

遺伝子導入細胞の作製と最適なウイルス増殖法の開発

研究分担者 松尾 和浩 日本 BCG 研究所 研究第一部長

研究要旨 ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) の HN 遺伝子欠損型ウイルスベクターを効率よく産生する方法を検討した。前年度に樹立した Vero 細胞クローンに hPIV2 の HN 遺伝子発現ベクターを導入し、トランスフェクタントのクローニングを再度行った。PCR 法により全長の HN 遺伝子を保持しているクローンを選択し、95 クローン中 61 個の PCR 陽性クローンを得た。59 クローンについて、hPIV2 Δ HN-EGFP ウイルスの感染・増殖を蛍光顕微鏡で観察することにより、高生産株 7 クローンを得た。これらのクローンでの HN 蛋白質発現を間接蛍光抗体法で調べたところ、HN 発現レベルとウイルス生産性に相関が認められた。この内の 5 クローンでは、hPIV2 Δ HN-EGFP のタイターが 10^7 TCID₅₀ に達しており、ほぼ実用化可能なレベルと考えられる。今後、樹立した Vero/HN クローンの安定性、結核抗原遺伝子導入組換えウイルス生産量の評価、高生産法の検討を行っていく予定である。

A. 研究目的

世界で今なお結核患者は年間約 900 万人以上発生し、約 150 万人が死亡している (WHO Global tuberculosis report 2013)。本邦においても、年間 2 万人以上が新たに結核患者として登録され、2000 人以上が死亡しており (2013 年結核年報: 結核予防会結核研究所) 感染症の中では最大の死亡原因となっている。現在結核菌に対する唯一のワクチンとして用いられている BCG は、小児の結核性髄膜炎や粟粒結核等には効果があるものの、成人肺結核には効果が低いと言われており、新しい結核ワクチンの開発が急務となっている。

ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) は、ヒトの呼吸器粘膜に感染性を示す病原性の低いウイルスである。我々は既に、抗酸菌由来 Ag85B 抗原遺伝子を組み込んだ hPIV2 をマウスに経鼻接種し、BCG 以上に肺での結核菌増殖を抑制することを報告した。また通常の遺伝子組換えウイルスワクチンと異なり、頻回接種によるベクターウイルスに対する反応もなく、強い免疫反応を誘導することがカニクイザルによって示されている。本研究の目的は、hPIV2 ベクター技術を応用し、結核感染をコントロールできる安全性の高い新規ワクチンを開発することにある。本分担研究は、そのためのワクチン製造法開発に関わるものである。

チンを開発することにある。本分担研究は、そのためのワクチン製造法開発に関わるものである。

昨年度より、ウイルスベクターの安全性を担保するために、遺伝子欠損型の非複製型ウイルスを生産するためのパッケージング細胞の構築を行っており、V 遺伝子発現 Vero 細胞の樹立については既に報告した。今年度は、hPIV2 の HN 遺伝子を安定に発現する Vero 細胞株を樹立し、組換えウイルスを高生産できる系の開発を目的とした。

B. 研究方法

(1) 細胞および培地

ワクチン産生用に使用する細胞は、医薬基盤研究所より分与された Vero 細胞からクローニングした細胞を用いた。培地は、無血清培地 OptiPRO SFM (Life technologies)、細胞の回収は、細胞剥離剤 TrypLE Express (Life technologies) を用いた。培養培地には抗生物質としてペニシリン・ストレプトマイシンを添加し、37℃、5%CO₂ 下で培養した。細胞凍結保存液として、セルバンカー-2 (血清不含、日本全薬工業(株)) を用いて -80℃ にて凍結保存した。

(2) トランスフェクション

遺伝子導入には、前年度に構築したHN発現ベクター-pCXneoHNを用いた。6 穴プレートに2.0-5.0 x 10⁵/well の濃度でVero 細胞をまき、24 時間後にプラスミドベクター5.0 μg と Lipofectamine 2000 (Life technologies) 30 μl の割合で500 μl のOptiPRO SFM中で混合し、室温で20 分間反応させた溶液を各wellに加えてトランスフェクトした。

(3) 組換えVero 細胞のクローニング

トランスフェクション24 時間後の細胞を回収し、10cm ディッシュに継代する。継代24時間後に培地を捨て、G418 (0.75 mg/ml) 含有 OptiPRO SFM に交換する。3-4日毎に培地交換を行い、2-3週間後、顕微鏡で細胞コロニーが確認できたら、他のコロニーと十分に離れたコロニーを選び、コロニーを囲むようにディッシュの底にマジックでマークする。培地を除き、PBSで洗浄した後、クローニングシリンダー及び細胞剥離剤を用いて各コロニーを回収した後、24 穴プレート、6 穴プレート及び10cm ディッシュと継代していくことで段階的にスケールアップを行い、最終的に凍結細胞ストックを作製した。

