

酸配列を変えてしまう。アミノ酸変化を伴わないように近傍のアミノ酸を置換した Cm* (K¹⁵¹A, E¹⁵³K, R¹⁵⁷L) と Cm** (K¹⁵¹A, E¹⁵³K) の二つを作製し、これらの抗 IFN 能を測定したところ、Cm* は Cm5 置換体と同等に抗 IFN 能を失っていたが、Cm** は、変異を加えていない C 蛋白質同様に抗 IFN 能を保持していた(図 1)。

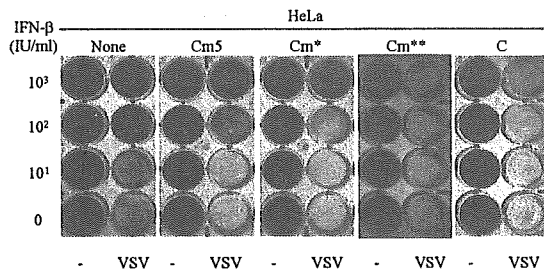


図1 変異C蛋白質の抗インターフェロン活性

(2) 抗 IFN 能の無いウイルスの作製。

Cm* (K¹⁵¹A, E¹⁵³K, R¹⁵⁷L) 変異を持つウイルスを作製した。作製したウイルスが確かに抗 IFN 能を失っているか否かを確認するために SeV 感染後に IFN を作用させ、IFN の効果が無効化されたか否かを、その後に重感染させる VSV が起こす細胞変性効果で評価した(図 2)。

非感染(mock)の細胞に IFN を 0~10³ IU/ml で処理すると、0 または低濃度処理域では細胞内で VSV が増え、細胞変性が起こって培養器から細胞が脱落してしまうが、高濃度では細胞が脱落しなくなる。細胞内の VSV 蛋白質をイムノプロットで見ると、高濃度 IFN 処理細胞では、ウイルス蛋白が薄いか見えない。IFN を処理する前に SeV をあらかじめ感染させてお

くと、今見られた様な高濃度 IFN 処理時に細胞が VSV 感染から免れるという現象が見られなくなる。これが SeV の抗 IFN 作用である。この条件で、C 蛋白質に変異を加えた SeV/Cm* を見てみると、IFN の処理濃度に関わらず、細胞が VSV 感染から免れるようになった。IFN の量に関係なく、未処理でも VSV 増殖が抑制される原因は、あらかじめ感染させた SeV/Cm* の感染刺激により、細胞から IFN が産生されたため、外から加えた IFN の濃度に依存しなくなったためと考えられる。すなわち、C に変異を加えた SeV/Cm* は、IFN 抵抗能力を失った株であることが確認された。

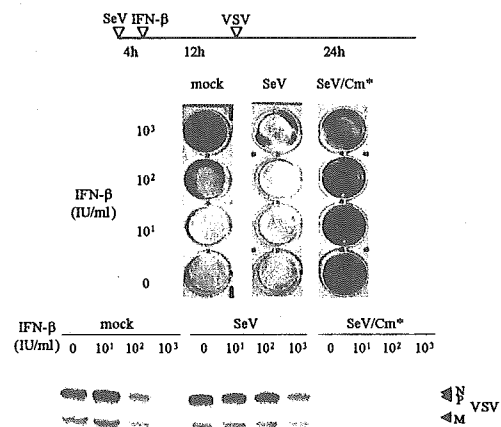


図2 C変異ウイルスの抗 IFN 能消失の確認

(3) IFN 対抗能を失った SeV の増殖性。

外来遺伝子を長期に発現させる安全な SeV レプリコンには N、P、L 遺伝子が有ればよい。P 遺伝子に同じくコードされる C 蛋白質の抗 IFN 能は、ウイルスによる蛋白質発現にとってどれほどの意味を持

つのかを評価する目的で、2fTGH 細胞に、moi 5 で親株 SeV と変異 SeV/Cm* を感染させ、細胞内ウイルス蛋白質量を比較した(図 3)。感染後 6 時間目ではウイルス蛋白質の発現は検出限界以下であるが、12 時間目から検出される。このときに、親株と変異ウイルスの間で大きな違いはない。親株ではそれ以降 12 時間目以降、蛋白質発現量が 24 時間目まで徐々に増加するのに対して、変異ウイルスでは、12 時間目のレベルから徐々に減っていく傾向をしめした。すなわち、抗 IFN 能を持たない場合には、高い遺伝子発現を期待できない。細胞の培養上清中のウイルス量を比較すると、親株と変異ウイルスの差は、24 時間目と 36 時間目でともに 10 倍以上に達した。細胞がウイルスに感染すると、その防衛措置として IFN に関連した遺伝子群の転写活性が増す。その中に IFN のシグナル伝達に関わる因子である STAT1 と STAT2 である。この二つの蛋白質は、ウイルスが感染する前から細胞内に存在している。抗 IFN 能をもつ親株 SeV が感染した場合、STAT1 と STAT2 の蛋白質量は、感染後 24 時間まで変化せず、やっと 30 時間後に上昇する。一方、抗 IFN 能を持たないウイルスの場合、早くも 6 時間目から差が認めれ、12 時間目では顕著に増加し、それが 30 時間目まで維持されている。この二つの IFN 関連遺伝子産物量の増加と、ウイルスゲノムから産生される蛋白質量とは反比例の関係にあった。

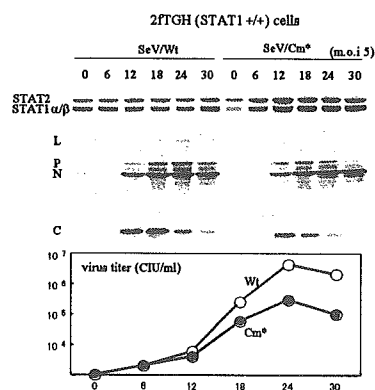


図3 抗 IFN 能消失と細胞内蛋白質発現量

ウイルスゲノムからの遺伝子発現量を持続的に行うには、細胞の防衛措置としての IFN 発動から逃れるために、ウイルスの抗 IFN 能が重要である様に見える。しかし、加えた変異が、ほんとうに IFN に対抗する能力だけに限ったものであるのかどうかを見極めなければならない。そこで、2fTGH 細胞を親株として、IFN のシグナル伝達に関与し、自らも IFN で誘導される STAT1 を欠損した細胞株である U3A を用いた。この細胞は、STAT1 が欠損しているので、IFN の抗ウイルス作用が発動しない細胞である。もし、加えた変異が、ほんとうに IFN に対抗する能力だけに限ったものであるならば、変異ウイルスの感染細胞内での発現量は親株 SeV と差がなくなると予想される。実際、U3A 細胞を使ってみた所、たしかに STAT2 は検出されるが、STAT1 は消失していた(図 4)。どちらのウイルスを感染させても、もはや STAT2 蛋白質の発現増強は認められず、感染細胞では IFN 系が動

いていないことがわかる。その時に、感染細胞内のウイルス蛋白質は、やはり 12 時間目から観察され、どちらのウイルスを感染させても 24 時間目まで発現が増え続けた。培養上清にみられるウイルス量も大きな差がなかった。このことから、2fTGH 細胞でみられた、親株 SeV と変異 SeV/Cm* の差は、抗 IFN 能の有無に帰する事ができた。

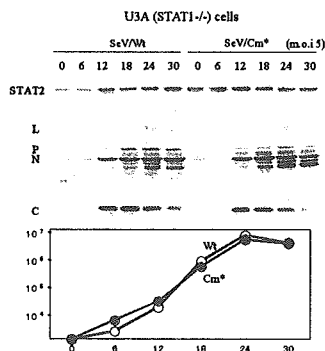


図4 宿主IFN能消失と細胞内ウイルス蛋白質発現量

D. 考察

SeV 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、外来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(図 5)。この自立増殖型は、本来の SeV の性質を引き継いで広範囲な細胞で、多量の外来遺伝子産生が可能である。しかし、単純にベクターによる物質生産をめざすのであれば、増えたウイルスが他に広がり得るといった性質は問題ではないが、特定の細胞でだけ発現させたい、あるいは、環境中にばらまく危険性がある事を考えると、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を作った。

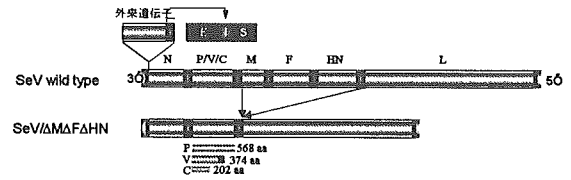


図5 SeV 発現ベクターの基本骨格

この欠損型は、M、F、HN 遺伝子が除かれた形になっている(図 5)。N、P、L 遺伝子はゲノムの転写と複製には必須であるので、発現ベクターとしては除く事ができない。しかし、同じく P 遺伝子からは、P 蛋白質の他に、V と C 蛋白質が産生される。そこで、本研究では最近研究が進んだ C 蛋白質の抗 IFN 機能の発現における影響を検討した。

ウイルスが細胞に感染すると数時間以内に IFN が分泌され、細胞が抗ウイルス状態になることが知られている。抗ウイルス作用の実態として、2 本差 RNA 特異的 RNase によるゲノム RNA の分解、eIF-2 のリン酸化による蛋白質翻訳の停止等が知られている。これらの反応は、ウイルスベクターからの外来遺伝子発現にも影響する。

ウイルスには、あらかじめ IFN に対抗する能力を獲得したものがあり、それが SeV では、C 蛋白質である。抗 IFN 能を失った C 蛋白質に改変したウイルスの蛋白質発現は、12 時間の時点では大差ないが、それ以降、細胞内の IFN 関連遺伝子

の発現増強と反比例して低下した。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を示している。

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 系を止めておかなけれ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。なぜなら、IFN 系が止まることにより、ベクターが発現している細胞は、他の感染性因子に対して極めて無防備になるからである。

E. 研究発表

(1) 論文発表

(英文)

1. 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*
2. 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).

3. 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).
4. 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).
5. 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).

(和文)

1. 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)

(2) 学会発表

(国際学会等)

1. 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.

(国内学会)

1. 加藤 篤、清谷克寛、久保田 耐、田代眞人、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
2. 加藤 篤、清谷克寛、久保田 耐、田

代眞人、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

(3) 知的財産権の出願・登録状況
なし

麻疹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）
研究協力者 竹田 誠（九州大学大学院・医学研究院・ウイルス学）

研究要旨：麻疹ウイルスは、急性の全身感染を引き起こすヒトの代表的なパラミクソウイルスである。有効かつ安全な生ワクチンが開発されているため、適切なワクチン接種により制圧が可能であると考えられている。また、麻疹ウイルスには腫瘍溶解性があることが分かっており、抗腫瘍治療への応用開発が行われている。本研究では、麻疹ウイルスの極めて効果的な遺伝子操作系を開発し、生ワクチン株の弱毒性を規定している分子生物学的基盤を明らかにし、その知見を麻疹ウイルスを基礎としたウイルスベクター開発に応用するとともに、麻疹ウイルスに多数の外来遺伝子を挿入するための工夫のひとつとして、新たに麻疹ウイルスゲノムの分節化技術を開発し、新しい概念をもつ新型麻疹ウイルスベクターを開発した。

A. 研究目的

麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科のモルビリウイルス属に属するウイルスである。ヒトを感染宿主とするウイルスで、急性の全身感染症を引き起こす。極めて有効かつ安全性の高い生ワクチンが開発されているが、その弱毒化を規定している分子生物学的基盤は不明である。また、腫瘍溶解性をもつウイルスであることが分かっており、麻疹ウイルスを用いた抗腫瘍治療の臨床治験が米国では始まっている。本研究では、（1）組換え麻疹ウイルスを合成するための効率のよい技術を開発すること、（2）生ワクチン株の弱毒化に関わる遺伝子変化を同定すること、（3）多数の外来遺伝子挿入型麻疹

ウイルスベクターを開発することを目的に実験を行った。

B. 研究方法

（1）高効率組換え麻疹ウイルス合成系の開発に関して。

効率的な系の開発にはワクシニアウイルスによるT7RNAポリメラーゼの発現が不可欠であると考え、ワクシニアウイルスを用いた新しい系の開発を検討した。CHO細胞内で、ワクシ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。CHO細胞に麻疹ウイルスの受容体SLAMを発現させて、さらには、麻疹ウイルスの転写、複製に必要な蛋白発現ベクターを構築した。これ

らの材料をさまざまな量比で組み合わせて実験を行い、もっとも効率よく麻疹ウイルスを合成できる条件を検討した。また、さらには、ワクシニアウイルスによるCHO細胞の細胞死(アポトーシス)を制御することを検討し、麻疹ウイルス合成効率のさらなる向上を目指した。

(2) 生ワクチン株の弱毒化規定遺伝子変化の同定に関して。

(1) で開発した系を用いて生ワクチン関連株エドモンストン株と病原性野生株とのキメラウイルスを約30種類用意した。エドモンストン株は、広範な種類の培養細胞へ馴化しているが、その馴化と弱毒化には密接な相関があると考えられている。そこで、用意したキメラウイルスのさまざまな培養細胞での増殖能を解析して、細胞馴化を担っている遺伝子変異の同定を試みた。

(3) 多数外来遺伝子挿入型麻疹ウイルスベクターの開発に関して。

麻疹ウイルスのゲノムは本来、非分節の長い一本鎖RNAである。非分節ゲノムへの多数の外来遺伝子の挿入には、麻疹ウイルスの遺伝子発現機構の性質上、限界があると考え、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外来遺伝子搭載能について検討した。

C. 研究結果

(1) 高効率組換え麻疹ウイルス合成系の開発に関して。

従来型の麻疹ウイルス合成系と比較して約500倍効率の優れた遺伝子操作系を開

発することに成功した。本系の効率は、モノネガウイルス目に属するウイルスの遺伝子操作系の中で、最も効率の優れていると評価されている加藤篤らのセンダイウイルスの系と対等の効率を持つと考えられ、今後の麻疹ウイルスベクター開発に十二分に貢献できる系が出来上がったと考えている。

(2) 生ワクチン株の弱毒化規定遺伝子変化の同定に関して。

生ワクチン関連株であるエドモンストン株の細胞馴化を担う遺伝子部位の同定に成功した。受容体結合を担うH遺伝子のみならず、ウイルス粒子形成に関わるM蛋白、RNA合成を行うL蛋白の変異が、エドモンストン株の細胞馴化に重要な役割を持つことが明らかになった。特にM蛋白ではアミノ酸の64番目、89番目の変異の重要性が明らかになった。さらに重要なことには、それらの変異によってエドモンストン株は、さまざまな培養細胞での増殖能を獲得することができるが、一方、本来、生体内での主要な増殖の場となっているリンパ系細胞での増殖能には、負に働くことが示され、弱毒化との関連が示唆された。

(3) 多数外来遺伝子挿入型麻疹ウイルスベクターの開発に関して。

本来、非分節型である麻疹ウイルスのゲノムを3本に分節化することに成功した。期待通り、分節化により麻疹ウイルスゲノムの外来遺伝子搭載能力が大幅に向上することが示された。現在までに、6箇所の外來遺伝子挿入部位の構築に成功し、5つの外来遺伝子の同時発現に成

功している。

D. 考察

これまで、麻疹ウイルスの遺伝子操作は、比較的難しく、多くの組換えウイルスを用いた解析や、大幅な遺伝子改変には、多大な労力と大きな困難が伴っていた。われわれの開発した高効率麻疹ウイルス遺伝子操作系によって、麻疹ウイルスの遺伝子機能の解析効率が、飛躍的に向上するとともに、従来の系では、おそらく不可能であったゲノム分節化という大幅な遺伝子が可能になった。

本系により、これまでほとんど分かっていなかったエドモNSTONワクチン関連株の細胞馴化（そして弱毒化）に関わる遺伝子部位の特定に成功した。この知見は、麻疹ウイルスのみならず多くのウイルスの分子生物学的な理解を助けるのみならず、もちろん、麻疹ウイルスを用いたベクター開発に大きく貢献するものである。

また、非分節であることが基本的な特性であり分節化はできないと予想されていたモノネガウイルスの分節化に麻疹ウイルスを用いて成功したことは、ウイルスの進化を考える上でも極めて重要な知見である。また、そのことにより5つの外来遺伝子の同時発現が成功した。この技術は加藤篤らのセンダイウイルスの系にも、応用が可能であると考えられる。すなわち、本技術により、パラミクソウイル

スベクターの可能性が、さらに広がったと考えられ、今後の大きな進展が期待できる。

E. 研究発表

(1) 論文発表 (原著)

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).
- (総説)
- Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S., and Seki, F. Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis.* (in press).
- 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)、リバーズ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。
- (2) 学会発表
(国際学会等)
- 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.

(国内学会)

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

(3) 知的財産権の出願・登録状況
分節ゲノム型モノネガウイルスベクター
出願済

狂犬病ウイルスベクターの改良

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）
協力研究者 伊藤 睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：狂犬病ウイルスベクターは細胞質内ウイルスベクターとして期待されているが、ワクチン開発に応用する際には効果および安全性の面において更なる改良が望まれる。狂犬病ウイルスベクターをワクチン開発に利用する際、外来抗原の発現量は非常に重要であることから、クローニングサイトの改変による高発現狂犬病ウイルスベクターの開発を試みた。作出された高発現狂犬病ウイルスベクターは、これまでのベクターとほぼ同等の増殖性を示し、より効果的なワクチンベクターとして期待される。また、安全性の高いワクチンベクターとして開発された P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの産生量を向上させるため、テトラサイクリンの遺伝子発現制御系を利用した P 蛋白質高発現細胞株の樹立を行なった。その結果、既存の P 蛋白質発現細胞に比べ P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスの良好な増殖が確認された。

A. 研究目的

狂犬病ウイルス(以後 RV と略す)はラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される。野外で流行している狂犬病ウイルスは、ほぼ全ての哺乳類に致死的な急性脳炎を引き起こすことが知られている。一方、培養細胞や鶏胚等に馴化したワクチン株ではその末梢感染性および神経病原性が著しく低下している。我々は日本のヒト用不活化ワクチン製造に用いられている弱毒 RV ワクチン株 High egg passage-Flury 株（以下 HEP-Flury 株と略す）のワクチンベクターとしての有用性を検討している。本研究では RV ベクターのワクチンベクターとしての利便性強化を目的とした。

RV のゲノムはマイナス一本鎖 RNA であり、3'末端より N, P, M, G および L の 5 つの遺伝子を持つ。RV の転写は N 遺伝子上流に存在する転写開始シグナルからモノシストロニックに行なわれるため、mRNA の転写量は N が最も多く下流に向かうにつれて減少することが知られている。現在使用している RV ベクターのクローニングサイトは G 遺伝子下流に配置されているが、これをより転写開始シグナルに近い N 遺伝子の下流に配置することで、挿入された外来ウイルス抗原をより多く発現することが期待される。そこで、本研究では N 遺伝子下流にクローニングサイトを持つ高発現 RV ベクターの作出を行なった。

次に、安全性の高い RV ベクターとして開発された HEP-Flury 株の P 遺伝子を欠損させた株(以下 def-P 株と略す)の、産生量向上について検討した。def-P 株は増殖に P 蛋白質の供給を必要とするため、その産生には恒常発現細胞が発現する P 蛋白質の量が大きく影響する。既存の P 発現細胞は P 蛋白質の発現量が十分ではないために、def-P 株の産生量が低いという問題があった。そこで、P 蛋白質を高発現する細胞株を作出する必要があった。本研究ではテトラサイクリン発現制御系を用いた P 蛋白質高発現細胞株の樹立を行なった。

B. 研究方法

1) 細胞とウイルス

組換えウイルスの作出にはハムスター腎細胞由来 BHK-21 細胞およびマウス神経芽腫由来 NA 細胞を用いた。ウイルス力価の測定には NA 細胞を用いた。def-P 株の調製および力価測定には P 蛋白質恒常発現細胞である BHK-P #12, BHK-P #15 および BHK-Ptet #1 を使用した。

