

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

「ウイルス性出血熱の検査に関する研究」

細胞培養弱毒生痘そうワクチンを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムの改良

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部長
研究協力者 福士秀悦, 谷口怜, 谷英樹, 吉河智城, 下島昌幸 国立感染症研究所第一部
研究協力者 森川茂 国立感染症研究所獣医学部

研究要旨：細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は，Lister 株から低温馴化により LC16 株，LC16m0 株を經由して樹立された安全性の非常に高いワクチン株である．近年ではこの長所を生かして，他の感染症へのワクチンとしての応用もされはじめている．既に我々は相同組換えを利用する，LC16 系統のワクシニアウイルスを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムを構築している．当システムは，簡便かつ高効率に recVac を作製可能であり，且つ最終的に完成したウイルスゲノム内からはその後の研究に不必要な recVac 選択カセット（薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質を含む遺伝子カセット）を取り除くことが可能である．一方で，現時点までの方法ではこの recVac 選択カセットはこれを保持するウイルスを選択薬剤存在下で選択する際の，正の選択のみに使用している．このカセットをウイルスゲノムから取り除く際には選択薬剤非存在下で，相同組換えにより偶然脱落するのを期待するしか無く，そこが律速にもなり得た．そこで本研究は選択薬剤として 2-チオキサンチンを用いて，recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する「負の選択システム」を組み込んだ改良版 recVac 作製システムを確立した．

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は，Lister 株から低温馴化により LC16 株，LC16m0 株を經由して樹立された株である．サルを用いて行われた神経病原性試験により非常に神経毒性が低いことがわかっている．また，1970 年代には約 10 万人の子供に接種され，その際に重篤な副反応は確認されなかったことより安全性の非常に高いワクチン株といえる．さらに，自衛隊での成人への種痘にも用いられ安全性がさらに確認されている．この安全性と種痘における強く長期に亘る免疫誘導から，組換えワクシニアウイルスとして他の感染症ワクチンとしての応用も期待されている．既に我々は相同組換えを利用した組換えワクシニアウイルス（recVac）作製システムを構築している（図 1）．当システムは，簡便かつ高効率に recVac を作製可能であり，且つ最終的に完成したウイルスのゲノム内からはその後の研究に不必要な recVac 選択カセット（薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子を含む遺伝子カセット）を取り除くことが可能である．しかし現時点までの方法では，この recVac 選択カセットは

それを保持するウイルスを選択薬剤存在下で選択する際の，いわゆる正の選択のみに使用している．一方で，このカセットを取り除く際には選択薬剤非存在下で相同組換えによって偶然 recVac 選択カセットが脱落するのを期待するしか無かった．カセットが脱落する確立はあまり高いものではなく，これがスクリーニングの手間を増やすため，recVac 作製の律速となってしまっていた．そこで本研究では，薬剤を用いて選択圧をかけることで，recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する負の選択システムを組み込んだ改良版 recVac 作製システムの開発を行った．

B. 研究方法

recVac 選択カセット内の薬剤選択遺伝子には，これまで同様キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（*gpt*，または XGPRT と省略される）を用いている．本薬剤選択用遺伝子は，ミコフェノール酸（MPA）を用いた recVac の正の選択時に用いている MPA 存在下で阻害される細胞のプリン合成系（図 2）を中間型 recVac 感染細胞内で発現した XGPRT と，同時に添加するキサンチンによりレスキューする方法である．

今回は、キサントンのアナログである 2-チオキサントン (2-TX) を用いた負の選択法の適応を検討した。2-TX は XGPRT によってプリン合成系に取り込まれると、生体にとって機能的なプリンになりえないため毒性を発揮する。従って、XGPRT を持つ recVac の増殖が抑制され、更なる相同組換えによって生じた recVac 選択カセット部分が除かれた完成型の recVac が増殖する負の選択が可能になると考えたためである。そこで、2-TX の至適濃度などを検討し、負の選択法の実用性を検討した。

【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。

C. 研究結果、及び D. 考察

まず 2-TX の至適濃度を検討した。8mg/ml から 2 倍の段階希釈系列を作製し、そこで本組換え法で EGFP を導入した recVac (recVac-EGFP) を感染させた。recVac-EGFP は以前に作製した薬剤選択カセットが除去された完成型と、カセットを含む中間型を用いた。結果より、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加することで、中間型ウイルスの増殖は阻害するが、完成型ウイルスの増殖は阻害しないことが明らかとなった (図 3)。この時、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加したウェル内に出現したプラークを詳細に観察すると、中間型ウイルス感染細胞が発現する mCherry 遺伝子の赤色の蛍光を示すプラークの端から、完成型ウイルスが完成した細胞であることを示す赤色蛍光の発現していない EGFP の発現のみが確認されるプラークが出現していた (図 4)。これは、2-TX の選択圧によって、完成型ウイルスが選択されてきていることを示唆していると考えた。

そこで、薬剤選択カセットを含む中間型ウイルスを 2-TX 存在下で細胞に感染させた時に、完成型ウイルスが選択されてくるかを実際に検討した。前の検討実験より得られた結果をもとに、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加し、そこに中間型ウイルスを感染させて 5 日間培養を行った。対照として MPA を添加したウェル、または薬剤を添加していないウェルも用意した (図 5)。感染細胞で発現している蛍光遺伝子を LED トランスイルミネーター上で確認すると、MPA 添加、または薬剤未添加のウェルでは、中間型ウイルスが発現している mCherry の赤色蛍光と EGFP の緑色蛍光が混ざったオレンジ色のプラークが多数を占めていたのに対して、2-TX を添加したウェルでは EGFP の蛍光が多数を占めていた (図 5A)。より定量的に観察するために、ウェルに含まれる、それぞれのウイルス量をプラーク

アッセイにより測定し、その割合を確認した。すると、やはり 2-TX 添加ウェル内では EGFP のみを発現している完成型ウイルスの割合が約 80% を占めていた (図 5B)。以上により、これまでに確立した、recVac 作製システムに負の選択システムを導入した改良型のシステムの確立が出来た。recVac 作製時間の律速の 1 つであった recVac 選択カセットが脱落を、2-TX によって人為的に促進することが可能となった。これにより recVac 作製のスピードアップにつながると考えている。

E. 結論

本研究により、薬剤を用いて選択圧をかけることで、recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する「負の選択システム」を組み込んだ改良版 recVac 作製システムを確立した。

本法を用いて実際に組換えウイルスを作製している。現時点で、タンパク質発現の確認できた組換えウイルスワクチニアウイルスは □B5R (B5R 領域完全欠損ウイルス) EGFP そしてワクチン開発のために行っている、LCMV (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス) の NP, Z, GPC, 更に SFTSV (重症熱性血小板減少症候群) の NP, GPC 発現ウイルスである。引き続き組換えワクチニアウイルスの作製を行い、研究を進展させたい。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口 怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島 昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクチニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクチニアウイルス作出システムの確立. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

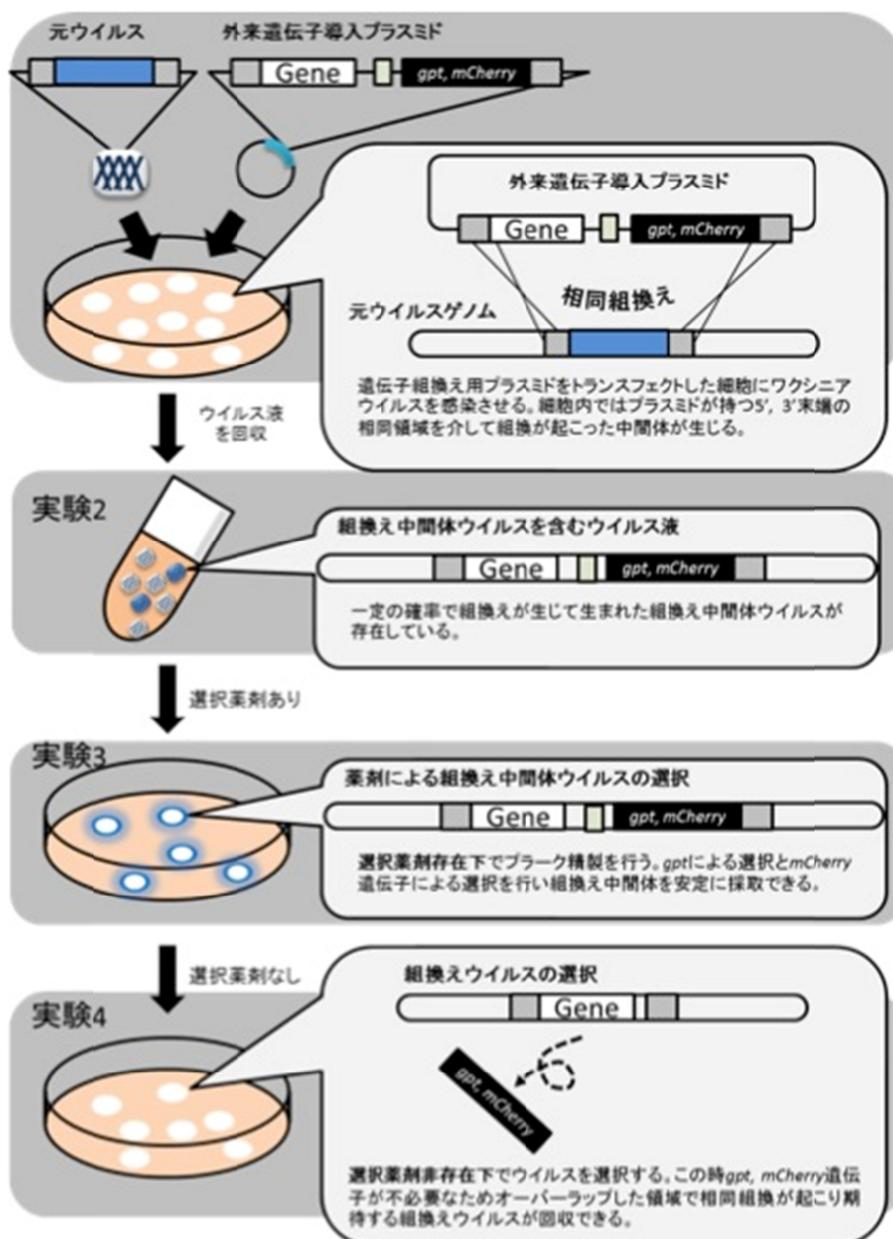


図1. 組換えワクチニアウイルス作製の概略.

Positive or Negative Selection by XGPRT

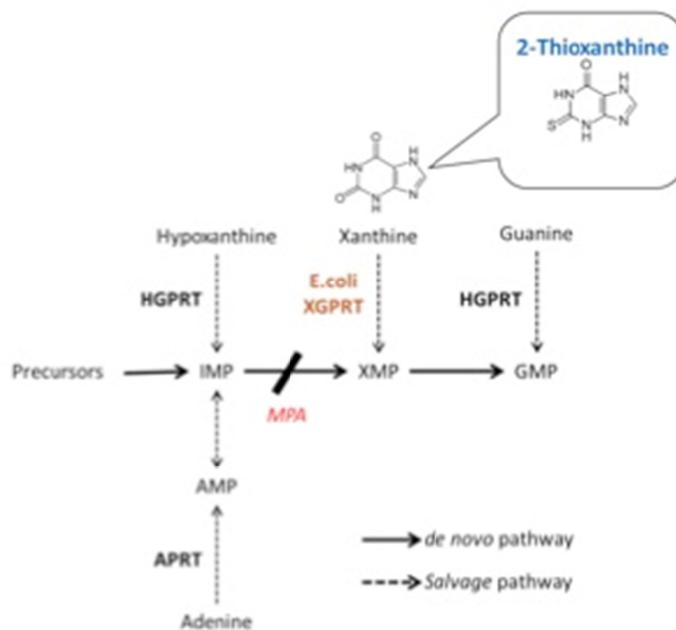
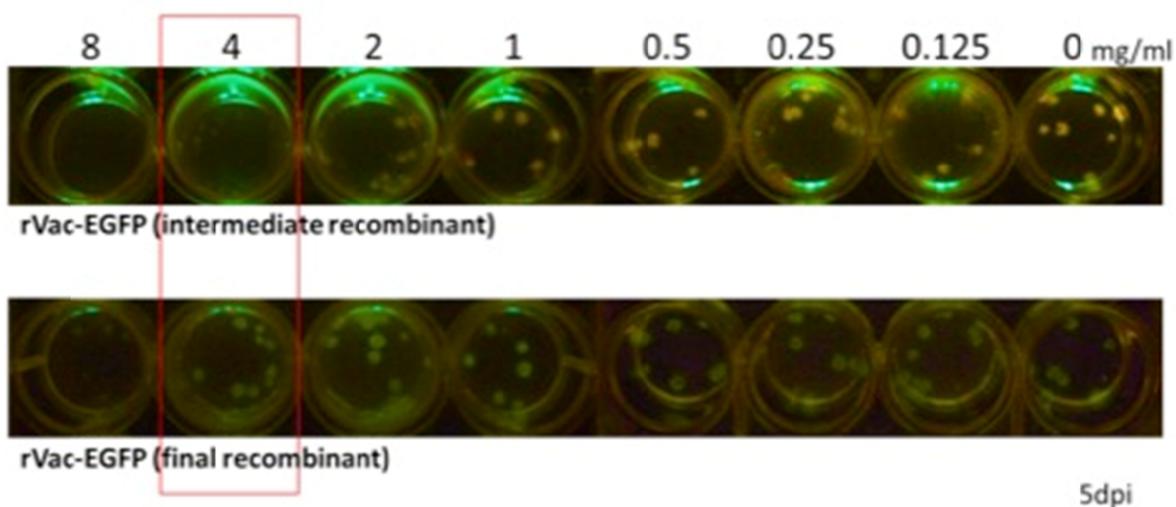


図 2 .ミコフェノール酸(MPA),キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(XGPRT)及び2-チオキサンチンの生体内プリン合成系への関与.

Determination The Dosage of 2-Thioxanthine



5dpi

図 3 . 2-チオキサンチンの至適濃度の検討.

Effect of 2-Thioxanthine

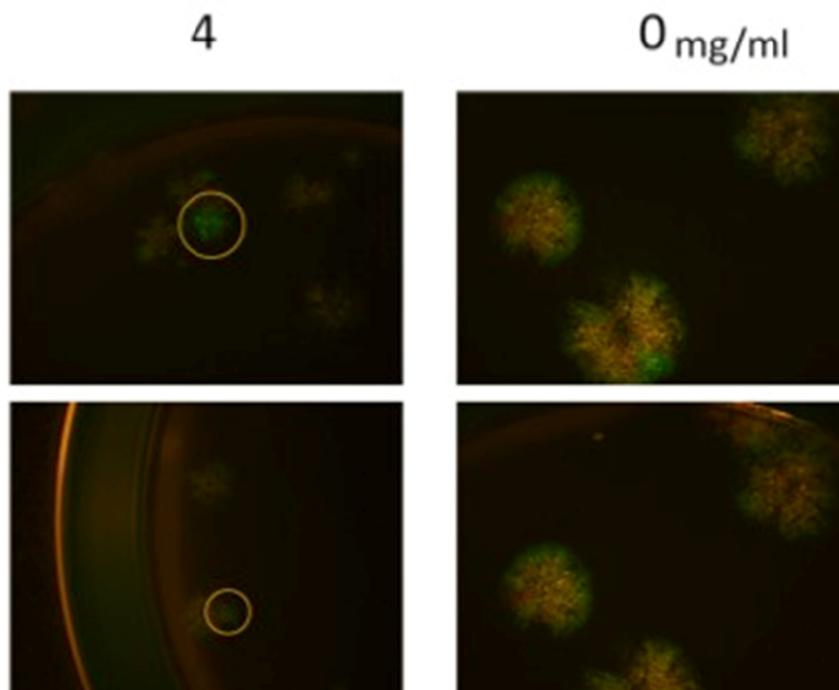


図 4 . 完成型ウイルスが完成した細胞であることを示す , EGFP の発現のみが確認されるプラークの出現 .

Performance of The Negative Selection

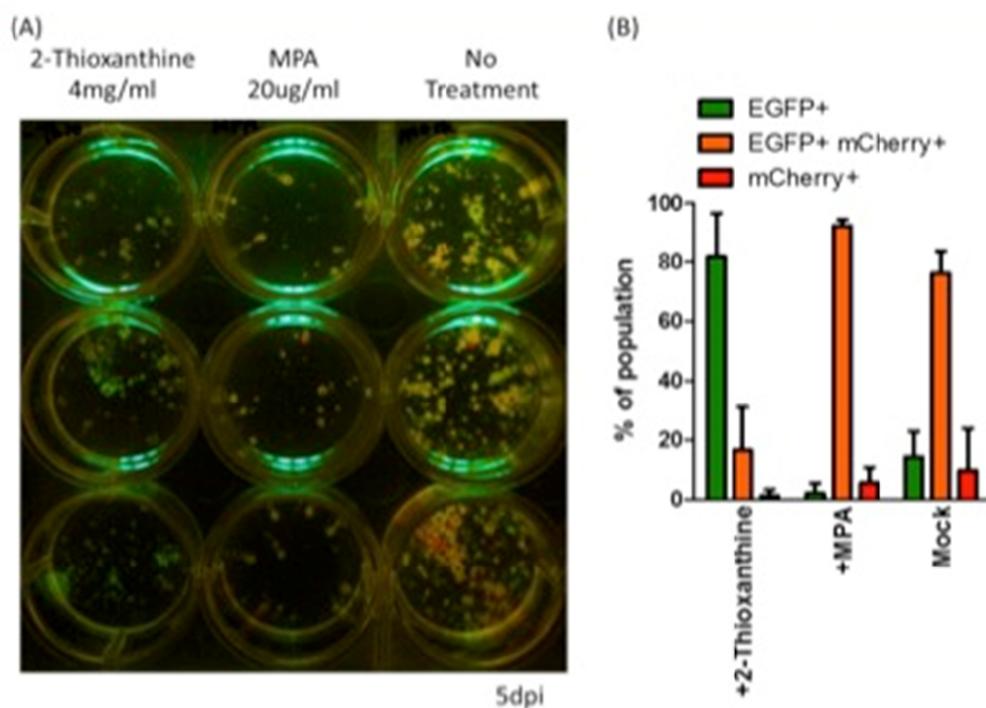


図 5 . 薬剤選択カセットを含む中間型ウイルスを 2-TX 存在下で細胞に感染させた , 「負の選択」時の , 完成型ウイルスが選択されてくるか否かの検討 .