(4) Nested PCRによる導入遺伝子の検出

hPIV2のHN遺伝子をネオマイシン耐性下で導入したVero細胞由来ゲノムDNAは、細胞継代時に微量をサンプリングしてInstaGene DNA精製マトリックス (Bio-Rad社製) を用いて抽出した。これを1st PCRのDNAテンプレートとする。VまたはHN遺伝子検出に用いたPCRプライマーセットは以下の配列を持つ。

1st sense primer:

TCGGCTTCTGGCGTGTGACC

1st antisense primer:

GCCCTCCCATATGTCTTCCGAG

Nested sense primer:

CTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTC

Nested antisense primer:

GGCAGAGGGAAAAAGATCTCAGTGGT

1st PCRは、94 /5分、[94 /30秒、68 /30秒、72 /1分 (V) 又は2分 (HN)] x 35サイクル、72 /5分で行った。Nested PCRは、1st PCR産物の1/50量をテンプレートにして94 /5分、[94 /30秒、66 /30秒、72 /1分 (V) 又は2分 (HN)] x 35サイクル、72 /5分で行った。

また、ネオマイシン耐性遺伝子も同様にNested PCRにて確認を行った。プライマーセットは以下の通りである。

1st sense primer:

GTATCCGCTCATGAGACAATCG

1st antisense primer:

AAGAACTCCAGCATGAGATCCC

Nested sense primer:

CAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCCG

Nested antisense primer:

ACGATTCCGAAGCCCAACCTT

1st PCRは、94 /5分、[94 /30秒、66 /30秒、72 /1分] x 35サイクル、72 /5分で行った。Nested PCRは、1st PCR産物の1/50量をテンプレートにして94 /5分、[94 /30秒、66 /30秒、72 /1分] x 35サイクル、72 /5分で行った。

(5) hPIV2ΔHN-EGFPウイルスタイター測定

Vero/HN 各株を24 穴プレート (コーニング社製) に1.5 x 10⁵/well で継代し、24 時間後にrPIV2 HN-EGFP を感染多重度 (moi) 0.1 で感染させる。感染3 時間後、ウイルス液を除いてOptiPRO SFM で洗浄した後、G418 含有 OptiPRO SFM を加えて培養を開始する。感染4 日後に培養上清を全て回収し、新しいG418 含有OptiPRO SFM を加える。同様の操作を感染後7、11 日後にも行う。14 日目に細胞及び培養上清を回収し、0-4、4-7、7-11 及び11-14 日の間に培養上清中に産生された感染性ウイルス量をTCID₅₀ 法で測定した。

(6) 間接蛍光抗体法

Vero/HN 各株を8 穴チャンパープレート (ibidi 社製) に2.0 x 10⁵/well で継代し、24 ~ 48時間培養する。細胞がコンフルエントにな

ったのを確認して1度PBSで洗浄する。4%パラホルムアルデヒド/PBSを加えて室温で20分間固定した後、PBSで3回洗浄する。0.25% TritonX-100を加えて室温で10分間、膜透過した後、PBSで3回洗浄する。(細胞表面を染色する場合はこの処理は不要) マウス抗HN抗体(M1-1A、三重大より分与)を加えて室温で1時間反応させた後、PBSで3回洗浄する。Alexa Fluor 標識したヤギ抗マウスIgG抗体(abcam社製)をPBSで400倍希釈した溶液を加えて室温で1時間反応させた後、PBSで3回洗浄し、80% glycerol/PBSで封入して蛍光顕微鏡で観察した。

(7) 倫理面への配慮

遺伝子組換え体の第二種使用における拡散防止措置については、日本BCG研究所の機関承認済みである。

C. 研究結果

(1) HN 遺伝子導入 Vero 細胞のクローニングと PCR による一次スクリーニング

HN抗原発現ベクター-pCXneo-HNの導入遺伝子の発現を確認するため、Vero 細胞にトランスフェクションし、G418 selectionによるクローニングを行った。次いで前年度に確立したNested PCR 法により、全長のHN遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の両方が検出できるクローンをスクリーニングした(図1)。95個中61個(64%)のPCR陽性クローンが得られた。昨年度に行った1回目のスクリーニングでは、13/55(24%)であったので、効率が格段に改善された。

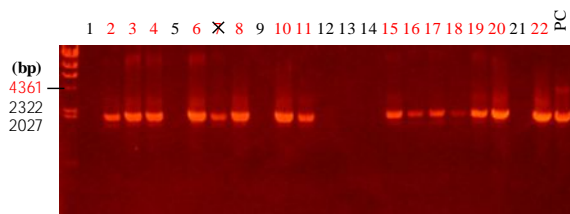


図1 Nested PCRによるHN遺伝子の検出例

(2) rPIV2 HN-EGFP感染を利用した二次スクリーニング

PCRにてHN遺伝子導入が確認されたVero/HN

候補株61株の凍結細胞を融解し、培養を行ったところ、2株の増殖が悪かったため、残り59株の培養を行い、rPIV2 HN-EGFPを感染させた。その結果、59株中25株で感染後のGFPの増加が認められ(図2)、培養上清中への感染性ウイルスの産生が確認された(data not shown)。しかしながら、株間で周囲の細胞へのGFPの広がりには差があり、また上清中への感染性ウイルス産生量にもばらつきがあったため、株によってrPIV2 HN-EGFPの産生量が異なることが示唆された。

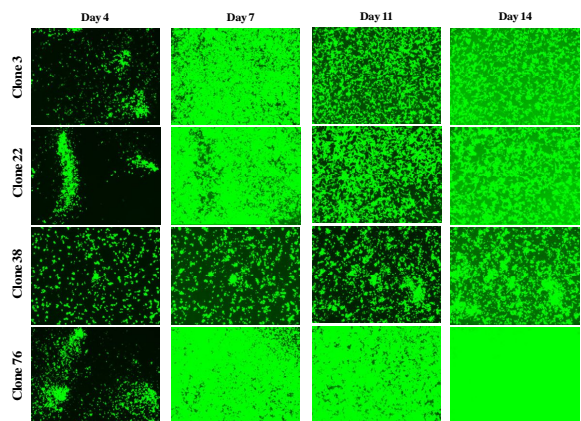


図2 EGFP発現を指標にしたHN発現Vero細胞クローンの選択

(3) Vero/HN 株のウイルス産生能の評価

rPIV2 HN-EGFPの産生が確認された25株を用いてウイルス産生量の比較を行った。即ち、Vero/HNにrPIV2 HN-EGFPをmoi=0.1で感染させ、各培養期間の培養上清を回収して各々の培養期間中のウイルス産生量を測定した。その結果、株によって感染性ウイルスの産生量に差があることが確認され、クローン3、4、10、22、77、91及び76が非常に効率良く感染性ウイルスを培養上清中に産生していることがわかった(図3)。

上記7株に、生育が遅くスクリーニングが遅れたクローン73を加えた8株を用いて、培養上清中のrPIV2 HN-EGFPウイルス量の経時変化を調べた結果、4、22、76、77、91の5クローンで、培養7日以内に 10^7 TCID₅₀/mL以上という、実用化可能なレベルのタイターに達していることがわかった(図4)。

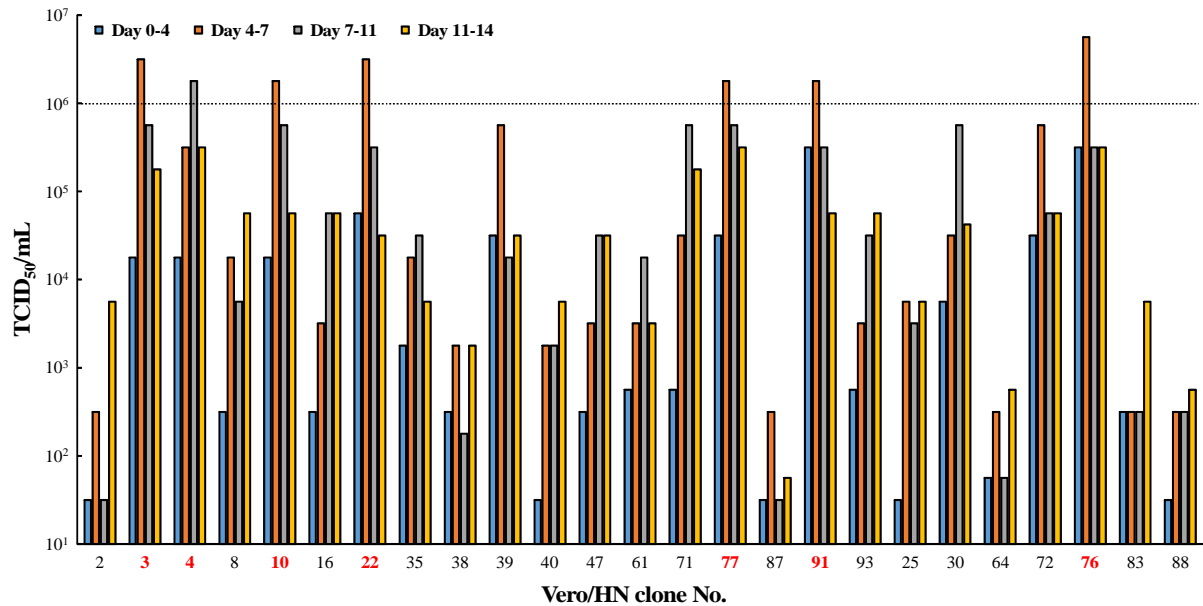


図3 候補株 25 クローンでの rhPIV2 HN-EGFP 産生能比較

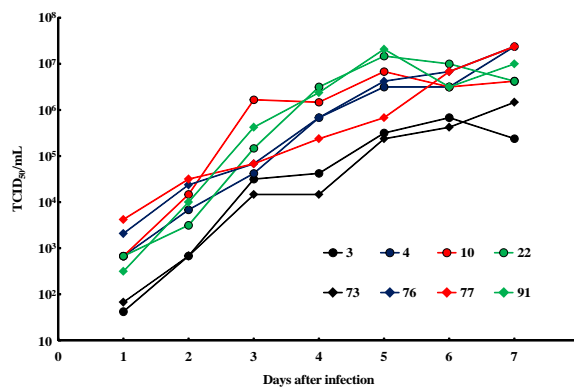


図4 rhPIV2 HN-EGFP タイトーの経時変化

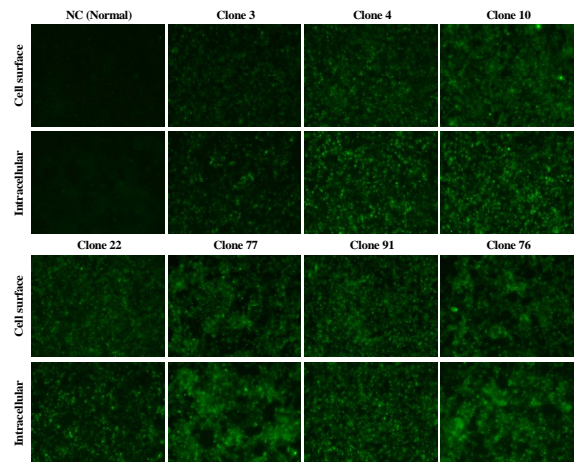


図5 間接蛍光抗体法によるHN蛋白質の検出

(4) Vero/HN 株の免疫蛍光染色によるHN 抗原の発現

効率的に感染性ウイルスを産生したVero/HN の7 株におけるHN 抗原の発現を確認するため、細胞表面及び細胞内を抗HN 抗体で免疫蛍光染色した。その結果、いずれのクローンでも細胞表面、細胞内ともにHN 抗原の発現が確認された。ウイルス産生量が低かったクローン3でのHN発現レベルが若干低かったが、高生産性クローン間でのHN発現に顕著な差は認められなかった(図5)。

D. 考察

今回、rPIV2 HN 株を効率的に産生可能な組換えVero 細胞クローンが得られたが、これは

pCXneoHN発現ベクターをVero 細胞に導入する際の、トランスフェクション試薬を前回のFugeneからLipofectamine 2000に変更することにより、HN遺伝子導入効率が向上したことによると考えられる。これにより、PCR陽性クローン取得率が格段に向上すると同時に、HN発現レベルも上昇したクローンを得ることができた。各クローンでのrPIV2 HN-EGFPウイルスタイターは、HN発現が弱い領域ではその発現レベルとの相関が見られるが、発現が強い株間では相関が見られないことから、ある発現レベル以上では、ウイルス産生に差がないものと考えられる。

E. 結論

HN 遺伝子導入 Vero 細胞のクローニングを行い、PCR および rhPIV2 HN-EGFP 増殖性を指標にスクリーニングすることにより、ウイルス高生産株を 7 クローン得ることができた。最も高い生産性を示したクローンでは、 10^7 TCID₅₀/mL 以上のタイターが得られており、実用化可能なレベルに達していると思われる。今後、樹立した細胞を用いて、実際に結核菌抗原遺伝子が組み込まれた HN ウイルスをラボスケールで製造し、サルでの実験等に供給することが急務である。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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(15):1727-35 (2014).

(2) Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K, Yasutomi Y. Effects of mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. *PLoS One* 9(9):e106807 (2014).

2. 学会発表

(1) 水野悟、加藤誠一、相馬祥吾、保富康宏、松尾和浩. 新規結核ワクチン候補: SOCS1 アンタゴニスト発現型組換え BCG の評価. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会, 2014 年, 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし