

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）
（分担）研究報告書

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

結核菌抗原遺伝子組み込みパラインフルエンザ2型ウイルスの作製

分担研究者 野阪 哲哉 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 教授
河野 光雄 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 講師

研究要旨 安全性の高い結核ワクチンとして、2種の結核抗原遺伝子を搭載した遺伝子欠損型ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)を作製し、さらにその増殖能等について検討した。

A. 研究目的

パラミクソウイルスでは、RNAポリメラーゼ(pol)遺伝子の特異的領域で、転写の時にゲノムにないグアニン(G)塩基が挿入されるRNA-editingが起こる。hPIV2 RNA-editingにおいて、Gが2個挿入されたmRNAはpol蛋白をコードし、一方、ゲノムから正確に読まれたmRNAは免疫抑制(IS)蛋白をコードしている。結果、RNA-editing siteまでは共通のN末端を所有し、特異的なC末端を持つ2つの蛋白が翻訳される。我々は、これまでにhPIV2が産生するIS蛋白には、STAT蛋白を減少させインターフェロンの産生を阻害する機能があり、それ故hPIV2はインターフェロン抵抗性を持ち、さらに、このIS蛋白の特異的領域が、ウイルスの粒子形成にも関与していることを確認した。そこで本年度は、抗原性が高いと考えられる半増殖(self-inactive)型の結核ワクチンベクターを完成させるために、IS蛋白特異的領域をコードする領域内において、ポリメラーゼ蛋白のアミノ酸に変異を起こさないようなストップコドン挿入可能部位全てにストップコドンを挿入し、IS蛋白のC末端領域を短くすることにより、どの位置においてインターフェロン活性阻害が起こらなくなるか、つまりhPIV2がインターフェロン感受性になるかを調べた。また、IS蛋白のC末端の長さの違うそれぞれのウイルスの増殖曲線を作製し、ウイルス増殖に関するこの蛋白のC末端領域の機能とこのIS蛋白発現細胞におけるウイルス増殖への影響を検討した。

一方、hPIV2のエンベロープ(env)蛋白は、hPIV2の細胞への吸着およびウイルス粒子の放出に関与しており、この遺伝子を取り除くことによって非感染性で安全性の高い完全なる非増殖型結核ワクチンベクターが創生できる。そこで本年度は、昨年度ま

でに作製できなかった2種の結核抗原を搭載したhPIV2-env欠損型ベクターの作製およびそのenv蛋白発現細胞を用いたウイルス増殖について検討した。

B. 研究方法

（組換えウイルス産生用コンストラクトの作製）

2 step-PCR法を用いてIS特異的領域にストップコドンを挿入し、4種のhPIV2 IS系コンストラクトを作製した。同様の手法を用いてenv遺伝子を完全に欠損させたhPIV2 envコンストラクトを作製し、それぞれのベクターのNotIサイトに2種の結核抗原遺伝子ならびにEGFP遺伝子を挿入し、結核ワクチンベクターコンストラクトを完成させた。

（組換えウイルスの作製）

hPIV2ゲノムを含む4種のプラスミドDNA (p hPIV2, 10.25 μ g ; NP, 1.25 μ g ; P, 0.25 μ g ; L, 1.25 μ g) をDNA: ViaFect (1:5) で、BSRT7/5細胞(6well)にトランスフェクトし、Vero細胞との共培養により組換えウイルスならびにRNAレプリコン細胞を作製した。さらに、hPIV2 env系ウイルスについては、RNAレプリコン細胞とenv発現Vero細胞（日本ビーシージーより供与）の共培養により作製した。

（倫理面への配慮）

本分担研究は、ベクター産生のための基礎研究の段階であり、臨床検体も扱わないが、ヒトへの投与などを計画する場合は、事前に三重大学の研究倫理審査委員会からの承認を得る予定である。また、関連共同実験である臨床検体を用いた疫学的解析実験に関しては、すでに三重大学の研究倫理

審査委員会の承認を得ている（乳幼児の上気道炎・下気道炎におけるパラインフルエンザ2型ウイルス感染の探索、承認No 2325；成人健常者におけるパラインフルエンザ2型ウイルス抗体の探索、承認No 2319）。組換えDNA実験委員会の機関内承認（医-623(変1)、医-626(変2)）および大臣確認(26受文科振第346号、26受文科振第2002号)も得られている。動物実験に際しては三重大学動物実験規約を遵守し、事前に詳細な実験計画を申請する。

C. 研究結果

当初計画していたpol遺伝子セパレート型のウイルス回収はできなかった。そこで、研究目的にも示したようにIS蛋白特異的領域において、pol蛋白のアミノ酸に変異を起こさないようなストップコドン挿入可能部位にストップコドンを挿入し、IS蛋白のC末端翻訳領域を欠損させることにより、異なる特異的C末端をもつ4種のhPIV2 IS-stop系ベクターコンストラクトおよび2種の結核抗原を搭載した結核ワクチンを創生した（図1-3）。

また、昨年度、回収できなかった結核抗原を搭載したhPIV2 env系ワクチンについても、日本ビーシーより供与されたenv発現細胞を用い、長期間培養を行うことでウイルス産生が確認できた（図4、5）。

D. 考察

以上の結果は、本分担研究が概ね順調に進んでいることを示す。目的としていた結核抗原搭載のself-inactive型ワクチンベクター4種の中で、低収量が予想された最もC末端の短い結核ワクチンベクターにおいても、ウイルス増殖に無血清培地で培養した欠失タンパク(IS)発現Vero細胞（日本ビーシーより供与）を用いることで、 1×10^6 – 7 (TCID₅₀/ml)程度のウイルス回収ができたことので今後の展望が開けた。また、env欠損型結核ワクチンの中でTh1誘導遺伝子を搭載したワクチンについては、濃縮後に 10^7 (TCID₅₀/ml)以上のウイルスタイトルをReal time-PCRを用いて確認しており、問題は無いと考えるが、4種の結核抗原を連結した遺伝子搭載のワクチンについては、ウイルス産生のみ確認であり、ウイルスの収量アップが今後の課題である。

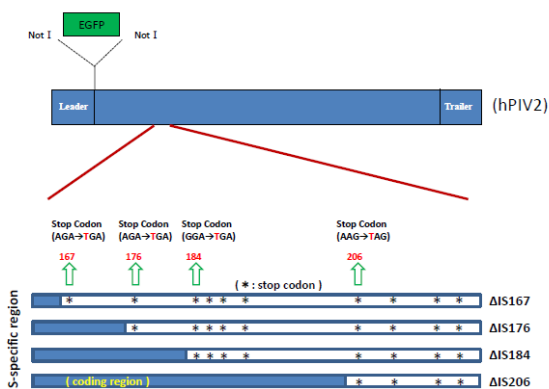


図1. Self-inactive型hPIV2ΔIS-stop

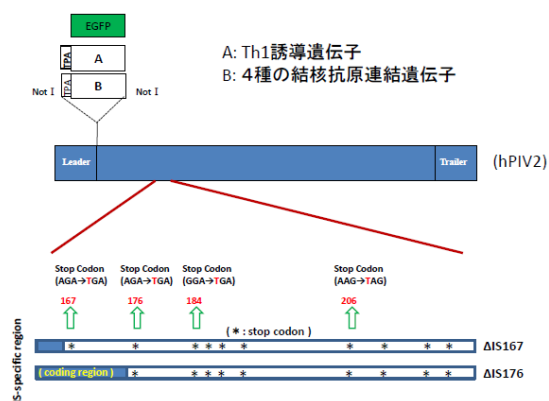


図2. 結核抗原を搭載したSelf-inactive型hPIV2ΔIS-stop

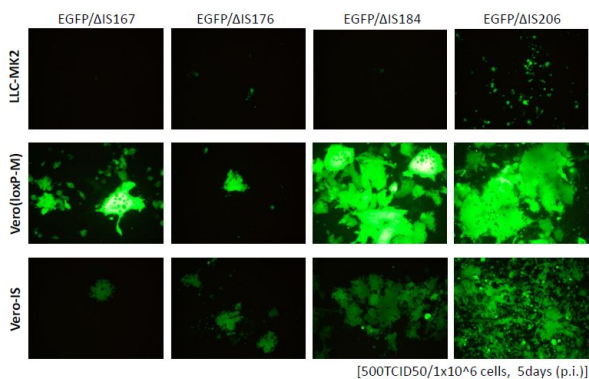


図3. 各種細胞でのSelf-inactive型hPIV2ΔIS-stopの増殖

E. 結論

本年度の目標であった免疫抑制蛋白の一部ならびにエンベロープ蛋白発現を欠失させたhPIV2ベクターを作製し、2種の結核抗原を発現するそれぞれの結核ワクチンを創生した。

F. 健康危険情報

該当せず。

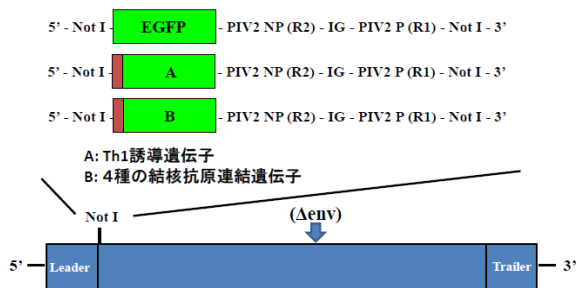


図4. 結核抗原を搭載したhPIV2Δenv

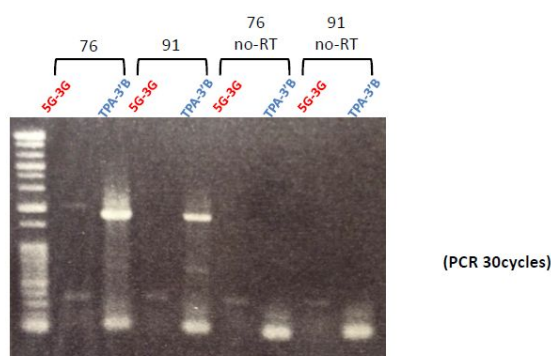


図5. B/Δenv (env-Vero 76・91系)のRT-PCRによる同定

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 32: 1727-1735, 2014.

Ohtsuka J, Fukumura M, Tsurudome M, Hara K, Nishio M, Kawano M, Nosaka T. Vero/BC-F: an efficient packaging cell line stably expressing F protein to generate single round-infectious human parainfluenza virus type 2 vector. *Gene Ther* 21:775-784, 2014.

Kihira S, Uematsu J, Kawano M, Itoh A, Ookohchi A, Satoh S, Maeda Y, Sakai K, Yamamoto H, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H. Ribavirin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication in vitro. *Microbiol Immunol* 58: 628-635, 2014.

2. 学会発表

Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, Imai H, Yokoe K, Ono R, Nosaka T, Katayama N. Expression of LMO3 and SNAP25 in diffuse large B-cell lymphoma cells and its relation to clinical features. 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 12/6-9, 2014. San Francisco.

鶴留雅人、伊藤守弘、大塚順平、駒田洋、西尾真智子、野阪哲哉. パラインフルエンザウイルスのHNとFの機能的相互作用の分子機構：Fとの相互作用におけるHNのHead領域の役割. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 11/10-12, 2014. 横浜.

Ono R, Masuya M, Katayama N, Nosaka T. Analysis of novel molecular mechanisms leading to an aberrant self-renewal by Plzf in leukemogenesis. 第76回日本血液学会学術集会 10/31-11/2, 2014. 大阪.

Nagatake T, Matsumoto N, Shimojoui M, Suzuki H, Fukuyama S, Sato S, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Kiyono H, Yasutomi Y, Kunisawa J. Immunological diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine. 第8回次世代アジュバント研究会 1/20, 2015. 豊中.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし