犬病ウイルスベクターの利便性を高めるため、P 遺伝子欠損狂犬病ウイルス (def-P 株) の産生量向上を目指し、テトラサイクリンオンオフ系による P 蛋白質高発現細胞株を樹立、def-P 株の産生量向上がみられた。また、さらなる外来遺伝子高発現を目指したベクターの改良として、ゲノム上流に位置する N 遺伝子と P 遺伝子の間にクローニングサイトをもつベクターを構築した。2) センダイウイルスの抗インターフェロン機能を担う C 蛋白質の機能を欠失させたセンダイウイルスを作製し、その増殖性を解析し、センダイウイルスをベクターとして用いる際の免疫応答機構を考察した。3) 麻疹ウイルスベクターの改良化としてゲノム分節化技術を開発し、3 分節ゲノムを持つ麻疹ウイルスの作製に成功し、その外来遺伝子搭載能について検討した。4) 外来ウイルス蛋白質発現組換えウイルスとして、日本脳炎ウイルス抗原組換えセンダイウイルスの作製を開始した。5) スナネズミ（特に白色系：Mg-W）がデングウイルス感染の小動物モデルになりうるかを検討した。6) モルモットサイトメガロウイルス (GP-CMV) とモルモットとの感染実験系を評価し、動物実験系としての有用性を検討した。さらに、緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する組換え GP-CMV ウイルスを作製した。7) 痘そうワクチンの評価を行うための動物実験系として、カンクイザルへのサル痘 *Liberia* 株感染実験系を用い、ワクチニア *Lister* 株のワクチン有効性を示す評価法を確立した。血中の各種サイトカインの変動を Multiplex 法を用いて解析した。8) ミクログリア細胞において、ウイルス感染における共通の分子パターンである dsRNA の認識を介して活性化する遺伝子発現およびシグナル伝達経路を特定するとともに、両者の相互関係を明らかにした。9) 狂犬病ウイルス感染に対する樹状細胞の応答を解析した。10) Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) 感染におけるインターフェロン活性からの回避機構を解析した。11) 狂犬病ウイルスに対する中和抗体価を有する Fab フラグメント遺伝子からヒト型 IgG を構築し、その性状を解析した。

分担研究者：

井上 直樹 (国立感染症研究所 ウイルス第一部 第四室 室長)

加藤 篤 (国立感染症研究所 ウイルス第三部 第三室 室長)

倉根 一郎 (国立感染症研究所 ウイルス第一部 部長)

西條 政幸 (国立感染症研究所 ウイルス第一部 第一室 主任研究官)

錫谷 達夫 (福島医科大学 微生物学教室 教授)

高崎 智彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部 第二室 室長)

西園 晃 (大分大学医学部 感染分子病態制御講座 教授)

#### A. 研究目的

①狂犬病ウイルスおよびセンダイウイルスを利用したウイルスベクターの開発改良  
②新たな技術を利用したウイルスの検出検査法およびワクチン評価法の開発  
③ウイルス感染による宿主応答機序の解析より得た知見をもとにしたワクチン開発改良への技術導入  
④コンビナトリアル・ライブラリー法およびファージディスプレイ法を組み合わせることによりウイルス抗体遺伝子のクローニングによる抗体の作製と検査試薬抗体製剤としての利用。以上の4つの主題で研究を行なっている。

ウイルスベクターとして使用可能な狂犬病ウイルス・センダイウイルスを用い、外来ウイルス抗原遺伝子を組込んだ組換えウイルスを作製、有用なワクチンのないウイルスに対する新たなワクチンの開発を目指す。また、ワクチン開発に不可欠な動物実験モデル系の開発、ワクチン評価法、抗体産生等の技術への応用も目指す。ウイルスベクターを利用することにより、有効な免疫原性を得られないワクチンや本来のウイルスワクチンでは困難である問題を克服するための基盤的な技術の開発を目指す。さ

らに、ウイルス感染における免疫応答機構を解析することにより、その結果をフィードバックし、ウイルスベクターの改良、より安全で有効なワクチン開発への技術導入を行なうことを目指している。

ウイルスゲノムを外来遺伝子発現ベクターあるいは組換えワクチンとして使用する場合、その安全性の観点から遺伝子欠損ベクターの利用が有用と考えられている。既に様々な遺伝子欠損ベクターの開発が行われているセンダイウイルスでは、ウイルスの抗インターフェロン能に関与することが知られてきたC蛋白質機能欠損センダイウイルスの作製を行ない、ベクターとしての有用性を検討した。一般に遺伝子欠損ウイルスの産生量は著しく減少する。遺伝子欠損ウイルス作製にはその欠損を補う遺伝子を供給する発現細胞の調整は重要な問題である。狂犬病ウイルス遺伝子欠損ベクターにおいては、その利便性を増すための産生量の向上を検討した。さらに、麻疹ウイルスベクターの改良に関する研究も行なった。

ウイルスベクターを用いた組換えワクチン開発のモデルとして、すでにワクチンの評価法が確立している日本脳炎ウイルスを抗原として選択し、従来の日本脳炎ワクチンと比較し、長所短所を検討することを目指している。デングウイルスやサイトメガロウイルス(CMV)においては有効な感染動物モデル系が存在せず、ワクチンも開発されていないことから、まずは小動物実験モデル系の開発が急がれる。デングウイルスに対してはスナネズミの利用を検討した。CMVは宿主特異性が高くヒトCMVは小動物に感染しないこと、胎盤の構造の違いからマウス・ラットでは先天性CMV感染が起きないことなどから、モルモットとモルモットCMVの実験系を検討した。さらに、ウイルスの検出に便利な緑色蛍光蛋白質(GFP)組換えモルモットCMVの作製も行なった。これらのウイルスはウイルスベクターを用

いた組換えウイルスによるワクチン作製が有効な戦略となる可能性もあり、組換えワクチンを作製し、マウス感染実験による評価の確立も考えている。

生物兵器として天然痘ウイルスが用いられる危険性が指摘され、我が国でも痘そうワクチンの再生産・備蓄が開始されている。我が国で備蓄されている痘そうワクチンはLC16m8株であり、比較的副作用の低いワクチンである。しかし、一般的に痘そうワクチンは脳炎や全身感染症などの副作用を一定の割合で引き起こす。そのため、副作用のない新規痘そうワクチンの開発が急務である。しかしながら、我が国では天然痘に対する新規ワクチンの評価は不可能である。昨年度においてサル痘ウイルスをサルに感染させたモデル系を確立した。今年度はこの系における各種サイトカインの変動を Multiplex 法を用いて解析し、評価法としての有用を検討した。

有効なワクチンの開発にはウイルス感染における宿主免疫応答のより明確な理解が必要不可欠である。ウイルス感染における初期免疫応答の解析も行なっている。末梢部位に接種されたウイルス粒子の多くはマクロファージ等の食食系の細胞によって取り込まれ処理される、昨年度はマクロファージへの感染及び増殖様式、並びに細胞内シグナル分子の活性化と免疫関連遺伝子の発現誘導を体系的に解析した。今年度は樹状細胞における反応性の検討を行なった。また、ウイルス感染時における共通の認識分子として生産される二本鎖 RNA に対する細胞応答機構の解析を行なった。

狂犬病ウイルスの曝露後ワクチン接種はその咬傷の程度に応じて能動免疫（ワクチン）の投与と、より重篤な曝露の際には受動免疫（グロブリン）の同時投与が推奨されている。しかしながら、抗狂犬病グロブリン製剤は全世界的にも全く品薄で、その供給には以前より限界が指摘されている。コンビナトリアル・ライブラリー法および

ファージディスプレイ法を組合せることにより、狂犬病ワクチン接種後のヒトボランティア末梢血リンパ球から、ヒト抗体 Fab ライブラリーを構築し、狂犬病ウイルスを特異的に中和する能力のある Fab クローンを選択した。それを完全型 IgG に構築し、グロブリン製剤としての利用を目指している。

## B. 研究方法

### 組換えウイルスの作製：

センダイウイルスベクターの P 遺伝子領域に存在する C 遺伝子の機能を欠失させた組換えセンダイウイルスを作製した。

P 蛋白質誘導発現細胞を用いて、P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作製した。新たなクロニングサイトをもつ高発現狂犬病ウイルスベクターを構築した。

CHO 細胞を用いた麻疹ウイルス発現系の開発を行ない、3 分節ゲノムをもつ麻疹ウイルスを作製した。

日本脳炎ウイルス感染細胞からの RT-PCR により、C 蛋白質（380bp）、C 蛋白質から E 蛋白質（2381bp）、prM 蛋白質から E 蛋白質（2000bp）、prM 蛋白質から NS1 蛋白質（3236bp）、NS1 蛋白質（1235bp）、NS3 蛋白質（1856bp）の各目的遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子を狂犬病ウイルスあるいはセンダイウイルスベクターに導入した。

GPCMV の GP35 と GP37 遺伝子間に SV40 プロモーターと GFP を挿入したトランスファープラスミドより相同組換えを利用して、GFP を発現する組換え GPCMV を作製した。

### 実験動物モデル系：

デングウイルス感染実験：スナネズミの白色系（Mg-W）・黒色系（Mg-B）・褐色系（Mg-BW）3 系統に、デングウイルス 1 型  $10^7$  pfu/mL を腹腔接種した。経時的に採血し、TaqMan-PCR および IgG ELISA を実施した。

モルモットサイトメガロウイルス感染実

験：4～5 週齢のモルモットの腹腔中に  $1 \times 10^6$  PFU の GP-CMV を接種し、各臓器におけるウイルス量をリアルタイム PCR 法により測定した。

サル痘感染実験：カニクイザル用い、ワクチニア Lister 株をワクチンとして、サル痘 Liberia 株をチャレンジ感染させ、その病態を観察した。血中の各種サイトカインの測定は蛍光マイクロビーズアレイシステム Luminex™ (HitachiSoft) を用いて、25 種類のサイトカイン (IL-1 beta, IL-1R alpha, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40/p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-alpha, IFN-alpha, IFN-gamma, GM-CSF, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, IP-10, MIG, Eotaxin, RANTES, MCP-1) を同時に測定するための Human Twenty-Five-Antibody Bead Kit (BioSource 社) による免疫アッセイで測定した。

免疫応答メカニズムの解析：

マウス樹状細胞系株 JAWSII、およびマウス神経芽細胞腫由来細胞株 NA に、狂犬病ウイルス固定毒株 Challenge Virus Standard (CVS) および弱毒株 Evelyn Rokitniki Abelsrth strain (ERA) を接種し、培養上清中の IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  を ELISA 法にて解析した。

マウス正常脳に由来するミクログリア細胞株 Ra2 を合成 dsRNA である poly (I:C) の存在下で培養した。経時的に細胞を回収、全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行ない。各種サイトカイン・ケモカイン・接着分子等の遺伝子発現パターンを解析した。また、細胞より得られた蛋白質をリン酸化・非リン酸化状態のシグナル伝達分子 (I $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B p65、MKK1/2、MKK3/6、MKK4、ERK1/2、JNK1/2、p38、C/EBP $\beta$ 、STAT-1、STAT-3、STAT-5、STAT-6、ATF-2、c-Jun 等) に対する抗体によるウェスタンブロット解析に供した。

ヒト咽頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞とウイルスは RSV-A2 株を用い、感染細胞における

SOCS1-7 と CIS の 8 種の遺伝子発現の定量については TaqMan 法を用いてリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。

Fab 抗体の完全 IgG 化と精製：

完全型の IgG を得る目的で、Fab TC3G7 と TC1A10 の V $\kappa$  と C $\kappa$ 、および V $\mu$  と C $\mu$ 1 の DNA 断片を改めて別個にベクター-pFabCMV に挿入し、G418 存在下で約 21 日間培養し、生存してきた細胞を選別した。培養上清中に得られた IgG を Protein G あるいは Protein A カラムで精製した。

(倫理面への配慮)

動物実験は各研究施設の動物実験委員会による審査を受け承認を得た後行なわれた。ヒト検体を用いる研究は各研究機関の審査を受け倫理委員会の承認を得た後行なわれた。

## C. 研究結果

ウイルスベクターの開発改良に関して

1) 狂犬病ウイルスベクターの利便性を高めるため、昨年度は P 遺伝子欠損狂犬病ウイルス (def-P 株) を作製し、その増殖速度、転写産物の解析、ウイルス蛋白質の産生等を調べた。そのウイルスの増殖、ウイルスタンパクの産生量は P 蛋白質を供給するための P 蛋白質発現細胞中で発現している P 蛋白質の量に依存していることが分かった。そこで、今年度はテトラサイクリンオンオフ系による P 蛋白質高発現細胞株を樹立し、def-P 株の産生量の向上を目指した。これまで def-P 株の産生に使用していた P 蛋白質発現細胞 (BHK-P #12 および BHK-P #15) と今回樹立した BHK-Ptet #1 における def-P 株の増殖を比較した。初期の増殖は BHK-P #15 が最も良かったが、6 日目のウイルス力価は今回樹立した BHK-Ptet #1 で最も高いことが確認された。また、外来遺伝子高発現を目指したベクターの開発として、ゲノム上流に位置する N 遺伝子と P 遺伝子

の間にクローニングサイトを持つプラスミド pHEP-5.1 を構築した。

2) センダイウイルスベクターの安全性を向上するため、C 蛋白質の抗インターフェロン活性を解析するとともに、C 蛋白質に変異を導入した抗 IFN 能のないウイルスを作製、その性状を解析した。その結果、C 蛋白質は必須ではないが、高い遺伝子発現を持続させるためには、C 蛋白質のもつ抗 IFN 能が必要であることを明らかにした。

3) 今年度は麻疹ウイルスベクターの開発に関する研究も行い、CHO 細胞内でワクチニアウイルスが後期遺伝子群を発現せず増殖できないことに着目して、CHO 細胞を用いた系の開発を行った。さらに、麻疹ウイルスゲノムの 3 本への分節化を試み、3 分節ゲノムを持つ麻疹ウイルスの作製に成功した。

4) 組換えウイルスの発現抗原として、日本脳炎ウイルス及びデングウイルスの遺伝子を検討している。今年度は日本脳炎ウイルス感染細胞からの RT-PCR により、C 蛋白質 (380bp)、C 蛋白質から E 蛋白質 (2381bp)、prM 蛋白質から E 蛋白質 (2000bp)、prM 蛋白質から NS1 蛋白質 (3236bp)、NS1 蛋白質 (1235bp)、NS3 蛋白質 (1856bp) の各目的遺伝子をセンダイウイルスベクターに導入し、組換えセンダイウイルスプラスドを作製した。続いて、日本脳炎ウイルス抗原組換えセンダイウイルスを作製する。

5) 昨年度は狂犬病ウイルスに GFP 遺伝子を組み込んだウイルスを作製し、新たな中和抗体測定法の開発を報告した。今年度は GFP を発現する組換え GPCMV を作製した。その培養細胞における増殖性について検討し、培養細胞での増殖性は野生型ウイルスと変わらないことを示した。今後モルモット個体での増殖性を検討していく予定である。

実験動物モデル系の開発に関して

6) スナネズミを用いたデングウイルス感

染実験において、初感染ではウイルス血症を起こすことはなかったが、異なる血清型のデングウイルスを 3-4 ヶ月後に接種することでウイルス血症を引き起こすことが確認された。TaqMan PCR 実験の結果から、血清中にウイルス RNA が検出された。IgG ELISA の結果から、ウイルスの感染後に有意にデングウイルスに対する抗体価が上昇していることが分かった。

7) ヒト CMV 経胎盤感染の感染動物実験モデルとして、モルモットとモルモット CMV (GPCMV) 感染実験を行ない、その評価のための基礎実験を開始した。近交系モルモット株による GPCMV 感受性の比較、感染後のウイルス臓器分布をリアルタイム PCR で測定した。その結果、1 週では各臓器で感染が認められるが、3 週ではコピー数が約 100 分の 1 程度にまで低下する一方、唾液腺に大量のウイルスが分布することが示された。

8) 昨年度はカニクイザルとサル痘 Liberia 株感染系に、ワクチンとしてワクチニア Lister 株を用いた動物実験系を用いて、痘瘡ワクチンの動物実験モデルを確立した。今年度はさらに血中各種サイトカインレベルの推移を、Multiplex 法を用いて解析した。その結果、非免疫サル群・免疫サル群でともに上昇する (非免疫サル群での上昇の程度はより高く、免疫サル群では上昇の程度が低いものの反応の出現が早い) サイトカイン (IL-6, Eotaxin, IL-15, MCP-1, IL-5, TNF-alpha, IL-1R alpha, IL-7, MIG, IL-4 など)。非免疫サル群では上昇し、免疫サル群では変化のないサイトカイン (IL-1 beta, IL-10, IFN-alpha, IL-12, IL-13, IL-17, MIP-1 alpha, GM-CSF, MIP-1 beta, IL-2, IL-2R など)。非免疫サル群で低下し、免疫サル群で変化のないサイトカイン (RANTES)。非免疫サル群では変化がなく、免疫サル群で高くなるサイトカイン (IFN-gamma, IL-8 など) が確認された。

ウイルス感染とその免疫応答に関する研究として

9) 樹状細胞を用いて、狂犬病ウイルスに対する免疫応答を解析した。CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞では、ウイルス N 蛋白質を発現した細胞はほとんど認められなかった。この結果から、JAWSII 細胞は RV 感染に対して非感受性を示すことが分かった。CVS を接種した JAWSII 細胞の培養上清中と、ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中を比較した場合、ERA を接種した時の方が TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  において、高濃度の値を示した。細胞内における CVS と ERA の反応性は異なっている事が推測された。

10) ミクログリア細胞株を用いて、二本鎖 RNA に対する初期応答をサイトカインおよびケモカイン、接着分子、細胞傷害因子等の遺伝子群を標的とした定量 PCR を行い、ミクログリアにおける遺伝子発現の時間的、量的な変動パターンを調べた。接着分子やケモカイン受容体、細胞障害因子等の遺伝子発現量においては軽微な変化しか認められなかったが、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6) およびケモカイン (CXCL2、CXCL10、CCL2、CCL5) の遺伝子発現が有意に増加した。とりわけ CXCL10 遺伝子の発現は二本鎖 RNA 刺激の最初期から増大し、長時間培養後も mRNA 量が安定して維持されることが分かった。二本鎖 RNA 処理したミクログリアでは STAT 経路等の活性化は軽微であった。これに対して、NF- $\kappa$ B および JNK、p38 を介したシグナル経路は迅速に応答することが分かった。

11) RSV 感染における IFN からの回避機構において、ウイルスの SOCS 遺伝子発現誘導に着目し検討した。HEp-2 細胞に RSV を感染させ、感染 24 時間後までの感染細胞における、SOCS1-7、CIS の計 8 種の遺伝子についてリアルタイム PCR で検討した。SOCS1、SOCS3、CIS 遺伝子は感染数時間以内にピークを伴って誘導され、ピーク時の発現は感

染前に比べそれぞれ、9.6 倍、13.8 倍、7.3 倍増加した。

12) 昨年度よりコンビナトリアル・ライブラリー法およびファージディスプレイ法を組み合わせることにより、狂犬病ワクチン接種後のヒトボランティア末梢血リンパ球から構築したヒト抗体 Fab ライブラリーから、狂犬病ウイルスを特異的に中和する能力のある Fab クローンを選択した。今年度はこのうち有望な 2 つの Fab クローン (1A10 と 3G7) を完全型 IgG1 に変換し、そのウイルス中和活性を検討した。

#### D. 考察

RNA ウイルスベクターは高増殖の細胞質内ウイルスベクターとしてその有用性が期待されている。遺伝子発現ベクターあるいは組換えワクチンとして利用するうえでの利点としては①ゲノム構造が単純で遺伝子操作が容易である、②細胞質で増殖し、宿主染色体との組換え組込みがない、③広い宿主細胞に感染可能である等が挙げられる。しかしながら、ウイルスベクターを外来抗原発現ベクターとして応用する際には、その効果および安全性の面での更なる改良が望まれる。もう一つの特徴として、ウイルスゲノムに突然変異や遺伝子欠損を導入することで、容易に伝播性・病原性の欠失が可能であることが挙げられる。

ウイルスベクターは当初ウイルスのゲノムをすべて残したままで、外來遺伝子を付加的に挿入する自立増殖型としてスタートした。しかし、単純にベクターによる物質生産を目指すのであれば、増えたウイルスが他に広がりえるという性質は問題ではないが、安全性の面から考えると、必ずしも自立増殖型がいいとは限らない。そこで、ウイルスゲノムの転写複製に関係しない遺伝子を除き、それらをヘルパー細胞株から供給するという欠損型ベクターの開発へと進展してきた。センダイウイルスの場合、P



遺伝子からはP蛋白質に加え、VとC蛋白質が発現される。近年、C蛋白質による抗IFN作用が明らかになってきた。本研究において、抗IFN能を失ったC蛋白質に改変したウイルスを作製し、その性状を解析した。その結果、C蛋白質は必須ではないが、高い遺伝子発現を持続させるためには、抗IFN能は必要であることが示された。このことは、一方でウイルスベクターを持続的に発現させるためには、細胞のIFN系を止めておかねばならないことを示している。培養細胞レベルの使用に関しては、問題は生じないが、個体を対象にした使用の場合には、IFN系を止めてしまうことの是非について、十分に考慮する必要がある。狂犬病ウイルスベクターにおいては、遺伝子欠損ベクターの利用に関する研究はまだ十分でないが、本研究においてP遺伝子欠損ウイルスのワクチン開発を行ってきた。ウイルスは、様々な様式でIFNに対抗する能力を獲得している。狂犬病ウイルスにおいてもインターフェロン誘導阻止がP遺伝子により制御されていることが明らかになってきている。インターフェロンの発現制御機構がウイルスベクターの遺伝子発現あるいはワクチンとしてのウイルス抗原の発現とその免疫応答にどのような影響を与えるかを解析し、どのように利用すればよいかを検討する必要がある。組換えウイルスとしての使用か遺伝子発現ベクターとしての使用かによりベクターの選択が必要となる。使用目的に応じたベクターの改良も考慮に入れなければならない。

ウイルスベクターを用いたワクチン開発のモデルとして、すでにワクチンの評価法が確立している日本脳炎ウイルス遺伝子をもつ組換え狂犬病ウイルスとセンダイウイルスの作製を開始している。従来の日本脳炎ワクチンと比較して、長所短所を検討する予定である。デングウイルスやヒトサイトメガロウイルス(CMV)に対しては有効な動物実験モデル系が存在しないことから、

ワクチンの開発が遅れている。まずは本研究において検討したような小動物実験モデル系の開発が急がれる。新たな手法として、組換えウイルスを利用したワクチン作製も有効な戦略と考える。作製したデングウイルス抗原あるいはCMV抗原組換えウイルスをマウスを用いて抗原性及び安全性を明らかにしていくことにより、組換えウイルスベクターを用いたワクチンの有用性が期待できる。また、痘そうワクチン開発のために欠かせない霊長類を用いた感染動物モデルを確立したが、小動物を用いた痘そうワクチン評価システムの開発も欠かせない。小動物としてマウスを用いたワクチン評価系には組換えウイルスの利用も選択の一つである。

ワクチン開発におけるウイルスベクターを用いる利点の一つとして、免疫応答を解析した様々な基礎的実験より得られた知見を取り入れ、優れた免疫増強効果が挙げられるようなベクターの構築を容易に可能にすることである。ウイルスあるいは二本鎖RNAによるマクロファージや樹状細胞の活性化を解析し、あるいはウイルス感染によるインターフェロン発現阻止機構を解析することにより、より有効なワクチンの改良への新たな道筋を開くことになると思う。

狂犬病ウイルスの病原性の異なるERA株とCVS株において樹状細胞に対する反応性が大きく異なる事が判明した。樹状細胞はウイルスの末梢感染において重要な役割を持っている事が推測される、この反応性の違いは、致死的病態を誘導する強毒株と、致死的病原性の減衰した弱毒株の病態形成機序を解明するヒントに成り得る。

抗狂犬病ウイルス中和抗体遺伝子構築の研究では、今後さらに中和活性が高いクローンを選別し、Fc部分を有する完全型のIgG分子に変換し、補体活性化能やオプソニン活性化能を高めた分子を作製し、さらなる評価を行う予定である。この様なコンビナトリアル・ライブラリー法およびファ

ージディスプレイ法を組合せることによる抗体作製は他のウイルスにおいても適用でき、ワクチンのない疾患においてもその回復患者からの末梢血リンパ球から作製可能である。

#### E. 結論

本年度の研究において以下の点が明らかとなった。

1) センダイウイルスのC蛋白質はその増殖には必須ではないが、高い遺伝子発現を持続させるためにはC蛋白質のもつ抗IFN能が必要であることが示された。2) 麻疹ウイルスゲノムの3本への分節化技術を開発し、3分節ゲノムを持つ麻疹ウイルスを作製、その外来遺伝子搭載能について検討した。3) 狂犬病ウイルスベクターにおいて、今年度新たに樹立したP蛋白質発現細胞はこれまで使用していた発現細胞と比較して、P遺伝子欠損株の産生が向上したことが示された。4) 日本脳炎ウイルスのC蛋白質、C蛋白質からE蛋白質、prM蛋白質からE蛋白質、NS1蛋白質、NS3蛋白質の各領域を増幅し、各目的遺伝子をそれぞれセンダイウイルスベクターに導入し、日本脳炎ウイルス抗原組換えセンダイウイルスの作製を開始した。5) スナネズミ（特に白色系：Mg-W）がデングウイルス感染の小動物モデルになりうることが示された。6) モルモットサイトメガロウイルス(GP-CMV)とモルモットとの感染動物実験系を評価した。さらに、緑色蛍光蛋白質(GFP)を発現する組換え体GP-CMVを作製した。7) サル痘ウイルス感染時の各種血中サイトカインレベルの変動パターンを解析し、ワクチン評価の指標を明らかにした。8) ミクログリア細胞において、ウイルス感染におけるdsRNAの認識を介して活性化する遺伝子発現およびシグナル伝達経路を特定するとともに、両者の相互関係を明らかにした。9) 狂犬病ウイルスの病原性の異なるERA株と

CVS株において樹状細胞に対する反応性が大きく異なる事が判明した。10) RSVのインターフェロン活性からの回避機構について解析し、RSV感染細胞におけるインターフェロン抑制機構であるSOCS1、SOCS3、CIS遺伝子の発現誘導が示された。11) フェージディスプレイ法を用いて狂犬病ウイルスに対して中和活性をもつヒト型Fab抗体を作製し、完全型のIgGに転換することに成功した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ito-Takayama, M., Inoue, K., Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I., Morimoto, K. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res.* in press (2006)

Khawplod, P., Shoji, Y., Ubol, S., Wilde, H., Mitmoonpitak, C., Nishizono, A., Kurane, I., Morimoto, K. Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infection, Genetics and Evolution*, in press (2006)

Nakamichi, K., Saiki M, Sawada M, Yamamuro Y, Morimoto, K., Kurane, I. Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways *J. Neurochemistry* 95, 273-283 (2005)

Nakamichi, K., Saiki M, Sawada M, Takayama-Ito, M., Yamamuro Y, Morimoto, K., Kurane, I. Rabies virus-induced activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways regulates expression of CXC and CC chemokine ligands in microglia. *J Virol.* 79,11801-11812 (2005)

Morimoto, K., Shoji, Y., Inoue, S.

- Characterization of P gene-deficient rabies virus. The propagation, pathogenicity and immunogenicity. *Virus Research*, 111, 61-67 (2005)
- Motoi Y., Inoue S., Hatta H., Sato K., Morimoto K., Yamada A. Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58, 115-118 (2005)
- Motoi, Y., Sato, K., Hatta, H., Morimoto, K., Inoue, S., Yamada, A. Production of rabies neutralization antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine*, 23, 3026-3032 (2005)
- Goto, T., M. Morishita, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Kato, J. Ehara, and K. Takayama. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes *Pharmaceutical Research* in press
- Nishiyama, K., K. Takaji, K. Kataoka, Y. Kurihara, M. Yoshimura, A. Kato, H. Ogawa, and H. Kurihara. Id1 gene transfer confers angiogenic property on fully differentiated endothelial cells and contributes to therapeutic angiogenesis. *Circulation* 112:2840-2850 (2005)
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y-M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunol.* 175(5):2851-2858 (2005)
- Sakaguchi, T, A. Kato, F. Sugahara, Y. Shimazu Y, M. Inoue, K. Kiyotani, Y. Nagai, and T. Yoshida. AIP1/Alix is a binding partner of Sendai virus C protein and facilitates virus budding. *J. Virol.* 79:8933-8941 (2005)
- Kubota, T., N. Yokosawa, S. Yokota, N. Fujii, M. Tashiro, and A. Kato. Mumps virus V protein antagonizes interferon without the complete degradation of STAT1. *J. Virol.* 79:4451-4459 (2005)
- Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Hashimoto, K., Miyajima, N., Takeuchi, K., and Yanagi, Y. (2005) Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res.* 108. 161-165.
- Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Jamila, S., Kadota, S., and Nagata, K. (2005) Stringent requirement of the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaque. *J Virol.* 79. 7838-7844.
- Chen, B., Takeda, M., and Lamb, R. A. (2005) Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. *J Virol.* 79. 13673-13684.
- Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Nakatsu, Y., Tahara, M., and Yanagi, Y. (2005) Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol.* 79. 14346-14354.
- Tahara, M., Takeda, M., and Yanagi, Y. (2005) Contribution of matrix and large protein genes of the measles virus Edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol.* 79. 15218-15225.
- Seki, F. Takeda, M., Minagawa, H., and Yanagi, Y. The recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its hemagglutinin cannot use a receptor CD46 as efficiently as that having the hemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. *J Gen Virol.* (in press)
- Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T., and Yanagi, Y. Generation of measles virus having segmented RNA genome. *J Virol* (in press)
- Yanagi, Y. Takeda, M., Ohno, S., and Seki, F. Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis*, (in press)
- Ando T., Yamashiro T, Sonoda YT, Mannen K, Nishizono A. (2005) Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus neutralizing ability. *Microbiology and Immunology* 49:311-322
- Pakamatz K, Inoue K, Shoji Y, Wilde H, Ubol S, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. (2005) A novel rapid fluorescent focus

- inhibition test (RFFIT) for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods* 125: 35-40.
- Krug LT, Teo CG, Tanaka-Taya K, Inoue N. Newly identified human herpesviruses. In: (Eds) IW Fong, K Alibek *Emerging Infectious Diseases of the 21st Century*. Springer, NY. in press
- Wang G, Xu H, Wang Y, Gao X, Zhao Y, He C, Inoue N, Chen HD. (2005) Higher prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52:46-467.
- Kaneko H, Iida T, Aoki K, Ohno S, Suzutani T. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 43:3290-6, 2005
- Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Fujii N. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 confers efficient viral replication. *Virology.* 338:173-81, 2005
- Saijo M, Suzutani T, Morikawa S, Kurane I. Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet-resistant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) derived from a foscarnet-sensitive HSV-1 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 606-11, 2005
- Peebles, R. S. Jr, Hashimoto K, James R, Sheller JR, Moore ML, Morrow JD, Ji S, Elias JA, Goleniewska K, O'Neal J, Mitchell DB, Graham BS, Zhou W. Allergen-induced airway hyperresponsiveness mediated by cyclooxygenase inhibition is not dependent on 5-lipoxygenase or IL-5, but is IL-13 dependent. *J. Immunol.* 175: 8253-8259, 2005
- Hashimoto K, Durbin JE, Zhou W, Collins RD, Ho SB, Kolls JK, Dubin PJ, Sheller JR, Goleniewska K, O'Neal JF, Olson SJ, Mitchell D, Graham BS, Peebles RS Jr. Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT 1 results in airway dysfunction, airway mucus, and augmented IL-17 levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:550-557, 2005
- Hashimoto K, Sheller JR, Morrow JD, Collins RD, Goleniewska K, O'Neal J, Zhou W, Ji S, Mitchell DB, Graham BS, Peebles RS Jr. Cyclooxygenase inhibition augments allergic inflammation through CD4-dependent, STAT6-independent mechanisms. *J. Immunol.* 174:525-32, 2005
- Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Research* 66:159-63, 2005
- Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Medical Virology* 76:111-118, 2005
- Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *Journal of Virological Methods* 125:181-186, 2005
- Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral anti-smallpox immunity among the current Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:520-524, 2005
- Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of General Virology* 86:2269-2274, 2005
- Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3K/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV-infection in Vero E6 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*

- (BBA)-Molecular Basis of Disease 1741:4-10, 2005
- Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *Journal of Medical Virology* 77:83-88, 2005
- Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *Journal of Virology* 79:11873-11891, 2005
- 森本金次郎、伊藤（高山）睦代：狂犬病ワクチン 日本臨床 増刊 臨床免疫（下）—基礎研究の進歩と最新の臨床— 63巻増刊号5 654-658 日本臨床社（2005）
- 永井美之、加藤篤、井上誠 センダイウイルス工学の展開 蛋白質核酸酵素 51:27-37（2006）
- 竹田誠、柳雄介（2005）、麻疹ウイルス、微生物感染学—新しい感染の科学—、202-207
- 竹田誠、柳雄介（2005）、リバーシジェネティクスを用いたパラミクソウイルス感染の解析、実験医学、23、2587-2594
- 井上直樹、野澤直樹（2006）HCMVのゲノム構造と遺伝子機 日本臨床 64巻増刊号3:377-385.
- 野澤直樹、井上直樹（2006）CMVの先天性感染機構 日本臨床 64巻増刊号3:446-450.
- 小泉加奈子、中島由紀子、松崎真和、小井戸則彦、大曾根康夫、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎、秋月哲史. 本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例. *感染症学雑誌* 80(1):56-57（2006）
- 林 昌宏、倉根一郎：ウエストナイルウイルス. *日本臨床*, 63 増刊号7:321-323（2005）
- 林 昌宏、高崎智彦：フラビウイルス脳炎—ウエストナイルウイルスを中心に—. *臨床病理*, 53(8):721-727（2005）
- 林 昌宏、高崎智彦：ウエストナイル熱/脳炎. *遺伝*, 59(5):37-42（2005）
- 林 昌宏、倉根一郎：ウエストナイルウイルスに関する最新の知見と対策. *山口獣医学雑誌*, 32:1-12（2005）
- 錫谷達夫、石岡賢. HSVの遺伝子とその産物. *日本臨床* 64巻 増刊号3:127-132, 2006
2. 学会発表
- K. Morimoto, P. Khawplod, H. Wilde, A. Nishizono, I. Kurane. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) using a recombinant rabies virus expressing GFP. 39th US-Japan Joint Working Conference on Viral Diseases, Palo Alto, California, July 29-30, 2005
- Kato, A., K. Kiyotani, M. Tashiro and Y. Nagai Sendai virus strategy to circumvent the self-limiting growth due to autocrine and paracrine interferons. IUMS, ICV, San Francisco, July 23-28, 2005
- Chen, B., Takeda, M., and Lamb, R. A. (2005 June. University Park, Pennsylvania) Conserved, palmitoylated cysteine residues in the influenza A virus hemagglutinin (H3) play a role in virus assembly. 24th Annual Meeting of American Society for Virology.
- Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Nakatsu, Y., Tahara, M., and Yanagi, Y. (2005. July. San Francisco) Regulation of gene expression and virus propagation by measles virus long untranslated regions. 13th IUMS International Congress of Virology.
- Seki, F., Takeda, M., Minagawa, H., and Yanagi, Y. (2005 September. Awaji Island, Hyogo, Japan) Characterization of the CD46 usage by the recombinant measles virus with a tyrosine substitution at position 481 of the H protein. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity.
- Chen, B., Takeda, M., and Lamb, R. A. (2006 Feb. Santa Fe, New Mexico) Influenza Virus

- Hemagglutinin (H3) Requires Palmitoylation of its Cytoplasmic Tail for Assembly: M1 Proteins of Two Subtypes Differ in their Ability to Support Assembly. Keystone Symposia.
- Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T., and Yanagi, Y. (2006 Feb. Santa Fe, New Mexico) Mononegavirus-derived vectors having genetically engineered three RNA genome segments. Keystone Symposia.
- Takeda, M. (2006 Feb. Atlanta, Georgia) Molecular bases for measles virus replication and virulence analyzed by reverse genetics. Seminar at Centers for Disease Control and Prevention.
- Yamashiro T, Ando T, Nishizono A. Construction of human Fab libraries and isolation of a panel of monoclonal antibodies with rabies virus neutralizing ability. XIII International Congress of Virology. 2005 July San Francisco
- Nishizono A. Yamashiro T. Isolation and synthesis of a panel of human monoclonal Fab antibodies with rabies virus neutralizing ability from human combinatorial Fab libraries. XXXIX United State-Japan Cooperative Medical Science Program. July 2005, Palo Alto, CA
- Y Fukui, Y Yamamoto, M Yanagi, N Nozawa, I Kurane, N Inoue. Establishment of a sensitive reporter cell line for human cytomegalovirus. 30th International Herpesvirus Workshop IHW2005, Finland, Jul 30-Aug 4, 2005
- N Nozawa, H Katano, K Nakamura, Y Fukui, Y Yamamoto, Y Tsutsui, I Kurane, N Inoue. Construction and application of a recombinant guinea pig cytomegalovirus expressing green fluorescent protein for analyses of the mechanisms of congenital cytomegalovirus infection. 30th International Herpesvirus Workshop IHW2005, Finland, Jul 30-Aug 4, 2005
- GQ Wang, Y Yamamoto, Y Fukui, N Nozawa, M Takayama, DS Schmid, I Kurane, N Inoue. Characterization of VZV promoters and development of reporter cell lines for VZV. 12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005
- N Nozawa, T Suzutani, K Omori, S Koyano, Y Fukui, Y Baba, H Ogawa, Y Yamamoto, M Yanagi, H Komura, I Kurane, N Inoue. Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus (HCMV) infection and their applications. 12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005
- N Nozawa, H Katano, K Nakamura, Y Fukui, Y Yamamoto, Y Tsutsui, I Kurane, N Inoue. Molecular and pathological characterization of guinea pig cytomegalovirus infection. 12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005
- C. Lim, T. Takasaki, A. Kotaki, R. Nerome, M. Ito, S. Tajima, K. Morita, T. Ishikawa, I. Kurane. Mouse Antibody Response to Inactivated West Nile and Inactivated Japanese Encephalitis Vaccines for Immunization against West Nile virus and other Flaviviruses. 2006 National Conference on West Nile Virus in the United States (San Francisco) 2006/2/23-24
- Kaneko H, Kawana T, Suzutani T. Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005
- Hashimoto K, Hosoya M, Suzuki H, Peebles R.S.Jr., Suzutani T. Polymorphism of the promoter region of prostacyclin synthase gene in hospitalized children due to RSV Infection. RSV 2005 Symposium, Oxford, UK September 15-18 2005
- Zhao D-C, Suzutani T. Hashimoto K. HSV replication up-regulates SOCS 1 and SOCS 3 expression in the FL cells. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005
- Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Yanagida T, Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T. Superinfection of cytomegalovirus with

different strain from donors is a major cause of acute rejection in renal transplantation. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005

Nozawa N, Suzutani T, Oomori K, Koyano S, Fukui Y, Baba Y, Ogawa H, Yamamoto Y, Yanagi M, Komura H, Kurane I, Inoue N. Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus (HCMV) infection and their applications. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005

Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. June 2005, Colorado Springs, CO, USA

Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. June 2005, Colorado Springs, CO, USA

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. June 2005, Colorado Springs, CO, USA

Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. July 2005, San Francisco, CA, USA

Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8,

that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. July 2005, San Francisco, CA, USA

齊木めぐみ・澤田誠・森本金次郎・山室裕・倉根一郎・中道一生. Induction of chemokine expression in microglia through recognition of TLR3 ligand. 第28回日本神経科学大会. 2005年7月(横浜)

中道一生・齊木めぐみ・澤田誠・森本金次郎・山室裕・倉根一郎. Chemokine response of microglia against neurotropic virus infection via activation of signal-transducing molecules. 第28回日本神経科学大会. 2005年7月(横浜)

加藤 篤、清谷克寛、久保田 耐、田代真人、永井美之 センダイウイルス抗インターフェロン能力の感染に及ぼす意味、第16回日本生体防御学会学術総会、東京、2005年8月

加藤 篤、清谷克寛、久保田 耐、田代真人、永井美之 センダイウイルス抗インターフェロン能力の感染に及ぼす意味、第53回日本ウイルス学会総会、横浜、2005年11月

大谷早苗、綾田稔、勢戸祥介、扇本真治、竹内薫、竹田誠、小倉壽、ヌードマウスにおける麻疹ウイルスの脳内持続感染、第9回 日本神経ウイルス研究会、2005年、浜松

竹田誠、麻疹ウイルス遺伝子操作法の改良と応用、第46回 日本臨床ウイルス学会、2005年6月、福岡

竹田誠、中津祐一郎、大野真治、関文緒、田原舞乃、橋口隆生、柳雄介、分節ゲノム型モノネガウイルスの作製と応用、第53回 日本ウイルス学会、2005年11月、横浜

田原舞乃、竹田誠、柳雄介、培養細胞におけるウイルス増殖への麻疹ウイルス Edmonston ワクチン株各遺伝子の寄与、第

- 53回 日本ウイルス学会、2005年11月、横浜
- 関文緒、竹田誠、皆川洋子、柳雄介、麻疹ウイルスH蛋白481Y変異を導入した組み換えウイルスにおけるレセプターCD46利用の解析、第53回 日本ウイルス学会、2005年11月、横浜
- 竹田誠、中津祐一郎、大野真治、関文緒、田原舞乃、橋口隆生、柳雄介、モノネガウイルス非分節型ゲノムの分節化：その意義と意味すること、第28回 日本分子生物学会、2005年12月、福岡
- 田原舞乃、竹田誠、柳雄介、麻疹ウイルスのマトリックス蛋白質、RNAポリメラーゼの変化は細胞特異性を制御する、第28回 日本分子生物学会、2005年12月、福岡
- 安藤忠助、山城哲、西園晃、コンビナトリアル・ライブラリーを用いた抗狂犬病ウイルス中和ヒトモノクローナルFab抗体の作成およびその評価 第42回日本ウイルス学会九州支部総会 2005年7月 那覇
- 山城哲、安藤忠助、西園晃、抗狂犬病ウイルス中和ヒトモノクローナルFab抗体の作製と完全型IgG1抗体への変換 第53回日本ウイルス学会学術集会 2005年11月 横浜
- 野澤直樹、片野晴隆、中村幸之助、福井良子、山本由美子、小村仁美、筒井祥博、倉根一郎、井上直樹 「モルモットサイトメガロウイルス感染動物モデルを利用するための分子生物学的方法の構築」 第20回ヘルペスウイルス研究会 名古屋市、2005年6月
- 野澤直樹、古谷野伸、片野晴隆、福井良子、山本由美子、中村幸之助、小村広美、筒井祥博、倉根一郎、井上直樹 「先天性サイトメガロウイルス感染による感覚器障害の実態把握及びモルモット感染モデルを用いた障害発生機序解明のための緑色蛍光蛋白を発現する組換え体ウイルスの作製」 第9回日本神経ウイルス研究会 浜松市、2005年6月
- 井上直樹、野澤直樹、倉根一郎 「ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 及び水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の力価の迅速測定用レポーター細胞の樹立」 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005年11月
- 野澤直樹、片野晴隆、筒井祥博、倉根一郎、井上直樹 「モルモットサイトメガロウイルス感染動物モデルを利用するための分子生物学的方法の構築と緑色蛍光蛋白質を発現する組換えウイルスの作製」 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005年11月
- 濱野正敬、田島茂、伊藤美佳子、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎、小動物を用いたデングウイルス実験感染モデルの構築、第53回日本ウイルス学会 (横浜) 2005年11月
- 林 昌宏、高崎智彦、小滝 徹、根路銘令子、伊藤美佳子、田島 茂、森田公一、石川豊数、倉根一郎、ウエストナイル不活化ワクチンの日本脳炎血清型群ウイルスに対する交差反応の検討、第53回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/20-22
- 濱野正敬、林 昌宏、高木弘隆、澤邊京子、桑山 勝、岸 昇、高崎智彦、倉根一郎、広島県内の野生イノシシにおける日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況、第141回日本獣医学会学術集会 (つくば市) 2006/3/18-20
- 橋本浩一、細矢光亮、鈴木仁、RSV感染マウスモデルにおけるPGI2のRSV感染症への影響 第108回日本小児科学会学術集会、東京、2005年4月22-24日
- 橋本浩一、森修一、金子久俊、錫谷達夫、マウスRSV感染モデルを用いたDSCGのRSV感染症への影響の検討、第15回抗ウイルス化学療法研究会、屋久島、2005年5月13、14日
- 橋本浩一、STAT1欠損マウスにおけるRSV感染について 第46回日本臨床ウイルス学会、福岡、2005年6月3、4日



橋本浩一 錫谷達夫. STAT1 欠損マウスを用いた RSV 感染症重症化因子の検討  
第 59 回日本細菌学会東北支部会総会、山形市、2005 年 8 月 25、26 日  
石橋啓、橋本浩一、金子久俊、錫谷達夫.  
サイトメガロウイルス AD169 株の HUVEC への感染とその影響. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月 20-22 日  
橋本浩一、錫谷達夫、石橋啓、金子久俊、細矢光亮. RSV に対する siRNA の in vitro、in vivo における検討. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月 20-22 日  
西條政幸、網康至、永田典代、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、長谷川秀樹、岩田奈織子、佐多徹太郎、倉根一郎、倉田毅、森川茂. LC16m8 痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果 (続報). 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005 年 11 月、横浜  
水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂. SARS コロナウイルス感染細胞における Akt リン酸化の重

要性. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005 年 11 月、横浜  
福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂. VSV シュードタイプを用いた SARS-CoV 感染の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005 年 11 月、横浜  
永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎. マウス、ラットを用いた経代による SARS-CoV の病原性の変化. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005 年 11 月、横浜  
福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、倉根一郎、森川茂. SARS-CoV スパイクタンパク質と ACE2 の相互作用の VSV シュードタイプを用いた解析. 第 28 回日本分子生物学会年会. 2005 年 12 月、博多

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名                           | 巻号  | ページ     | 出版年  |
|---|--|--------------------------------|-----|---------|------|
| Morimoto, K.<br>Shoji, Y.<br>Inoue, S.                              | Characterization of P<br>gene-deficient rabies virus.<br>The propagation,<br>pathogenicity and<br>immunogenicity.      | Virus Research                 | 111 | 61-67   | 2005 |
| Ando T.<br>Yamashiro T.<br>Sonoda Y.T.<br>Mannen K.<br>Nishizono A. | Construction of human Fab<br>library and isolation of<br>monoclonal Fabs with<br>rabies virus neutralizing<br>ability. | Microbiology<br>and Immunology | 49  | 311-322 | 2005 |

## センダイウイルスベクターの開発および応用に関する研究

分担研究者 加藤 篤（国立感染症研究所・ウイルス第三部）

研究要旨：センダイウイルスベクターは、約 10 年前に我が国で開発された新規ウイルスベクターである。センダイウイルスは、ほ乳類細胞や鳥類細胞で旺盛に増殖するため、センダイウイルスをベクターとした場合にも、多くの細胞で大量発現を期待できる。センダイウイルスの特性を生かしたベクターのためには、ウイルス遺伝子の転写に必要な遺伝子以外をウイルスゲノムから無くすことが、安全上、あるいは外来遺伝子挿入上も有利である。残った遺伝子は、N、P、L の 3 遺伝子であり、これら 3 遺伝子の機能解析は、ベクターの特性を知るためにも重要である。特に P 遺伝子からは、RNA ポリメラーゼの小サブユニットとなる P 蛋白質以外に、機能のよくわかっていない V 蛋白質、C 蛋白質が産生される。C 蛋白質には宿主細胞がインターフェロンにより抗ウイルス状態になる事を妨げる機能があるため、その機能の重要性を知る目的で C 蛋白質に変異を加えインターフェロン対抗能力を失ったセンダイウイルスを作製した。組換えウイルスを感染させた細胞では、ウイルスの転写複製は起こるが、そのレベルはずいぶん低いものであった。ウイルス遺伝子をより長期間細胞内で維持、発現させるためには、ウイルスの抗インターフェロン機能が無くてはならないことがわかった。

### A. 研究目的

センダイウイルス(SeV)は、パラミクソウイルス科のレスピロウイルス属に属するウイルスである。マウス等のげっ歯類に感染し、肺炎を起こすことで知られるウイルスである。1996 年に SeV の cDNA からウイルスを生成する技術が確立し、外来遺伝子を発現させることが可能になっている。ウイルスゲノムには、N、P、M、F、HN、L の 6 遺伝子があり、N、P、L 遺伝子が転写複製に関わっており、他

は細胞への接着、侵入、粒子形成に関わる遺伝子である。転写複製に必要な N、P、L 遺伝子以外を削り、細胞内で遺伝子発現とゲノム増殖だけをするレプリコンを作ることができる。レプリコンは、ずっと細胞内に留まって複製と転写を続けるので、レプリコンに挿入した外来遺伝子もまた、細胞内で長期間の発現を期待する事ができる。レプリコンを構成する N、P、L 遺伝子については、未だ不明な点が多くベクターとしての安全性を向上させ

る為には、これら遺伝子の機能を解析する必要がある。特に P 遺伝子からは、P 蛋白質の他に、C 蛋白質、V 蛋白質が産生され、これらの蛋白質の必要性及び役割についての解析が必要になっている。このうち V 蛋白質については、既に欠損しても培養細胞レベルではなんら影響が無い事がわかっている一方、C 蛋白質欠損は、大きくウイルス産生量に影響し、また、近年 C 蛋白質にはインターフェロン(IFN)に対抗する能力があることが判明している。そこで C 蛋白質の抗 IFN 能とウイルスゲノムの細胞内維持に注目して検討を行った。

## B. 研究方法

### (1) 変異 C 蛋白質の抗インターフェロン活性

C 蛋白質に IFN のシグナル伝達を阻止する能力があり、その結果として IFN の抗ウイルス作用発動を抑制する機能がある。今までに C 蛋白質の荷電アミノ酸をアラニンに置換した変異体 Cm5 (K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>A, R<sup>154</sup>A) で消失することを報告してきた(Kato, A. *et al.* J. Virol. 78:7114-7124, 2004)。P 遺伝子からは異なる遺伝子読み枠を使って P、V、C の 3 つの蛋白質が産生される。Cm5 置換は、このままでは P と V 蛋白質のアミノ酸も変化してしまうので、アミノ酸変化を伴わないように Cm\* (K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>K, R<sup>157</sup>L) と Cm\*\* (K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>K) の二つを改めて作製し、これらの抗 IFN 能を測定した。

### (2) C 変異を持つウイルスの作製。

抗 IFN 活性を失った Cm\* を SeV cDNA に導入して pSeV/Cm\* を作製した。常法に従って、LLCMK2 細胞に T7 ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス(vTF7.3)を感染させ、次に pT7-N、-P、-L と pSeV/Cm\* をトランスフェクションし組換えウイルス、SeV/Cm\*、を作製した。変異ウイルスの抗 IFN 活性の有無について、次のように確認した。HeLa 細胞を 12 穴プレートに均一になるように準備し、そのままあるいは、親株 SeV または変異 SeV/Cm\* を感染させて 4 時間後にヒト IFN-β を 0、10、100、1000 IU/ml で 12 時間処理する。その後、水疱性口内炎ウイルス(VSV)を moi 5 で重感染させ、VSV により HeLa 細胞に細胞変性が起きて、細胞が培養器より脱落するか否かを 24 時間後に判定した。

### (3) IFN 対抗能を失った SeV の増殖性

直径 5 cm のプレートに均一になるように 2fTGH 細胞と U3A 細胞(STAT1 が欠損した 2fTGH 細胞由来の細胞株)を増殖させ、moi 5 で親株 SeV または変異 SeV/Cm\* を感染させて細胞内ウイルス蛋白質を抗 SeV 抗体による免疫ブロットで、細胞上清のウイルス量を CIU アッセイで測定した。

## C. 研究結果

### (1) 変異 C 蛋白質の抗インターフェロン活性

C 蛋白質にある 3 カ所の荷電アミノ酸をアラニンに置換する Cm5 (K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>A, R<sup>154</sup>A) と、C 蛋白質に備わる IFN に対抗する能力が失われる。この変異は、C 蛋白質がコードされている P 遺伝子にあり、遺伝子を共有する P と V 蛋白質のアミノ