

200628016B

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 - 一般 - 045)

総合研究報告書

主任研究者 森本 金次郎

(国立感染症研究所)

平成19(2007)年 3月

目次

I. 総合研究報告

- 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 ----- 1
主任研究者： 森本金次郎

II. 分担研究報告

1. パラミクソウイルスベクターの開発及び応用に関する研究 ----- 40
分担研究者： 加藤 篤
2. 日本脳炎ウイルス抗原を発現する組換え狂犬病ウイルス作製のため
の日本脳炎ウイルス抗原遺伝子の増幅 ----- 53
分担研究者： 高崎 智彦
3. 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 ----- 56
分担研究者： 倉根 一郎
4. ヘルペスウイルスワクチンの評価法の開発に関する研究 ----- 58
分担研究者： 井上 直樹
5. 天然痘ワクチンの有効性を評価するための霊長類を用いたモデルの
作製 ----- 66
分担研究者： 西條 政幸
6. 狂犬病ウイルスに対する骨髄系樹状細胞の反応 ----- 75
分担研究者： 西園 晃
7. RSV 感染による病原性発現の機序のウイルス因子、宿主因子の検討 ----- 92
(ワクチン開発のための基礎的研究)
分担研究者： 錫谷 達夫
8. 狂犬病ウイルス中和モノクローナル抗体の樹立をめざした取り組み ----- 105
ーヒト・1/ライブラリーの構築からヒト型モノクローナル
Fab 抗体と完全型 IgG1 抗体の作成ー
分担研究者： 西園 晃

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 室長）

研究要旨：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。

3年間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を外来遺伝子発現ベクターとして用いる場合の利便性を考え、各種遺伝子を欠損した狂犬病ウイルスを作製し、その安全性、免疫原性に対する研究を行った。その手始めとして、P 遺伝子欠損狂犬病ウイルス（def-P 株）を作製し、ワクチンとしての有用性を検討した。さらに、def-P 株ウイルス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、狂犬病ウイルスベクターの安全性を考えるうえで、重要な問題である。表面糖蛋白質である G 蛋白質の 333 位の一アミノ酸置換における病原性の変化と免疫応答の変化を調べた。
- 2) 組換え狂犬病ウイルスを利用した、ワクチン評価法への利用として、GFP 組換え狂犬病ウイルスを用いた中和抗体測定法の開発を行った。
- 3) センダイウイルスベクターの外来ウイルス抗原遺伝子発現の利用として、インフルエンザウイルス HA 蛋白質発現センダイウイルスを作製した。そのセンダイウイルス粒子中に HA が取り込まれることが示された。さらに、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。
- 4) 外来ウイルス蛋白質発現ウイルスとして、日本脳炎ウイルス抗原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た。中和抗体の標的抗原である prM と E 領域だけでなく、CTL エピトープをもつ NS3 領域もクローニングし、狂犬病ウイルスとセンダイウイルスベクターへの組込みを行い組換えウイルスの作製を試みている。

5) 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協力し、麻疹ウイルスベクターの回収に用いるワクチニアウイルスによるアポトーシスを阻害することにより、組換えウイルスの産生の効率が増強することが分かった。また、イヌジステンパーウイルスベクターの開発に協力した。

6) デングウイルス RNA の定量法を TaqMan RT-PCR 法により確立した。さらに、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。

7) 単純ヘルペスウイルス (HSV) サイトメガロウイルス (CMV) の糖蛋白質遺伝子をクローニングし、G 蛋白質欠損 VSV 粒子を利用したシュードタイプ粒子形成により、HSV の感染には gB, gD, gH, gL の 4 種類の糖蛋白質が必要であることを示した。さらに CMV の gB 糖蛋白質がマウス白血病ウイルス (MLV) env 糖蛋白質と共存した形で VSV シュードタイプ粒子中に含まれる事が示され、中和抗体価の測定に供することが可能であることが示された。また、ヘルペスワクチンの新たな候補として、免疫からの回避機能が欠損した弱毒株の検討を行った。

8) 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。

9) Respiratory Syncytial virus (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。また、RSV 感染症の重症度とプロスタグランジン I_2 (PGI_2) 合成酵素プロモーター領域の多型の関連性を調べた。

10) 痘そうワクチンの評価を行うための動物実験モデルとして、カニ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。ウイルス血症とウイルスゲノム血症の測定を行った。さらに、このサル実験モデル系を用いて、ワクチニア Lister 株のワクチン有効性を示すため、痘そうワクチン接種からサル痘ウイルス感染までの日数とワクチン効果の関係、およびその日数と各種血中サイトカインの変動を解析した。

11) 狂犬病ウイルスは不活化ワクチン・生ワクチンであれ、優れた免疫賦活効果を有する。狂犬病ウイルス粒子がマクロファージに取り込まれる際の免疫応答関連遺伝子の発現変動を調べ、ケモカイン CXCL10 の産生誘導がおこることが示された。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。さらに、狂犬病ウイルス感染における樹状細胞の応答を解析し、強毒株と弱毒株における反応の違いを見出した。

12) ファージディスプレイ法を用いて、狂犬病ワクチン接種のヒト末梢血リンパ球より、Fab フラグメントのライブラリーを構築、狂犬病ウイルスに対する中和抗体価を有する遺伝子のクローニングを行った。さらに、別な方法として EB ウイルストランスフ

オーメシオン法を用いて抗体遺伝子の単離を試みている。

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っている。

我々の研究班においてウイルスベクターとして使用可能な狂犬病ウイルスと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した。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、抗体産生等の新たな技術の開発とその応用を目指している。さらに、ウイルス感染における宿主側の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、ウイルス感染の新たな指標

となるものの探索、さらに、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うことを目指している。

ウイルスベクター系としてセンダイウイルスベクターを利用する研究を行う。センダイウイルスはヒトに対してはほとんど病原性を示さないが、実験感染させたマウスには致死的な肺炎を起こすことから、呼吸器感染症のモデルとしてもよく使われている。16年度にはH5型インフルエンザウイルスのHAを組込んだ組換えウイルスの作製を行った。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、17年度より、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いるC蛋白質の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ている。さらに、麻疹ウイルスベクターの改良に関する研究とイヌジステンパーウイルスベクターの開発にも共同研究として行った。

狂犬病ウイルスベクターにおいては、外来ウイルス遺伝子の発現に適したウイルスベクターとしての改良の一環として、ワクチンとしての有用性を検討した。HEP-Flury株は末梢感染からの病原性の減弱した弱毒株であるが、現在は不活化ワクチンとして広く使用されている。発現ベクターとしての利用には安全性の面からの何らかの改良を加えなければならない。そこで、我々は遺伝子欠損ウイルスを作製し、そのベクターとしてのあるいはワクチンとしての有用性を検討した。また、一アミノ酸の置換で病原性に変化が現れることが既に明らかとなっていることから、G蛋白質の333位のアミノ酸が我々の用いている狂犬病ウイルスベクターにどのような病原性の変化をもたらすかを解析した。また、既に確立した中和抗体測定法がある狂犬病ウイルスにおいてはGFP遺伝子を持つ組換え狂犬病ウイルスを作製し、そのウイルスを中和抗体測定に使用することにより、高価な蛍光標識抗体を必要とせず、従来の方法と同様の信頼性を持つ方法を開発することを目指した。

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び、組換え狂犬病ウイルス及び組換えセンダイウイルスを作製し、従来の日本脳炎ワクチンと比較することにより、長所短所を検討することを目指した。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ている。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。さらに、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(GP-CMV)の実験系が有用であることを解析した。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GP-CMVの作製も行なった。しかしながら、GP-CMVゲノムの全塩基配列が決定されていないことや特異的抗体がほとんど存在しないことなどが、感染増殖とワクチンの阻害効果を解析する上で障害となっている。そこで、GP-CMVの全ゲノム塩基配列を決めること、及びその配列情報をもとに感染初期に発現される前初期蛋白に対する特異抗体を作製することを目指した。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。

HSVに対するワクチンとして、どのようなワクチンが理想的であるかを明らかにすることを目的に、マウスの動物実験系を用いて研究を行った。16年度には免疫回避機能を欠損したウイルスが強い免疫を誘導するワクチン株となりうるか否か、さらにワクチンが誘導する免疫がHSVによって引き起こされるどの疾患に有効であるのかを検討した。新規ワクチンの評価において中和抗体価の測定は必須である。しかしながら、バイオセーフティ上の理由から容易に培養できないウイルス、細胞培養系で増殖しないもしくは力価測定に時間と労力を必要とするウイルスも存在する。こうした場合に、緑色蛍光蛋白質(GFP)を発現する組換え体水泡性口内炎ウイルス(VSV)を用いて、当該ウイルスの糖蛋白質をエンベロープに持つVSVシュードタイプを作製し、それによ

りウイルスの中和抗体価の測定等を行うことが可能である。本研究ではこれらの点についてヘルペスウイルスをモデルに検討した。

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ワクチニアウイルス 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、副作用のない新規天然痘ワクチンの開発が急務である。しかしながら、現在、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。16年度においてサル痘ウイルスをサルに感染させるモデル系を確立した。さらに、17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。18年度はこの系におけるサル痘ウイルス Zr-599 株（コンゴ盆地型）と Liberia 株の病原性について比較検討した。

センダイウイルス、ヘルペスウイルスにおいて、インターフェロン能を回避する機構が存在している。Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) おいてもインターフェロン産生を抑制する機構 (SOCS 遺伝子) が存在し、宿主の SOCS 遺伝子発現誘導に着目し検討した。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。各種ウイルス感染時における宿主の免疫応答の解析を感染の初期過程に注目して解析してきた。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貪食系の細胞によって取

り込まれ処理される。16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てきた。17年度は、ウイルス感染において共通の認識分子として産生される分子構造である二本鎖 RNA (dsRNA) を感染刺激のモデルとして、dsRNA に対するミクログリアの遺伝子発現応答パターンを明らかにした。さらに、18年度の研究では、dsRNA によるミクログリアの形態学的ならびに構造学的な応答における細胞内シグナリングの役割を解析した。また、18年度からは末梢における自然免疫と獲得免疫を仲介する重要な役割を演ずる樹状細胞を用いて、狂犬病ウイルスの強毒株と弱毒株におけるマウス骨髄系樹状細胞における反応性の違いを検討した。

さらに、RSV においては健常乳幼児、各個人による RSV 重篤化の違いは、PGI₂ 合成酵素 (PGIS) プロモーター領域における、転写因子結合塩基配列の繰り返し回数 (VNTR) の遺伝子多型によるとの仮説をたて、PGIS の遺伝多型と重症化について検討した。

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。また、新たな方法として、EBV トランスフォーメーション法によるヒト遺伝子のクローニング法を利用して、抗狂犬病ヒト IgG 遺伝子のクローニング実験も開始した。

B. 研究方法

組換えウイルスの作製：

インフルエンザウイルス

A/turkey/Ireland/1378/85 (H5N8) の赤血球凝集素 (HA) 遺伝子を RT-PCR 法によりクローニングし、センダイウイルスベクターに組み込み、組換えセンダイウイルス (SeV/tukH5) を作成した。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の作製は抗 IFN 活性を失った Cm* (K¹⁵¹A, E¹⁵³K, R¹⁵⁷L) をセンダイウイルスの cDNA に導入したプラスミド 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。

P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスは狂犬病ウイルスベクターの P 遺伝子領域を取り除き、P 蛋白質発現細胞にトランスフェクトして、産生させた。GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスは狂犬病ウイルスベクターの G 遺伝子と L 遺伝子の間に GFP 遺伝子を挿入し、作製した。狂犬病ウイルス HEP 株完全長 cDNA プラスミド (pHEP) の G 蛋白質の 333 位に相当するコドンに CAG から CGG に点変異を導入することにより、グルタミンからアルギニンに変化させたウイルス cDNA (pHEP³³³R) を作製し、リバーシジェネティクス系によりウイルス株 (rHEP と rHEP³³³R) 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ベクターと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ウイルスの作製を試みた。

VSV シュードタイプ作製には VSV の組換えウイルス作製法により、ヘルペスウイルスの 4 つの糖蛋白 (gB, gD, gH, gL)、VZV gB, gH, gL, gE, gI, gC, gM, gN と CMV gB, gH, gL, gO, gM, gN, gp42 などの糖蛋白遺伝子のクローニングを行い、シュードタイプ粒子への取り込みを調べた。

GP-CMV 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 GP-CMV 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 10⁷ 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。

ヘルペスウイルスを用いたマウス感染実験：マウスを用いたヘルペス感染実験によるワクチン評価には HSV-1 野生株である VR-3 株、チミジンキナーゼ (Thymidine kinase; TK) 欠損株 VRTK-株、UL41 遺伝子欠損株 VR Δ 41 株、UL41 復帰変異株 VR Δ 41R 株を腹腔内投与し、4 週間後に、野生株 VR-3 株をチャレンジ感染させた。HSV-1 株のマ

ウス体内での増殖は臓器採取後ウイルスの
タイトレーションを行い決定した。

モルモットサイトメガロウイルス
(GP-CMV)感染実験：4-5 週齢のモルモットの
腹腔中に 1×10^6 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。ウイルス血症はサル痘ウ
イルスによって形成されたプラーク数を測
定し、ウイルスゲノム血症は Light
cycler-polymerase chain reaction

(LC-PCR) を用いて測定した。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 TM (Hitachi Soft)
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によ
り測定した。さらに、10 頭のカニクイザル
(*Macaca fuscicularis*) を用いて、 10^6
plaque forming unit (pfu) のサル痘ウ
イルス Zr-599 株を、3 頭に皮下接種経路

(Zr-599-SC 群) で、2 頭に鼻腔内噴霧経路
(Zr-599-IN 群) で感染させ、 10^6 pfu の
Liberia 株を 3 頭に (西アフリカ型) 皮下
接種経路 (Liberia-SC 群) で、残りの 2 頭
に鼻腔内噴霧経路 (Liberia-IN 群) で感染
させ、臨床症状の観察およびウイルス学的
指標の解析を行った。

免疫応答メカニズムの解析：

マウスマクロファージ系細胞株 RAW264
を用いた実験：サイトカイン・ケモカイン
遺伝子発現パターンの解析として、インタ
ーフェロン (IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、腫瘍
壊死因子 (TNF)- α 、インターロイキン
(IL)-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、顆
粒球-マクロファージコロニー刺激因子
(GM-CSF)、トランスフォーミング増殖因子
(TGF)- β 1、CXC ケモカインリガンド (CXCL) 2、
CXCL9、CXCL10、CXCL11、CC ケモカインリ
ガンド (CCL) 2、CCL3、CCL5 の遺伝子発現
を半定量 PCR 法により測定した。ケモカ
イン CXCL10 蛋白質の発現は ELISA 法により
定量し、Mitogen-activated protein kinase
(MAPK) リン酸化は抗体を用いて定量した。

マウス脳に由来するミクログリア細胞株
を用いた実験：合成 dsRNA である poly (I:C)
の存在下で Ra2 細胞を培養した。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 κ B、NF- κ B p65、MKK1/2、MKK3/6、MKK4、
ERK1/2、JNK1/2、p38、C/EBP β 、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。また、C57BL/6 マウス新生児
脳に由来するミクログリア細胞株 MG6-1
を poly (I:C) の存在下で培養し、細胞形態
の観察、細胞骨格構造の解析、細胞内シグ
ナル伝達経路の解析、シグナル経路の阻害
を調べた。

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

ウイルス固定毒株 Challenge Virus Standard (CVS) および弱毒株 Evelyn Rokitniki Abelsrth (ERA) を用いて解析した。ウイルス接種による JAWSII 細胞表面での抗原提示関連分子の発現の観察は CVS 株 ERA 株いずれも $moi=5$ で JAWSII 細胞に接種し、72 時間後に細胞を回収・固定し、FACScan により細胞表面分子の解析を行った。FACScan に用いた抗体は、MHC class I, class II, CD40, CCR7 で調べた。又、ウイルス接種後、培養上清中の IFN- α 、IFN- β 、TNF- α の産生を ELISA 法にて解析した。

ヒト咽頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞と RSV-A2 株を用いた実験：

RSV 感染 HEp-2 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。

PGI₂ 合成酵素プロモーター領域の遺伝子多型と PGI₂ の尿中代謝産物測定：

既往歴がなく、RSV 感染症に伴う下気道炎で入院した月齢 0~12 ヶ月の乳幼児 81 人と健康成人 98 人の全血より DNA を精製し VNTR を解析した。また、体内での PGI₂ 産生を検討するために、入院時に尿を採取し、さらに対象として乳児検診で受診した月齢 12 ヶ月未満の児より 20 人の協力が得られ尿を収集した。各全血サンプルより DNA blood Mini Kit (Qiagen) を用い DNA を精製し、PGI₂ 合成酵素のプロモーター領域にある転写因子認識配列の繰り返し回数 (VNTR) を PGI₂ 合成酵素のプロモーター領域を PCR にて増幅し、PCR 産物のサイズを GeneScan (Applied Biosystems) を用いて解析した。実際の PCR 産物のサイズは 3 repeats は

279bp、7 repeats は 315bp となった。PGI₂ 代謝物の 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} と TXA₂ 代謝物の TXB₂ の尿中濃度を ELISA キット (R&D) を用いて測定した。尿中代謝物濃度の標準化のために尿中クレアチニンの濃度も測定した (Exocell Inc.)。

狂犬病ウイルス中和モノクローナル抗体 Fab のクローニングとヒト型 IgG 化：

末梢血リンパ球からのヒト V_H/ κ Fab ライブラリーの構築、ファージライブラリーのパンニング (生物学的濃縮)、ヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ を抗原とした ELISA 法にてヒト型可溶性 Fab 産生クローンを選別した。選別した Fab 標品による狂犬病ウイルス中和試験、狂犬病ウイルス-binding capacity、中和活性を示す Fab 標品の抗原特異性を調べた。さらに、完全型の IgG を得る目的で、Fab TC3G7 と TC1A10 の V κ と C κ 、および VH と CH1 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、まずは P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作製し、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。

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った。そこで、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。さらに、P遺伝子欠損ウイルスのワクチン(いわゆる半生ワクチン)としての効果を検討し、腹腔内あるいは筋肉内に接種した場合、十分な防御効果を示したが、鼻腔接種、口腔接種では十分な防御効果は得られなかった。さらに、狂犬病ウイルスベクターの安全性を検証するため、病原性に関与することが知られている表面糖蛋白質であるG蛋白質の333位の一アミノ酸置換を我々の使用している弱毒狂犬病ウイルスベクターであるHEP-Flury株に導入し、その病原性の変化と免疫応答の変化を調べた。その位置のアミノ酸を強毒型に変えることが示され、その一アミノ酸置換で脳内の伝播と免疫応答の速さに影響を与えることが分った。ベクターとして利用するに際し、用途に応じて十分な注意が必要であることを示唆する結果となった。