2) ウイルス力価測定

pHEP-5.1 株の力価測定には NA 細胞を、def-P 株の力価測定は今回樹立した BHK-Ptet#1 を用い、直接蛍光抗体法により行なった。染色には FITC 標識抗 RV 抗体を用いた。蛍光顕微鏡によりフォーカスを数え、Focus forming unit (FFU)を算出した。

3) 高発現 RV ベクターの作出

HEP-Flury 株の全ゲノム塩基配列を持つフルゲノムプラスミド

pHEP-3.0 の N および P 遺伝子間の非コード領域に転写開始シグナル、制限酵素認識サイト (*SbfI*, *NotI*, *ErgI*, *SacII*) および Poly-A シグナルを付加し、プラスミド pHEP-5.1 を構築した(図 1)。BHK-21 細胞に構築した pHEP-5.1 およびヘルパープラスミド(N, P, G, L 蛋白質を供給する発現プラスミド)を導入した。培養 6 日後に培養上清のみまたは培養上清と細胞の両方を、NA 細胞に接種した。2 日間培養後上清を回収し、直接蛍光抗体法によりウイルス抗原陽性細胞の検出を試みた。

4) P 蛋白質発現細胞の樹立

調節ベクター(pTet-TAK)、ゼオシン耐性遺伝子 (pIRES-Zeo) および P 遺伝子を組み込んだテトラサイクリン制御発現ベクターを BHK-21 細胞に導入した。テトラサイクリン添加による遺伝子発現制御下において、ゼオシン添加培地を用いてゼオシン耐性細胞のコロニーを選択した。選択された細胞による P 蛋白質発現の確認は抗 P ポリクローナル抗体による間接蛍光抗体法およびウェスタンブロッティング法により行なった。

5) P 蛋白質発現細胞における def-P 株の増殖

P 蛋白質発現細胞 BHK-P #12、BHK-P #15 および今回樹立された BHK-Ptet #1 に def-P 株を m.o.i. \approx 0.01 で接種した。培養上清を経時的に回収し、ウイルス力価を BHK-Ptet #1 を用いて測定した。

C. 研究結果

1) 高発現 RV ベクターの作出

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 pHEP5.1 を構築した。このプラスミドを用いて、組換えウイルスの回収を試みた。トランスフェクション後の培養上清のみまたは培養上清と細胞の両方を接種した NA 細胞の両方において、ウイルス抗原陽性細胞のフォーカスが観察された。培養上清と細胞の両方を接種した NA 細胞の方が、抗原陽性細胞の多い傾向が見られた。この上清をもう一度 NA 細胞に接種して得られた培養上清中のウイルス力価は 1.1×10^7 FFU/ml であった。

2) P 蛋白質発現細胞の樹立

テトラサイクリンおよびゼオシンを含む選択培地を用いてゼオシン耐性細胞 22 クローンを選択した。P 蛋白質に対する間接蛍光交代法により P 蛋白質の発現を確認し、最も発現の良好な BHK-Ptet #1 を選択した。BHK-Ptet #1 による P 蛋白質の発現は、テトラサイクリンによって抑制されていることを確認した (図 2A)。次にウェスタンブロッティングにより P 蛋白質の発現を確認したところ、感染細胞と同じ位置に特異的バンドが検出された (図 2B)。ウェスタンブロッティングではテトラサイクリン添加時にも BHK-Ptet #1 による P 蛋白質の発現が検出された。その発現は感染細胞およびテトラサイクリン非添加時に比べ少なかった。テトラサイ

クリン非添加時の BHK-Ptet #1 による P 蛋白質の発現は、ウイルス感染細胞とほぼ同じかそれ以上であった。

3) P 蛋白質発現クローンにおける def-P 株の増殖

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 で最も高かった (図 3)。

D. 考察

狂犬病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期待されている。ワクチン開発における狂犬病ウイルスベクターの利点としては①宿主へのインテグレートがない点、②ゲノム構造が単純で遺伝子操作が容易である点、③ほぼ全ての哺乳類に感染可能である点、④培養細胞での増殖が良い点、等が挙げられる。しかしながら、RV 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。そこで、本研究では高発現 RV ベクターの作出および def-P 株の増殖性の改善行なった。

ラブドウイルスでは、3'末端に近い遺伝子ほど mRNA の転写が多いことを利用し、高発現ベクター HEP5.1 株を作出した。挿入外来遺伝子のない状態では、HEP5.1 株は野生型とほぼ同等に増殖した。しかし、挿入遺伝子の

大きさや種類によって、P蛋白質の発現量が低下してウイルス増殖の低下が見られることが同じラブドウイルスに属する VSV で報告されている。したがって、組換え体を作製する際には、N-P 遺伝子間または G-L 遺伝子間の 2ヶ所に外来遺伝子を挿入し、これら組換え体とその外来抗原発現量および増殖性の面から比較し、どちらかを選択するのが合理的であろう。

def-P 株の増殖性改善のため、テトラサイクリンによる遺伝子発現制御系を用いて、新規に P 蛋白質発現細胞を樹立した。今回作製した発現細胞は、ウェスタンブロッティングにより、感染細胞と同等の P 蛋白質の発現が確認された。さらに、これまで使用していた P 蛋白質発現細胞に比べ、def-P 株の増殖が良好であることが確認された。しかし、HEP-Flury 株に比べると増殖のピークが遅く、発現抑制が無くなってから十分量の P 蛋白質が供給されるまでに、時間がかかることが示唆された。今後、継代前からテトラサイクリンを培地から除くなど、培養条件の更なる検討を行なうことでさらに def-P 株の産生量を上げることが出来ると思われる。P 蛋白質の細胞毒性は報告されていないが、今後細胞毒性の報告されている M 蛋白質や G 蛋白質の発現細胞を樹立する際には、テトラサイクリンによる遺伝子発現制御系を使用する必要があると思われる。

E. 結論

高発現 RV ベクターの作出に成功した。

また、今回樹立した 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、def-P 株の産生がより多いことが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takayama-Ito M, Inoue KI, Shoji Y, Inoue S, Iijima T, Sakai T, Kurane I, Morimoto K (2006) 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.* 10;

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

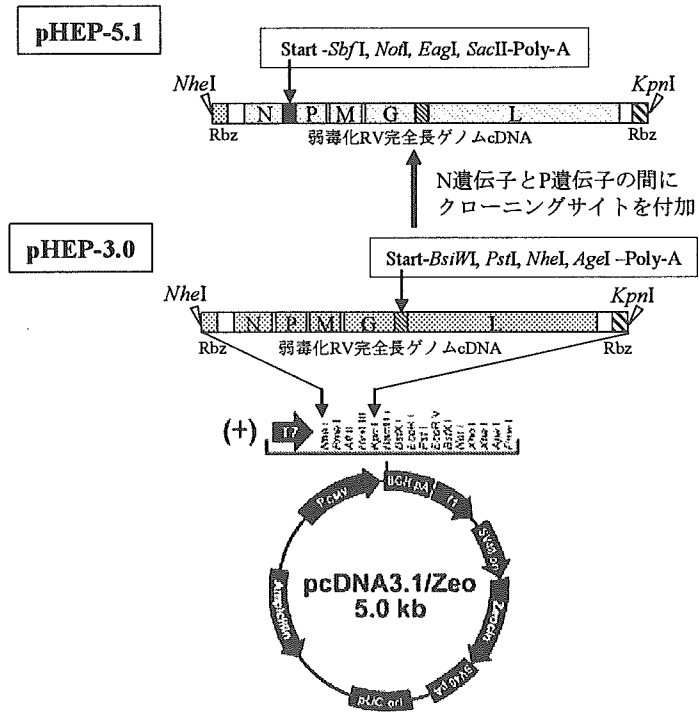


図1：高発現RVベクターの構造

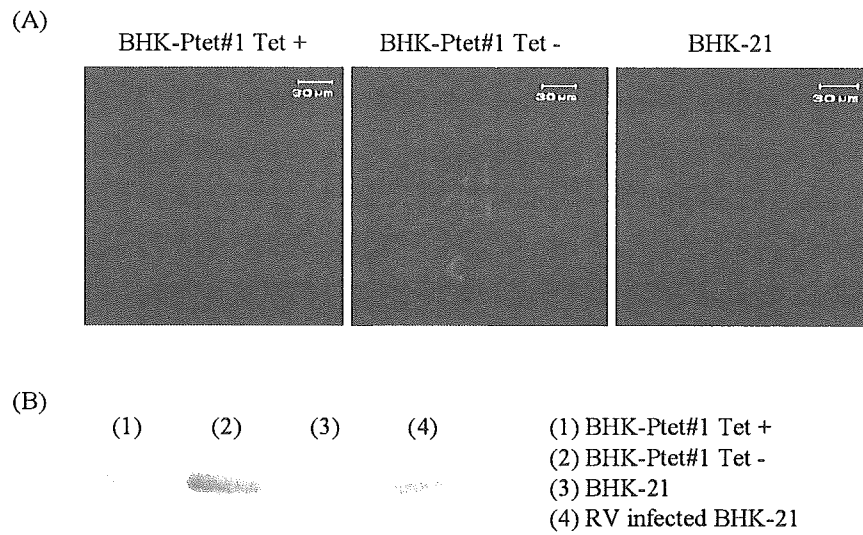


図2：P蛋白質発現の確認
 (A) 関節蛍光抗体法によるP蛋白質の検出。(B) ウェスタンブロッティング法によるP蛋白質の検出。

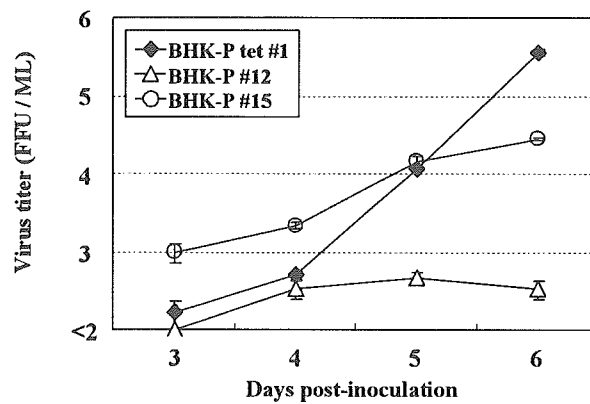


図3：P蛋白質発現細胞におけるdef-P株の増殖曲線

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 組換えセンダイウイルスベクターの作製

分担研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）
協力研究者：林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部）
高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：日本脳炎ウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスで日本脳炎ウイルス血清型群に属し、ウエストナイルウイルス、クンジンウイルスなどその抗原性が極めて類似している。ところでヒトに対する病原性のないセンダイウイルスの Z 株の cDNA に外来遺伝子を導入したウイルスベクターを用いることによって標的の培養細胞あるいは動物個体に外来蛋白質を発現させることが出来る。我々はセンダイ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されている日本脳炎ウイルスを抗原として選択した。本研究の目的は日本脳炎ウイルス抗原を発現する組換えセンダイウイルスを作製することである。その結果われわれは 2.4×10^9 PFU/ml の日本脳炎ウイルスから RNA を抽出し、RT-PCR にて目的遺伝子である 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、各目的遺伝子をセンダイウイルスベクターに導入した。

A. 研究目的

日本脳炎はフラビウイルス科フラビウイルス属の日本脳炎ウイルスによって発症する急性熱性脳炎である。日本脳炎ウイルスはエンベロープを有する直径 40-50nm の一本鎖 RNA ウイルスで、イエカ属の蚊によって媒介される。日本脳炎ウイルスは東アジアから東南アジア、南アジア地域に広く分布している。感染者の多くが無症状に終わるが本症を発症した場合突然の高熱に始まり重症例では脳神経麻痺などの神経症状を示す。死亡率は 20-40% で特に幼少児や高齢者で高く予後不良である。日本では現在も日本脳炎ウイルスの感染環がブタと蚊の間で維持されておりヒトへの感染の危険性は依然

として存在するため今後も日本脳炎に対する予防等の対策が必要である。

日本脳炎ウイルスのゲノムには 5'側より構造蛋白質のコア蛋白質 (C)、先駆膜蛋白質 (prM)、外被膜蛋白質 (E)、次いで非構造蛋白質 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) の遺伝子が順にコードされている。このうち中和抗体誘導に関わる蛋白質は prM, E, NS1 であり、CTL エピトープを含むと報告されている主な蛋白質は NS3 及び E である。

ところでセンダイウイルス Z 株の cDNA に外来遺伝子を導入することにより目的の細胞に外来蛋白質を発現させることが可能である。センダイウイルスはパラミクソウイルス科レスピロウイルス属の一本

鎖マイナス RNA ウイルスである。セндаイウイルスベクターの特徴は1) SeV ゲノムは短い start/stop 配列に挟まれた転写領域の単位から構成されているため目的遺伝子の導入効率が得られやすく、2) RNA ウイルスであるセндаイウイルスは細胞質で増殖するのでリコンビネーション、リバージョン、インテグレーションが観察されず、3) 大きな外来遺伝子を安定して導入可能で、4) 感染細胞に細胞変性を起こさず外来遺伝子を長期に渡り大量発現し、5) ヒトに対する病原性が無いこと等が挙げられる。

そこでわれわれは組換えセндаイウイルスを用いたワクチンの開発のモデルとして、すでに不活化ワクチンが普及しマウスモデルが確立されている日本脳炎ウイルスを選択した。本研究の目的は日本脳炎ウイルス抗原を発現する組換えセндаイウイルスを作製し、その性状、効果および安全性を明らかにすることである。その結果われわれは 2.4×10^9 PFU/ml の日本脳炎ウイルスから RNA を抽出し、RT-PCR にて目的遺伝子である 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た。また、各目的遺伝子をそれぞれセндаイウイルスベクターに導入した。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞：日本脳炎ウイルスの cDNA 作製にあたってはワクチン株である日本脳炎ウイルス中山株を用いた。培養細胞はサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

ウイルス力価測定：日本脳炎ウイルスの力価を Vero 細胞を用いたプラーク法により測定した。6穴プレートに Vero 細胞を1ウェルあたり 4×10^5 個播種し、一晚培養後10倍階段希釈を行った各希釈ウイルス液を100 μ l 接種した。37°C で90分吸着後1%メチルセルロースを重層し、6日間培養した。3.7%ホルマリンで固定後メチレンブルー染色液で染色しプラーク数からウイルス力価を算出した。

RT-PCR： 2.4×10^9 PFU の日本脳炎ウイルス培養上清から High Pure Viral RNA kit (ロシュ) を用いて RNA を抽出した。次いでランダムプライマー (インビトロジェン) を用いて逆転写酵素 SuperScript III (インビトロジェン) により日本脳炎ウイルスの cDNA を作製した。PCR 反応には AAGCGGCCGCGAAGAATCGAGAGAT TAGTGCAGT と ATAGCCTGCGCAGGAGCCTAAAGTAAGAAAACTTAGGGTGAAGTTCATCGCGGCCGCAA (C 蛋白質) , AAGCGGCCGCGAAGAATCGAGAGAT TAGTGCAGT と TTCTTAGCGACCAATGTGCATGCTTAACTAGTAAGAAAACTTAGGGTGAAAGTTCATCGCGGCCGCAA (C 蛋白質から E 蛋白質) , AAGCGGCCGCCACCGCCACCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCA と TTCTTAGCGACCAATGTGCATGCTTAACTGGAGTAAGAAAACTTAGGGTGAAAGTTCATCGCGGCCGCAA (prM 蛋白質から E 蛋白質) , AAGCGGCCGCCACCGCCACCATGGCTTTGGCCTTCTTAGCCACA と ATTTGGCGAGGTATGTGGTGCTATAAGCAGTA

AGAAAACTTAGGGTGAAAGTTCATC
GCGGCCGCAA (NS1蛋白質),
AAGCGGCCGCCACCGCCACCATGATT
GTTCCCGCCGCTTTTGGTTATとGACT
TTGCAGCAGGGAAGAGATAAGCAGT
AAGAAAACTTAGGGTGAAAGTTCAT
C GCGGCCGCAA (NS3蛋白質)
を用いた。PCR産物を1.5%アガロースゲル
を用いて電気泳動し、エチジウムブロマイ
ドで染色し確認した。

遺伝子配列解析：遺伝子配列解析は3100-
Avant ジェネティック・アナライザー(AB
I PRISM)を用いて行った。

C. 研究結果

ウイルス力価試験：日本脳炎ウイルスのR
NAを抽出するにあたり日本脳炎ウイルス
中山株のウイルス力価測定をVero細胞を用
いて行った。その結果日本脳炎ウイルスの
力価は 4.8×10^9 PFU/mlであった。これは日本
脳炎ウイルスのRNAを抽出するのに十分
なウイルス量であるので、つぎにRT-PCR
により日本脳炎ウイルスの目的遺伝子の増
幅を行った。

RT-PCRによる日本脳炎ウイルスの目的遺
伝子の増幅： 2.4×10^9 PFUの日本脳炎ウイル
ス培養上清からRNAを抽出した。抽出した
RNAをランダムプライマーを用いて逆転
写し、日本脳炎ウイルスの目的遺伝子(図
1)をPCRにて増幅した。その結果C蛋白
質(380bp)、C蛋白質からE蛋白質(2381b
p)、prM蛋白質からE蛋白質(2000bp)、pr
M蛋白質からNS1蛋白質(3236bp)、NS1蛋
白質(1235bp)、NS3蛋白質(1856bp)の各

目的遺伝子を得ることが出来た(図2)。

目的遺伝子のセンダイウイルスベクター
への導入：得られた目的遺伝子をセンダイ
ウイルスベクターのleader配列下流の制限
酵素Not I部位に導入し、日本脳炎ウイルス
抗原組換えセンダイウイルスを作製した
(図3)。作成した組換えセンダイウイル
スベクターの導入遺伝子塩基配列を解析し
目的遺伝子の確認を行った。

D. 考 察

本研究の目的はセンダイウイルスベクタ
ーを応用した安価で迅速なワクチン開発の
モデルとしてすでに不活化ワクチンが開発
されている日本脳炎ウイルス抗原を発現す
る組換えセンダイウイルスの作製すること
である。その結果C蛋白質、C蛋白質からE
蛋白質、prM蛋白質からNS1蛋白質、NS1
蛋白質、NS3蛋白質の各領域の遺伝子を増
幅した。各目的遺伝子をセンダイウイルス
ベクター作製プラスミドに導入した。

日本脳炎ウイルス遺伝子は約11kbの一
本鎖RNAからなり、5'側より構造蛋白質
C、prM、E次いで非構造蛋白質NS1、
NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、
NS5が順にコードされている。中和抗体
誘導に関わる蛋白質はprM及びEであり、
現在用いられている日本脳炎不活化ワク
チンはこれらの構造蛋白質から構成され
ている。これに対してCTLエпитープを
含むと報告されている主な蛋白質は構造
蛋白質E及び非構造蛋白質NS3である。

組換えセンダイウイルスワクチンを開
発するにあたり、我々は日本脳炎不活化ワ
クチンに含まれるC蛋白質からE蛋白質ま

での遺伝子のみならず，C 蛋白質，prM 蛋白質から E 蛋白質，NS1 蛋白質，NS3 蛋白質の各領域を選択した．各抗原を発現する組換えセンダイウイルスと日本脳炎不活化ワクチンを比較することにより各抗原の抗原性，安全性等の検討が可能となり，より有効なワクチンの開発につながる．

今後作製した組換えセンダイウイルスプラスミドを用いて組換えセンダイウイルスを作製し，マウスモデル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外来抗原発現組換えセンダイウイルスを用いたワクチン開発モデルを確立する．

E. 結論

センダイウイルスベクターを用いたワクチン開発において，すでに有効なワクチンが広く臨床応用されている日本脳炎ウイルスは有用なモデルである．センダイウイルスベクターは目的遺伝子の導入効率が得られやすく，リコンビネーション，リバージョン，インテグレーションが観察されず，比較的大きな外来遺伝子を安定して導入可能でしかもヒトに対する病原性がない等の利点がある．今後組換えセンダイウイルスを作製し，マウスモデルを用いた抗原性及び安全性を明らかにしていくことによりセンダイウイルスベクターを用いたワクチン開発において有用なデータが得られることが期待される．

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

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)

2. 学会発表

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

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