

表1 各遺伝子ノックアウト用 gRNA発現オリゴマー配列

標的遺伝子	オリゴマー名	配列	備考
MyD88	Myd88crispr-casRoli3	CACCGTCGGCCCACCGAGGCGCCA	センス鎖標的配列用
	Myd88crispr-casRoli4	AAACGTCTGCCGCCACCTGCGTTC	センス鎖標的配列 相補配列用
	Myd88crispr-casRoli5	CACCGTCGTCCAGCAGCCTGCCCG	アンチセンス鎖標的配列用
	Myd88crispr-casRoli6	AAACCGGGCAGGCTGCTGGACGAC	アンチセンス鎖標的配列 相補配列用
MDA5	MDA5Crispr-casR oli1	CACCGGACCAGACTCCCTTCTCCA	センス鎖標的配列用
	MDA5Crispr-casR oli2	AAACTGGAGAAGGGAGTCTGGTCC	センス鎖標的配列 相補配列用
	MDA5Crispr-casR oli3	CACCGAACCCTGACATCCTCTGAA	アンチセンス鎖標的配列用
	MDA5Crispr-casR oli4	AAACTTCAGAGGATGTCAGGGTTC	アンチセンス鎖標的配列 相補配列用
INFaR2	IFNabR2crispr-casR oli1	CACCGTCCAATCAAAGAGGCATT	センス鎖標的配列用
	IFNabR2crispr-casR oli2	AAACGAATGCCTCTTTGATTGGAC	センス鎖標的配列 相補配列用
	IFNabR2crispr-casR oli3	CACCGTGTACATTATCCTCGTGTT	アンチセンス鎖標的配列用
	IFNabR2crispr-casR oli4	AAACAACACGAGGATAATGTACAC	アンチセンス鎖標的配列 相補配列用

図1 Poly I:C刺激によるMyD88, MDA5, INFaR2遺伝子の発現

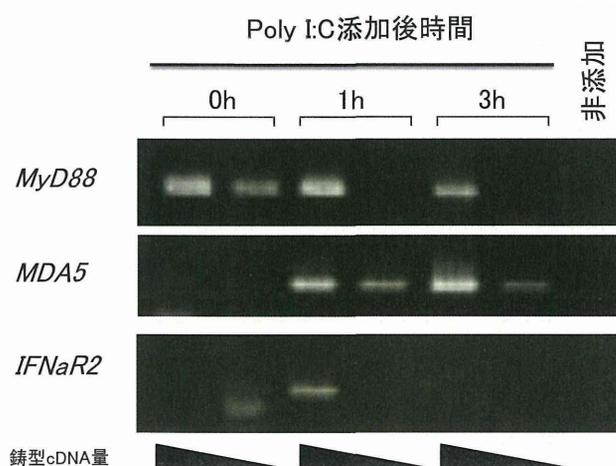
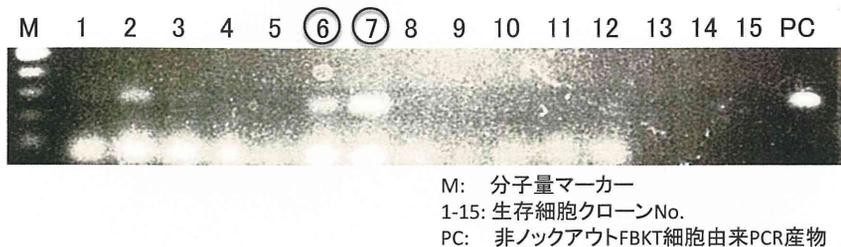
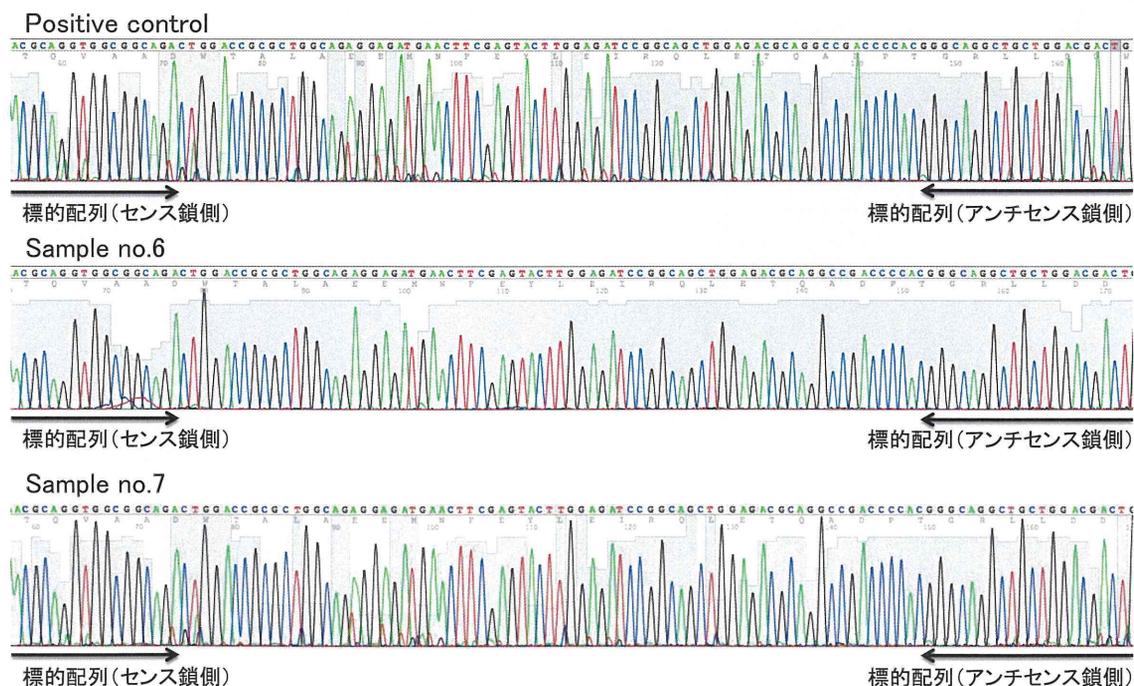


図2 PCRによる変異導入細胞のスクリーニング(MyD88)



\*2, 6, 7以外のクローンについては、鋳型cDNA量を増やしてPCRを行った際に遺伝子の増幅が確認されている。

図3 シーケンシングによる変異の確認(MyD88)



分担研究課題：組換えワクチニアウイルスを用いた効果的且つ安全な LCMV/SFTSV ワクチンの開発

分担研究者：吉河 智城（国立感染症研究所ウイルス第一部）

#### 研究要旨

一類感染症や新興ウイルス感染症は、いつ国内で発生するかもしれない。よってワクチン開発は有効な対策の一つになり得る。細胞培養痘そうワクチンの製造承認株であるワクチニアウイルス LC16m8 株は、ワクチンとしての免疫原性を維持しつつ安全性の非常に高いワクチン株である。本研究ではこの株の長所を生かして、一類感染症の一つであるラッサ熱を起こすラッサウイルスを含むアレナウイルスのプロトタイプであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）、そして 2013 年に初めて国内での発生が確認された重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）感染症への効果的なワクチン開発を行う。本年度は LCMV、そして SFTSV の膜表面抗原である GPC、核抗原である NP、N、そして膜裏打ち抗原である Z といった抗原を単価または複数価発現する組換えワクチニアウイルス(recVac)の作製を行った。

#### A. 研究目的

一類感染症が日本国内で最後に発生して既に 20 年以上経つ。だが世界規模に視点を変えれば、その発生は起き続けておりいつ再び国内で発生しても不思議ではない。そこで防疫上の観点からワクチンの必要性がある。本研究では一類感染症の一つであるラッサ熱を起こすラッサウイルスを含む、アレナウイルスのプロトタイプであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）、そして 2013 年に初めて国内での発生が確認された重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）感染症への効果的なワクチン開発を行う。

#### B. 研究方法

ワクチニアウイルス LC16m8 または mO 株を使用したウイルスベクターワクチンを開発する。これら LC16 系統の株は副反応が他のワクチニアウイルスと比べて大きく低減されている一方で、ワクチンとしての免疫原性は維持されてい

る。この特徴を活かし、LCMV、または SFTSV のタンパク質を発現する LC16 系統のワクチニアウイルスを作製し、マウスを用いた動物実験によって効果を評価する。各ウイルスへのワクチンとして効果的なウイルス抗原は現時点で不明のため、膜表面抗原である GPC、核抗原である NP、N、そして膜裏打ち抗原である Z といった抗原を単価または複数価発現するウイルスを作製して評価を行う。まず今年度は LC16mO をベースとして、これらの組換えワクチニアウイルス(recVac)の作製を行った。

#### C. 研究結果

作製を行った recVac の概略を図 1 及び図 2 に示す。LC16m8 株では不活性であることが知られている B5R 遺伝子領域を置換する形で LCMV の NP、GPC、Z、また SFTSV の N、または GPC を単価、または複数価発現するウイルスの作製を行った。特に LCMV の NP、GPC、Z タンパク質をすべて発現するウイルスについ

ては、感染細胞から LCMV の VLP が出芽しワクチン効果が更に向上することを期待している。このウイルスの対照として Z タンパク質のアミノ酸に変異を導入して正常な出芽がされないウイルスを作製している。また、陰性対照に使用するウイルスとして該当する B5R 遺伝子領域を除いた  $\Delta$ B5R を作製した。これらの recVac をウサギ RK13 細胞に感染させた後、抗 LCMV GP、NP、Z または SFTSV NP に対する抗体を用いた蛍光抗体法 (IFA) を用いて目的とする抗原の発現を確認した結果を図 3、図 4 に示す。図 4 については、蛍光が確認される感染細胞について典型的なものの一つを赤丸で囲んだ。抗 LCMV Z 抗体について、IFA ではその反応性を確認できなかったため評価ができなかった。結果として Z タンパク質を発現するウイルスを除けば、SFTSV GPC と SFTSV N+GPC、そして LCMV NP+Z を除き recVac の作製に成功していることが確認できた。SFTSV GPC と SFTSV N+GPC を発現する recVac についてはこの時点で作成途中であったために IFA 自体を行えなかった。また、LCMV NP+Z を発現する recVac については既に組換え領域をターゲットにした PCR を行った時点で作製に成功していないことは確認できていたが、IFA を行ったのでデータを示した。しかしこれら 3 種類のウイルスについては引き続き recVac の作製を行い、PCR によってウイルスゲノム内への目的遺伝子が挿入できているところまで確認できている。

【倫理面への配慮】ヒト検体、動物は使用していないため該当しない。遺伝子組換えに当っては、文部科学省の承認を得た上で行った。

#### D. 考察

外来遺伝子を発現する組換えウイルスを作製する際の問題点に、導入する遺伝子のサイズが大きくなると困難になることが挙げられる。本研究で導入遺伝子サイズが最大の recVac は

LCMV GP+NP+Z であるが、少なくとも GP と NP のタンパク質発現は確認できておりウイルスの作製は成功していると考ええる。つまりこれより導入遺伝子サイズの小さい他の recVac の作製は物理的に可能であると考察している。実際、今回 IFA でタンパク質の発現が確認できていない SFTSV GPC と SFTSV N+GPC、そして LCMV NP+Z については再度 recVac の作製を行い、PCR によってウイルスゲノム内への目的遺伝子が挿入できているところまで確認している。従って、計画している recVac の作製は全種類について行うことができると考えている。

#### E. 結論

今年度は recVac 作製を行い、IFA によって目的とする遺伝子の発現を確認することが出来た。しかし、いくつかの recVac についてはまだタンパク質の発現を確認できておらず、また、LCMV Z 遺伝子については抗体の問題から IFA による発現確認ができなかった。今後は、その他のタンパク質も含めてウェスタンブロッティングによる発現確認を行い、recVac が作製されていることを厳密に確認していく。更にプラークローニングを行うなどして recVac の樹立を推し進め、動物実験を用いた評価を行っていく。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

図1. SFTSV抗原を発現する組換えワクチニアウイルスの概略

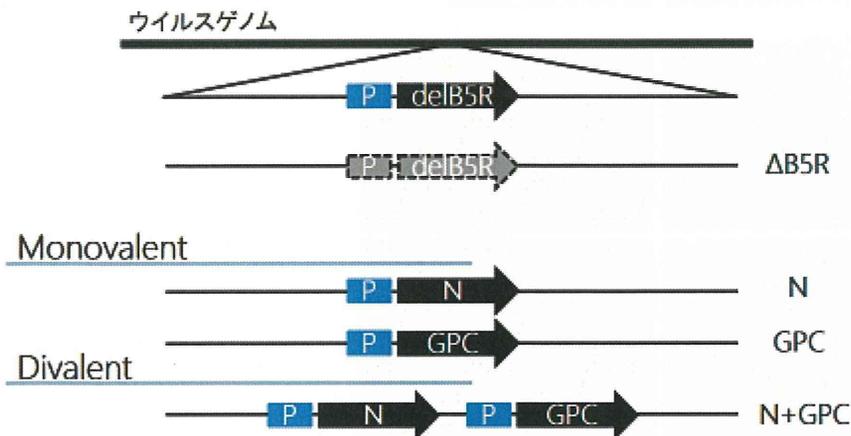


図2. LCMV抗原を発現する組換えワクチニアウイルスの概略

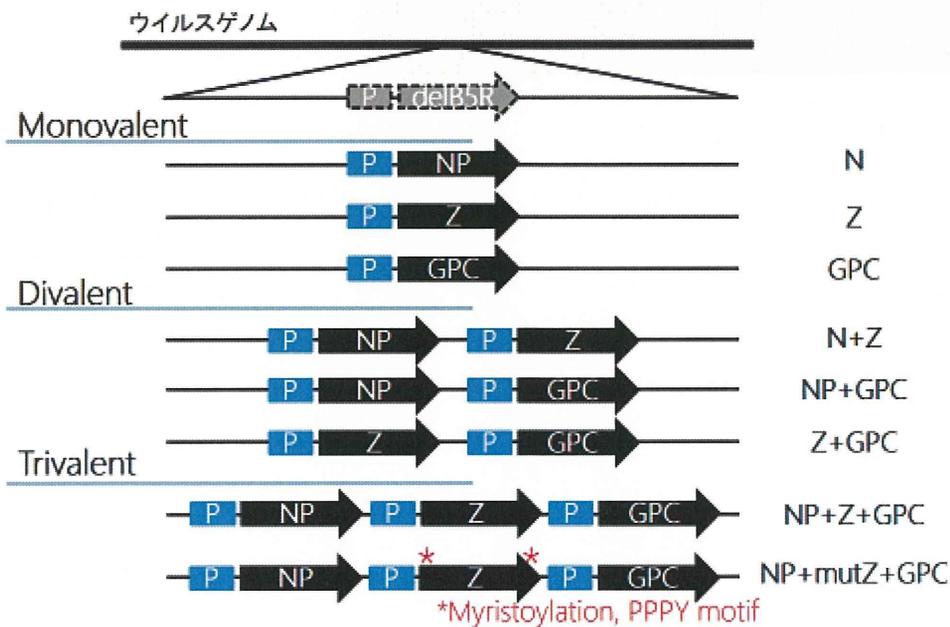


図3 蛍光抗体法によるSFTSV抗原の発現確認

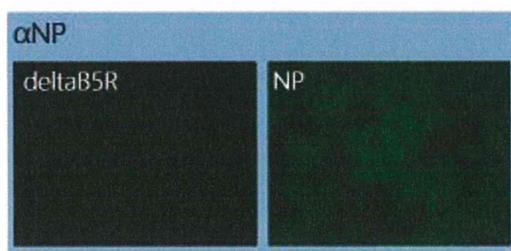
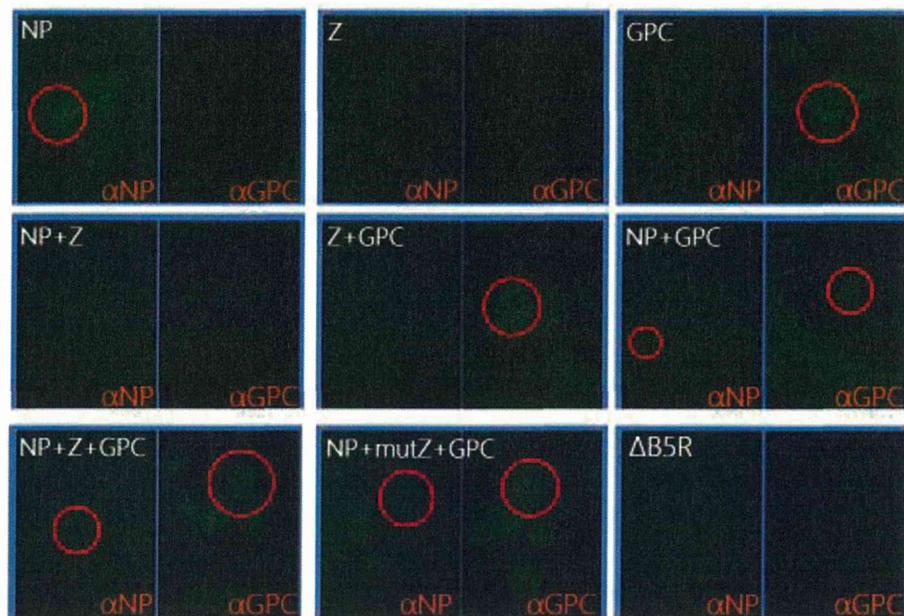


図4 蛍光抗体法によるLCMV抗原の発現確認



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 1) Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Shimizu K, Koma T, Hayashimoto N, Gamage CD, Nishio S, Takakura A, Arikawa J. Rapid, whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody in rats. *J Virol Methods* 193(1):42-49, 2013
- 2) Takada A. Do therapeutic antibodies hold the key to an effective treatment for Ebola hemorrhagic fever? *Immunotherapy* 5(5):441-3, 2013.
- 3) Changula K, Yoshida R, Noyori O, Marzi A, Miyamoto H, Ishijima M, Yokoyama A, Kajihara M, Feldmann H, Mweene AS, Takada A. Mapping of conserved and species-specific antibody epitopes on the Ebola virus nucleoprotein. *Virus Res* 176(1-2):83-90, 2013.
- 4) Hoenen T, Groseth A, Callison J, Takada A, Feldmann H. A novel Ebola virus expressing luciferase allows for rapid and quantitative testing of antivirals. *Antiviral Res* 99(3):207-13, 2013.
- 5) Noyori O, Matsuno K, Kajihara M, Nakayama E, Igarashi M, Kuroda M, Isoda N, Yoshida R, Takada A. Differential potential for envelope glycoprotein-mediated steric shielding of host cell surface proteins among filoviruses. *Virology* 446(1-2):152-61, 2013.
- 6) Noyori O, Nakayama E, Maruyama J, Yoshida R, Takada A. Suppression of Fas-mediated apoptosis via steric shielding by filovirus glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 441(4):994-8, 2013.
- 7) Maruyama J, Miyamoto H, Kajihara M, Ogawa H, Maeda K, Sakoda Y, Yoshida R, Takada A. Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, Iloviu virus. *J Virol* 88(1):99-109, 2014.
- 8) Bukreyev AA, Chandran K, Dolnik O, Dye JM, Ebihara H, Leroy EM, Mühlberger E, Netesov SV, Patterson JL, Paweska JT, Saphire EO, Smither SJ, Takada A, Towner JS, Volchkov VE, Warren TK, Kuhn JH. Discussions and decisions of the 2012-2014 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Filoviridae Study Group, January 2012-June 2013. *Arch Virol*, in press
- 9) Kuhn JH, Bào Y, Bavari S, Becker S, Bradfute S, Brauburger K, Rodney Brister J, Bukreyev AA, Cai Y, Chandran K, Davey RA, Dolnik O, Dye JM, Enterlein S, Gonzalez JP, Formenty P, Freiberg AN, Hensley LE, Hoenen T, Honko AN, Ignatyev GM, Jahrling PB, Johnson KM, Klenk HD, Kobinger G, Lackemeyer MG, Leroy EM, Lever MS, Mühlberger E, Netesov SV, Olinger GG, Palacios G, Patterson JL, Paweska JT, Pitt L, Radoshitzky SR, Ryabchikova EI, Saphire EO, Shestopalov AM, Smither SJ, Sullivan NJ, Swanepoel R, Takada A, Towner JS, van der Groen G, Volchkov VE, Volchkova VA, Wahl-Jensen V, Warren TK, Warfield KL, Weidmann M, Nichol ST. Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Arch Virol*, in press.
- 10) Komoto S., Kawagishi T., Kobayashi T., Ikizler M., Iskarpatyoti J., Dermody T. S., and Taniguchi K. A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase. *J. Virol. Methods* 196:36-39. (2014).
- 11) Boehme K. W., Hammer K., Tollefson W. C., Konopka-Anstadt J. L., Kobayashi T., and Dermody T. S. Nonstructural Protein  $\sigma$ 1s Mediates Reovirus-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *J. Virol.* 87:12967-12979. (2013).
- 12) Kato F, Ishida Y., Kawagishi T., Kobayashi T., Hishiki T., Miura T., and Igarashi T. Natural infection of cynomolgus monkeys with dengue virus occurs in epidemic cycles in the Philippines. *J. Gen. Virol.* 94:2202-2207. (2013).

- 13) Shojima T., Hoshino S., Abe M., Yasuda J., Shogen H., Kobayashi T., and Miyazawa T. Construction and characterization of an infectious molecular clone of Koala retrovirus. *J. Virol.* 87:5081-5088. (2013).
- 14) Fujita Y, Otsuki H., Watanabe Y., Yasui M., Kobayashi T., Miura T., and Igarashi T.. Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying env from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology* 436:100-111. (2013).
- 15) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87(12):7170-7175, 2013
- 16) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* (in press)
- 17) Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Emergence of zoonotic orthopox virus infections. In *Viral Infections and Global Change* (ed. Sigh SK), pp377-387, 2014, Wiley Blackwell, New Jersey
- 18) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One.* 2014 Feb 18;9(2):e89075.
- 19) Hotta A, Fujita O, Uda A, Sharma N, Tanabayashi K, Yamamoto Y, Yamada A. and Morikawa S. In vitro Antibiotic Susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013;66(6):534-6.
- 20) Fujita O, Hotta A, Uda A, Yamamoto Y, Fujita H, Shinya F, Asano S, Morikawa S, Tanabayashi K, Yamada A. Identification of the source of *Francisella tularensis* infection by a multi-locus variable-number tandem repeat analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013;66(6):543-5.
- 21) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, in press
- 22) Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jul;19(7):1159-61.
- 23) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. Role of promoter element in c-mpl gene expression induced by TPO. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2013;89(4):131-5.
- 24) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in *Cynomolgus* Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 2013, 87(2): 1105-1114
- 25) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamadaa,

- Kiyoshi Tanabayashia. Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2013 20(1): 9-16
- 26) Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol*. 2013 Dec;87(23):12552-61.
- 27) Takayama-Ito M, Nakamichi K, Kinoshita H, Kakiuchi S, Kurane I, Saijo M, Lim CK. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals* 42:42-7, 2014
- 28) Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, Lim CK, Inoue N, Mizuguchi M, Igarashi T, Saijo M. Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 strain. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (1) :356-9.
- 29) Wang LX, Takayama-Ito M, Kinoshita-Yamaguchi H, Kakiuchi S, Suzutani T, Nakamichi K, Lim CK, Kurane I, Saijo M. Characterization of DNA polymerase-associated acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1: mutations, sensitivity to antiviral compounds, neurovirulence, and in-vivo sensitivity to treatment. *Jpn J Infect Dis*. 2013; 66 (5) :404-10.

#### 日本語総説等

- 1) 梶原 将大、小川 寛人、高田 礼人 (2013) フィロウィルスの生態、*実験医学*31(19):3054-3060.