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。また、H5型のインフルエンザウイルスのHA遺伝子をセンダイゲノムの再上流の位置に発現ユニットとともに組込んだ組換えセンダイウイルス(SeV/tukH5)を作製した。SeV/tukH5感染細胞はHA蛋白質を産生していることが示された。そのHA分子は、培養細胞ではトリプシン非存在下にもかかわらずHA1とHA2に開裂していることが分った。

3) 17年度より、麻疹ウイルスベクターの開発に関する研究も協力研究として行ってきた。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。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。高効率組換え麻疹ウイルス合成系の開発を行い、カスパーゼ阻害剤を利用することにより、従来の系と比べて、約1000倍効率よく麻疹ウイルスを合成できる系を開発した。また、生ワクチン株の性質を規定する分子生物学的基盤の解析に関する研究、麻疹ウイルスの小動物モデルの開発としてマウスSLAMのVドメインだけをヒトSLAMのものと置き換えたノックインマウスを作製した。

4) 18年度より、イヌジステンパーウイルス(CDV)ベクターの開発の研究にも共同研究として行い。その手始めとしてCDVの全ゲノムcDNAの構築を行っている。

5) 組換えウイルス作製の技術を利用しGFP遺伝子を組込んだ三つの研究を行った。一つはGFP遺伝子組換え狂犬病ウイルスを用いて、抗体の中和測定を行う方法で、従

来の方法の改良法である。従来の RFFIT 法と GFP の発現による蛍光 positive 細胞を観察する新規 GFP 法を用いて、タイ赤十字において中和抗体価を測定した。ヒト血清、ウマ血清、イヌ血清とも両法の値に強い相関関係が示された。もう一つは GFP を発現する組換え GP-CMV 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。また、VSV の G 蛋白質遺伝子の代わりに GFP 遺伝子を組み込んだ系に他種のウイルス糖蛋白質を取り込ませるシュードタイプウイルスの作製を行い、この組換えシュードタイプウイルスを利用し、本来のウイルスを用いた中和抗体測定法が困難な場合の代替法の開発を行った。HSV 糖蛋白質によるシュードタイプの実験では、4 つの糖蛋白質 (gB, gD, gH, gL) 全てが発現された場合にのみ感染性のあるシュードタイプが産生されることを見出した。

6) 組換えウイルスの発現抗原として、日本脳炎ウイルスの遺伝子を組込むことを計画した。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) の各目的遺伝子を狂犬病ウイルス及びセンダイウイルスベクターに導入し、組換え狂犬病ウイルス及びセンダイウイルスプラスドを作製した。続いて、組換えウイルスの作製を目指し、目的ウイルス回収実験を行った。残念ながら、現在までに目的組換えウイルスの回収には成功しなかった。現在、その原因を検討中である。

実験動物モデル系の開発に関して

7) 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。

8) 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 (GP-CMV) 感染実験を行い、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 GP-CMV 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。しかし、GP-CMV の全ゲノム配列は未決定であること、GPCMV に対する特異的抗体がほとんどないことなど、このモデルの利用に当たってはいくつかの制約がある。そこで、18 年度は、GP-CMV の全ゲノム塩基配列の決定を行い、その配列情報をもとに前初期蛋白 IE2 をコードする UL122 遺伝子領域が明らかとなった、ヒト CMV の IE2 と相同性が明確な 280 アミノ酸領域を GST 融合蛋白として大腸菌で発現させ、精製後、ウサギを免疫して特異抗体を得た。

9) 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、痘そうワクチンの動物実験モデル系及びワクチン効果検討系を確立した。サル痘 Liberia 株

鼻腔内感染サル群は 10 日目以降に 10-20 個の水疱性皮膚病変が大腿部、臀部、顔部、背部に散見された。同時に食欲の低下、活動性の低下が認められた。ほぼ 10%の体重減少が観察され、感染後 16 日頃から症状の改善がみとめられた。サル痘 Liberia 株皮下感染サル群においては感染後 7 日目から食欲低下、活動性の低下などの症状が出現した。接種部位は 3 日後から発赤の伴う腫脹が認められ、徐々に潰瘍化してきた。多数の水疱性病変が出現し、2 匹の内 1 匹は感染後 10 日目に死亡した。一方、ワクチニア Lister 株鼻腔内免疫サル群には全くサル痘ウイルス感染によると考えられる症状は出現しなかった。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。18 年度はサル痘ウイルス Zr-599 株（コンゴ盆地型）と西アフリカ型 Liberia 株の霊長類における病原性について比較検討し、霊長類において、コンゴ盆地型サル痘ウイルス Zr-599 株は Liberia 株よりも強い病原性を示すことから、カニクイザルをモデ

ル動物として天然痘ワクチンの有用性を評価するにはコンゴ盆地型サル痘ウイルスを用いるべきであることを示した。

ウイルス感染とその宿主免疫応答に関する研究として

10) 骨髄系樹状細胞 JAWSII を用いて、狂犬病ウイルス (RV) 接種における宿主応答を解析した。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- α , IFN- α および IFN- β 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示された。

11) 狂犬病ウイルス (RV) に対するマクロファージ RAW264 細胞のケモカイン遺伝子発現変化を調べた結果、対照群と比較して CXCL10 の発現が 200 倍以上増加することが分かった。他のケモカイン、サイトカイン遺伝子発現において大きな変動は観察されず、RV による CXCL10 発現誘導は RV 接種 12 時間以降に生じること、さらに UV 照射によって不活化したウイルス粒子を添加した場合にも同様の発現誘導が生じることが分かった。さらに、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 β 、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- κ 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。さらに、dsRNAによるミクログリアの形態学的ならびに構造学的な応答における細胞内シグナリングの役割を解析し、アメーバ型細胞への形態学および構造学的な応答機序を明らかにした。

12) 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倍増加していることが示された。

13) 単純ヘルペスウイルスに対するワクチンとして、どのようなワクチンが理想的であるかを明らかにすることを目的に、マウスの動物実験系を用いて研究を行った。生ワクチンとして病原性を持つ野生株VR-3株と免疫からの回避機能が欠損した弱毒株VR Δ 41株、チミジンキナーゼ活性を欠損した弱毒株VRTK株、不活化ワクチンとしてUVを照射して感染性を無くしたVR-3株を用いた。その結果、VR Δ 41株が最も強い免疫を誘導し、ワクチンとして優れているこ

と、また、脳炎の予防にはウイルスが脳内に侵入し、増殖しなければならないことが分かった。

13) マウスモデルにおいてRSV感染時にProstaglandin I₂ (PGI₂)の症状軽減効果が明らかである。PGI₂合成酵素(PGIS)のプロモーター領域内に、転写因子認識配列の繰り返し回数(VNTR: variable number of tandem repeat)の遺伝子多型がある。RSV感染時の体内でのPGI₂の産生量がRSV感染症の重症度に関連し、PGI₂の産生はPGISのVNTRの遺伝子多型に関連することが示された。ヒトにおいてもRSV感染時の体内でのPGI₂の産生量がRSV感染症の重症度に関連することが示された。

抗ウイルス抗体製剤の開発の研究

14) 狂犬病ワクチン接種を受けたボランティアの末梢血リンパ球から、約350-bpの軽鎖及び重鎖の可変領域部(V_L、V_H) DNA産物をPCR法にて増幅、さらに約350-bpの軽鎖及び重鎖の定常領域部(C_L、C_{H1})を含んだ1500-bpの全長Fab DNA産物をクローニングした。可溶性Fab産生クローンとして選別された132クローンのFab抗体を含む大腸菌抽出液に関して抗ヒトIgG F(ab')₂に対するELISA値が高値であった15クローンについてRV中和活性評価を行った。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。さらに18年度よりEBVトランスフォーメーション法による抗狂犬病ヒトIgG遺伝子の選択実験も開始した。

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・病原性の欠損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。モノネガウイルスにおいてP 遺伝子がウイルスのインターフェロン発現阻止機構を担っているという知見が蓄積されてきており、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た。センダイウイルスや狂犬病ウイルスなどの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。組換えウイルスの使用目的がワクチン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。我々の作成したP 遺伝子欠損狂犬病ウイルスが増殖欠損ウイルスであるにも関わらず、予想以上の免疫原性がある所見はこのインターフェロン発現阻止機構が欠損していることが一因と考えることもできる。

狂犬病ウイルスベクター改良の一環として、遺伝子欠損ウイルスベクターの開発を行った。P 遺伝子欠損ウイルスはP 蛋白質発現細胞を用いることで、効率よく回収増幅できた。一般に遺伝子欠損ウイルスの増殖速度は遅くなるが、これは欠損遺伝子産物の供給が不十分なためと考えられる。よ

り高濃度のワクチン接種が可能となるよう欠損ウイルス産生量の増加が検討課題である。P 蛋白質を高発現させる他の発現ベクターを用いることで、P 蛋白質の十分な供給が可能となる。そこで、P 蛋白質の供給を別のミニゲノムに乗せたプラスミドを複製し、P 遺伝子欠損ゲノムと同時に発現させることで、欠損を完補するような発現系を検討している。

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考える。センダイウイルス感染において詳しく研究されている抗 IFN 機能が RSV 感染や HSV 感染においても異なる作用機序ではあるが、抗 IFN 機能がその病態に重要な役割を担っていることが明らかにされた。

ヘルペスウイルス科に分類される各ウイルスの場合、ウイルスごとにその初感染及び再活性化の病態も潜伏感染の標的となる細胞の種類も異なる。公衆衛生の観点からワクチンの開発が重要な疾病としては新生児ヘルペスと先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症がある。CMV については、先天性感染の動物モデルやワクチン評価系の制約のため開発がすすんでいない。ヘルペスウイルス (HSV) の研究において、これまで少なくとも 5 つの因子が宿主の免疫から回避する機能を持っていることが明らかとなっ

ており、この機能を失った変異ウイルスは弱毒化することが知られている。今回我々は、その 1 つ UL41 を欠損したウイルスをワクチン候補として動物実験を行い、強い免疫を誘導する優れた弱毒生ワクチン株であることを明らかにした。この弱毒化ならびに生ワクチン化の戦略は単純ヘルペスウイルスに限らず、免疫からの回避機構を持つ全てのウイルスに応用可能なものと予想される。今後、本研究課題で計画されているウイルスベクターを用いたワクチンによって、さらに問題を明らかにし、解決していきたい。

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目指し、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。しかしながら、狂犬病ベクターとセンダイウイルスベクターにおいて、組換えウイルスの回収実験を数回行ったが、組換えウイルスの回収には成功しなかった。その原因は現在検討中であるが、第一に考えられることは(-)RNA ウイルスである狂犬病ウイルスやセンダイウイルスと (+)RNA ウイルスである日本脳炎ウイルスの遺伝子を組み込んだことにより、ゲノム上で何らかの阻害作用が働いていることが考えられる。

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を示す結果が期待できるかもしれない。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弱毒化狂犬病ウイルスベクターの利点として、優れた免疫増強効果が挙げられる。狂犬病ウイルスによるマクロファージ活性化の特筆すべき点として、サイトカイン並びにCXCL10以外のケモカインの遺伝子発現パターンにはほとんど影響を与えないことが挙げられる。ワクチンベクターとしてウイルスを用いる場合、接種部位における過剰なサイトカインストームは、炎症反応による細胞障害や抗ウイルス応答による抗原導入効率の減衰を招く。弱毒狂犬病ウイルスは、これらの負の効果を回避しながら、特定のケモカインの産生のみを部位特異的に誘導し、他種抗原に対する免疫を誘導するワクチンベクターとしての可能性を秘めていると考える。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から、この反応性の違いは、致死病的病態を誘導する強毒株と、致死病的病原性の減衰した弱毒株の病態形成機序を解明する手掛りになると考える。

RSV感染においては骨髄由来の樹状細胞

においてPGI₂のアナログは抗原提示能を抑制し、さらに樹状細胞の分化を抑制することが知られている。RSV感染時に誘導産生されてくるPGI₂が免疫系を修飾し最終的に抗炎症的に働き、一方で血管内皮細胞の保護や血小板凝集抑制により炎症局所での循環を保ち、肺浮腫への進展を防止すると考えられる。RSV感染後に誘導されてくるPGI₂の多寡がRSVによる肺炎、気管支炎の病態にも深く関与することが考えられる。さらに本研究において、PGISプロモーター領域のVNTRのrepeatの数が多い遺伝子多型の組み合わせを持つ児ほど、RSV感染時の体内でのPGI₂の産生量が多く、一方で症状は軽度であることが示された。このことはこれまでの動物実験や細胞レベルでの知見からも矛盾しない結果である。

狂犬病の完全な暴露後治療はワクチン接種と抗狂犬病ウイルス免疫グロブリンの投与が必要であるが、この免疫製剤は日本では生産されておらず、世界的にみても圧倒的な供給不足である。ヒト血液からの製造にはいろいろな問題があることから、WHOではまずはマウスモノクローナル抗体の普及を考えているが、最終的にはヒト型モノクローナル抗体による供給を目指している。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抗狂犬病ウイルス中和抗体遺伝子を選別し、抗体を発現させることを試みた。また、新たな方法として、EBVトランスフォーマーション法によるヒト遺伝子のクローニング法を利用して、抗狂犬病ヒトIgG遺伝子のクローニング実験も開始している。

E. 結論

3年間の研究において以下の点が明らかと

なった。

1) 狂犬病ウイルスベクターより、P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作製し、ワクチンとしての有用性を検討し、防御効果のあることが示された。安全性の高い弱毒生ワクチンあるいは発現ベクターとなりえることが示された。また、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。狂犬病ウイルスベクターの安全性を考えるうえで、重要な問題である表面糖蛋白質である G 蛋白質の 333 位の一アミノ酸置換における病原性の変化と免疫応答の変化を調べ、一アミノ酸の変化が脳内での伝播と免疫応答の速さに影響を与えることが分かった。

2) GFP 組換え狂犬病ウイルスを用いた中和抗体測定法の開発を行い、現在広範に使用されている RFFIT 法と変わらない測定法であることが示された。

3) ウイルスベクターの外来ウイルス抗原遺伝子発現の利用として、インフルエンザウイルス HA 蛋白質発現センダイウイルスを作製した。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と狂犬病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ウイルスの作製を試みたが、組換えウイルスの産生には至らなかった、現在その原因を検討中である。

4) 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。

5) 麻疹ウイルスゲノムの 3 本への分節化

技術を開発に協力し、3 分節ゲノムを持つ麻疹ウイルスを作製に成功、その外来遺伝子搭載能について検討した。麻疹ウイルスベクターの回収に用いるワクチニアウイルスのよるアポトーシスを阻害することにより、組み換えウイルスの産生の効率が増強することが示された。さらに、イヌジステンパーウイルスベクターの開発に協力し、完全長ゲノム cDNA の構築を行った。

6) デングウイルス RNA の定量法を TaqMan RT-PCR 法により確立した。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を示した。

7) 痘そうワクチンの評価を行うための動物実験モデルとして、カニ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。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ワクチン接種からの日数の関係において解析した。ワクチン接種によるサイトカイン発現の変化を測定し、ワクチンとしての評価の指標を明らかにした。

8) ヘルペスワクチンの新たな候補として、免疫からの回避機能が欠損した弱毒株の検討を行った。この VRΔ41 株は弱毒生ワクチンとして優れた効果を発揮した。また、G 蛋白質欠損 VSV 粒子を利用したシュードタイプ粒子形成により、HSV の感染には gB, gD, gH, gL の 4 種類の糖蛋白質が必要であることを示した。さらに CMV の gB 糖蛋白質がマウス白血病ウイルス (MLV) env 糖蛋白質と共存した形で VSV シュードタイプ粒子中に含まれる事が示され、中和抗体価の測定に供することが可能であることが示された。

9) 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。また、GP-CMV の両末端領域を除くほぼ全領域の塩基配列を決定した。

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。RSV 感染症の重症度とプロスタグランジン I₂ (PGI₂) 合成酵素プロモーター領域の多型の関連性を調べ、RSV 感染症の重症度と PGI₂ の産生量が関連していることが分かった。

11) 狂犬病ウイルス粒子がマクロファージに取り込まれる際の免疫応答関連遺伝子の発現変動を調べ、ケモカイン CXCL10 の産生誘導がおこることが示された。さらに、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。また、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。弱毒株は強毒株と比べ、炎症系サイトカインを強力に誘導することが分かった。

12) ファージディスプレイ法を用いて、狂犬病ワクチン接種のヒト末梢血リンパ球より、Fab フラグメントのライブラリーを構築、狂犬病ウイルスに対する中和抗体価を有するヒト型 Fab 抗体遺伝子のクローニングし、完全型の IgG に転換することに成功した。新たに狂犬病ウイルスに対する中和抗体価を有するヒト型 IgG を単離法として、EB ウイルストランスフォーメーション法を用いて抗体遺伝子の単離をしている。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T., Morimoto, K. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology* 318: 295-305 (2004)

Nakamichi, K., Inoue, S., Takasaki, T., Morimoto, K., Kurane, I. Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXCL10 chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Journal of Virology* 78: 9376-9388 (2004)

Khawplod, P., Inoue, K., Shoji, Y., Wilde, H., Ubol, S., Nishizono, A., Kurane, I., Morimoto, K. A novel rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) of rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods* 125: 35-40 (2005)

Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Mitrabhakdi, E., Wilde, H., Morimoto, K., Lewis, R. A. Pathophysiology of human paralytic rabies. *Journal of Neurovirology* 11: 93-100 (2005)

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)
- 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.* 119: 208-215 (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* 6: 235-240 (2006)
- Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Suppressive effect of simvastatin on interferon-beta-induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neuroscience Letters* 407(3): 205-210 (2006)
- Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Roles of NF-kappaB and MAPK signaling pathways in morphological and cytoskeletal responses of microglia to double-stranded RNA. *Neuroscience Letters* 414(3): 222-227 (2007)
- A. Kato, C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, T. Kubota, N. Otsuki, M. Kohase, M. Tashiro, Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. *J Virol.* 76: 7114-7124 (2004)
- Y. Nagai, A. Kato. Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics. In Y. Kawaoka (ed.), *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*, Springer-Verlag GmbH and Co. KG, Curr. Topic Microbiol. Immunol. 283: 198-248 (2004)
- Nishiyama, K., K. Takaji, K. Kataoka, Y. Kurihara, M. Yoshimura, A. Kato, H. Ogawa, H. Kurihara. Id1 gene transfer confers angiogenic property on fully differentiated endothelial cells and contributes to therapeutic angiogenesis. *Circulation* 112: 2840-2850 (2005)