

201447008A

厚生労働科学研究委託費
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発研究事業

迅速な製造が可能な新型インフルエンザワクチンの
開発技術に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 信澤 枝里
平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）による委託業務として、信澤枝里が実施した平成26年度「迅速な製造が可能な新型インフルエンザワクチンの開発技術に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

迅速な製造が可能な新型インフルエンザワクチンの開発技術に関する研究 信澤枝里	P1
---	----

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 最適ワクチン株選定系の技術開発 信澤枝里	P7
2. 高増殖株開発 鈴木康司	P9
3. 高タンパク(HA)収量株の開発に関する研究 森川裕子	P13
4. 低変異率母体ウイルス株の開発 内藤忠相	P19
5. ワクチンによる効果的免疫誘導系の開発 高橋宜聖	P23

III. 学会等発表実績 P27

IV. 研究成果の刊行物・別刷

- ◇ The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. Journal of Virology May 2014
- ◇ Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts. Journal of Virology Sep. 2014
- ◇ Amino acid substitutions in PB1 of avian influenza viruses influence pathogenicity and transmissibility in chickens. Journal of Virology Oct. 2014
- ◇ Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. Journal of Virology Nov. 2014

I. 総括

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発研究
事業）

委託業務成果報告（総括）

迅速な製造が可能な新型インフルエンザワクチンの
開発技術に関する研究

業務主任者 信澤枝里 国立感染症研究所・室長

研究要旨 インフルエンザのパンデミック発生時に、迅速かつ十分量のワクチン供給を可能にするため、平成 26 年度は、(1)細胞培養ワクチン株作製用高増殖母体ウイルスを開発し、その有用性を確認した。この母体ウイルスの使用により高増殖細胞培養新型インフルエンザワクチン株の作製が可能になる。(2)ワクチン株には、高増殖性のほか、高蛋白質収量を示す事が求められる。高蛋白質収量に関わる要因を明らかにするため、蛋白質収量が低い事が指摘されていた A/(H1N1)pdm09 ウイルスの解析を行なった。その結果、細胞内での HA/NA の発現量や形質膜への細胞内輸送効率の低い原因が HA/NA の相互作用にある事を明らかにし、これが低蛋白質収量を引き起こしている事が示唆された。(3)抗原変異しにくいワクチン株開発のため、複製の忠実性に関与するポリメラーゼ PB1 上の部位を同定したが、高増殖かつ低変異株の作出には至らなかった。(4)抗原変異株に有効な免疫を賦与できるワクチン株開発のため、異なる HA に対し交差結合性を示す抗体産生 B 細胞の検出系を確立し、実際に交差結合性抗体産生 B 細胞を同定した。さらにその抗体が HA2 stem 領域を示すことを明らかにした。

研究統括：信澤枝里 国立感染症研究所
室長

最適ワクチン株選定系の技術開発：

信澤枝里 国立感染症研究所・室長

高タンパク(HA)収量株の開発研究：

森川裕子 北里大学北里生命科学研究
所・教授

ワクチンによる効果的免疫誘導系の開発：

高橋宜聖 国立感染症研究所・室長

低変異率母体ウイルス株の開発：内藤忠相
川崎医科大学・助教

高増殖株開発：鈴木康司 国立感染症研究
所・研究員

A. 研究目的

本研究では、迅速かつ十分量のワクチン供給および効果的な免疫賦与を可能にするワクチン種株構築系を確立し、インフルエンザのパンデミック発生時に、公衆衛生上の被害を最小限に留めることを目的とす

る。今年度の目標を以下に記す。インフルエンザワクチン株の培養には従来、鶏卵培養法が用いられてきた。しかし、鶏卵培養ワクチン株では、パンデミック発生時に、ワクチンの製造量が鶏卵の供給数に制限されるという問題があり、現在、細胞培養ワクチン株への切り替えが検討されている。ワクチン株は、通常、高増殖性を示すことが必要である。そのため、鶏卵培養ワクチン株としては、主に、高増殖母体ウイルスと野生株とのリアソータントウイルスが、使用されてきた。一方、細胞培養ワクチン株に関しては、現時点で有用な高増殖母体ウイルスの開発は進んでいない。そこで、高増殖細胞培養ワクチン株開発のため、ワクチン株作製用高増殖母体ウイルスの開発を目標とした。また、野生株のうち、細胞/鶏卵いずれかの培養系上のレセプターに高親和性を示す株からワクチン株を作製することで、作製後のワクチン株が高

増殖性を示す確率は上がる。そこで、培養系上のレセプター構造を明らかにし、それに結合するウイルスを選択する系を確立するため、細胞上のレセプター構造の解析を目標とした。一方、高増殖性の他、ワクチン株には高蛋白質(HA)収量を示すことが求められる。A(H1N1)pdm09 のワクチン株は、蛋白質収量が低い事が指摘されてきた。そこで、A(H1N1)pdm09 ワクチン株と収量の高い A/PR/8/34 株の HA/NA を用いて、細胞内発現、細胞内輸送効率の観点から比較し、蛋白質収量を左右するウイルス側の要因を明らかにする事を目標とした。鶏卵培養ワクチン株では、継代培養中に HA の抗原領域に変異が入る事があり、改善が求められている。そこで、ワクチン株増殖中の変異導入率を低下させるため、ウイルス遺伝子複製時に、親ウイルスの遺伝子を忠実に複製できるポリメラーゼを単離する事を目標とした。インフルエンザウイルスは、毎年のように抗原変異するため、前シーズンの流行時に選定されたワクチン株の抗原性が、ワクチン使用時の流行株のそれと一致する保証はない。そこで、ワクチン株と抗原性が必ずしも一致しないウイルスに対しても有効な免疫を賦与できるワクチン株と免疫条件を同定するため、まず、交差結合性に優れた B 細胞の検出系を確立する事を目標とした。

B. 研究方法

(1)高増殖株開発

高増殖母体ウイルス開発：

・ウイルスは A/PR/8/34 株、細胞はワクチン製造用に品質管理された NIID-MDCK 細胞を用いた。

・高増殖株を得るため、NIID-MDCK 細胞で A/PR/8/34 株を 20 代継代し、その純化には、プラーク形成法を用いた。

・細胞培養ワクチン株としてのリアソータントウイルスの作製は、高増殖母体ウイルスを用いた Reverse genetics(RG)法(ウイスコンシン大学河岡義裕博士より分与)により行った。

・ワクチン株候補ウイルスの作製には、

A/Anhui/1/2014(H7N9)を用いた。

最適ワクチン株選定系の技術開発

・三次元 HPLC マップ法により細胞培養ワクチン株増殖用 MDCK 細胞のシアリル糖鎖構造を明らかにした。

(2)高蛋白質(HA)収量株の開発：

・蛋白質(HA)収量が高い A/PR8/34 株、及び、蛋白質(HA)収量が低いことが知られている A(H1N1)pdm09 の A/California/7/2009 株の HA,NA を対象とした。

・HA/NA タンパク質の細胞内局在は、共焦点顕微鏡により観察を行った。

・脂質ラフト親和性、多量体形成に関連する、当該タンパク質上の領域の同定には、HA/NA 発現細胞の raft 画分、nonraft 画分を分画し、Blue Native PAGE, Western blotting 法により解析した。

(3) 低変異率母体ウイルス株の開発：

ポリオウイルスで同定されているポリメラーゼの忠実性を向上させるアミノ酸置換をインフルエンザウイルス PB1 の当該部位に導入したウイルスを RG 法により作製し、複製の忠実性への影響を検討した。また、最近報告されたインフルエンザウイルス H5N1 株および H3N2 株のポリメラーゼの忠実性を向上させるアミノ酸変異 (PB1-Val43Ile 置換) を現行のワクチン母体株である高増殖性 PR8 株にも導入しその影響を検討した。

(4) ワクチンによる効果的免疫誘導系の開発：

抗原変異株に有効な免疫を賦与するワクチン株と免疫方法の同定を行なった。

交差結合性細胞の検出系立ち上げのため、基礎データが豊富な H3 亜型ウイルス株を用いて検証した。H3N2 型の X-31 株、Uruguay 株で HA プローブを作製し、フローサイトメトリによる交差結合性 B 細胞の検出系を確立した。この系を用いて X-31 インフルエンザウイルスを経鼻感染させたマウス肺細胞から X-31/Uruguay 両方に結合する交差性 B 細胞を同定し、産生する抗体遺伝子のクローニング、発現により、当該交差性 B 細胞が産生する抗体の結合性を ELISA により同定した。

C. 研究結果

(1)高増殖株開発

- ・母体ウイルスの開発

A/PR8/34株をNIID-MDCK細胞で20継代した結果、ウイルス力価が 1×10^9 PFU/mLの高増殖株(HG-PR8)を得ることに成功した。HG-PR8を母体ウイルスとしたRG系を確立した。

- ・細胞培養ワクチン株の作製

HG-PR8株を用いて、RG法によりH7N9ワクチン株候補を作製した。その結果、ウイルス力価が 1×10^8 PFU/mLを示す高増殖株の作製に成功した。

最適ワクチン株選定系の技術開発

- ・細胞に含まれるN型糖鎖の一次解析を行った結果、中性糖、モノシアルル化糖、ジシアルル化糖の組成比は、それぞれ92.8, 5.1%, 2.1%であった。通常鶏卵等で観察される糖鎖とは異なり、マンノースを多く含む配列であった。

(2)高蛋白質(HA)収量株の開発：

- ・HA/NA蛋白質の多量体形成

蛋白質収量が低いとされるCApdm株の多量体形成能をA/PR8/34(PR8)株と比較した結果中性pHではHA,NAいずれも安定した多量体系性能を示した。

- ・HA/NA蛋白質の脂質ラフト親和性

CApdm株のHA/NAの脂質ラフト親和性を293テスラ細胞で調べた結果、PR8株とほぼ同程度のラフト画分/非ラフト画分への分画比を示した。

- ・HA/NA蛋白質の発現量

CApdm株とPR8株でHA/NAの発現量を比較した結果、CApdm株のHA,NAともにPR8株より低いことが確認された。このうちNAに関しては、CApdm株とPR8株でキメラNAを作製することでその発現量が回復した。

- ・HA/NA蛋白質の形質膜輸送

CApdm株のHA/NAはともに細胞内でPR8株より形質膜への輸送が遅いことを確認した。しかし、CApdmHAとPR8株NAの共発現やCApdmNA/PR8NAのキメラNAとの共発現により改善されることを明らかにした。

(3) 低変異率母体ウイルス株の開発：

- ・ポリオウイルスでポリメラーゼの複製忠実度を上げることが明らかとなっている変異K481HをPB1に導入した結果、ポリメラーゼ活性は野生型の1/10に低下した。この変異PB1を有するウイルスを作出した結果、新たな変異が導入され、この変異は、変異導入効率を上昇させる変異であった。

- ・最近報告されたインフルエンザウイルスのPB1の複製忠実度を上げる変異を導入したウイルスを作製した結果、野生株と同程度の力価を示した。

(4) ワクチンによる効果的免疫誘導系の開発：

- ・FACSによる交差結合性B細胞を検出
交差結合性B細胞検出のため、H3N2亜型のX-31株A/Uruguay/716/2004(Uruguay株)株HAをプローブとしてX-31感染マウス肺細胞中のB細胞の中にX31株のみならずUruguay株HAにも結合可能なB細胞の存在を確認した。

- ・このB細胞が産生する抗体が、確かにX-31およびUruguay株の両方に結合する交差結合性抗体を産生することを確認した。

- ・その抗体の結合領域は、通常、交差結合性を示すモノクローナル抗体が結合するHA2stem領域のペプチドに相当することが明らかとなった。

D. 考察

(1)高増殖株開発

母体ウイルスの開発

今回開発した細胞培養ワクチン株作製用母体ウイルスHG-PR8は、NIID-MDCK細胞で複数回継代後もHA、NAへのアミノ酸変異は確認されず、母体ウイルスとしての安定性を示した。また、作製したH7N9亜型ワクチン株も高増殖性を示し、HG-PR8の有用性が示された。

最適ワクチン株選定系の技術開発

MDCK細胞上のウイルスレセプターとなり得る糖鎖は、鶏卵とは異なる糖鎖構造だ

った。今後、当該構造を持つ糖鎖の合成等により、鶏卵及び細胞上のレセプターを発現した糖鎖アレイ系を開発し、培養系に適したウイルスの選択への利用を試みる。

(2) 高蛋白質(HA)収量株の開発

従来から蛋白質収量が低いとされていた CApdm 株の HA/NA で、その理由となり得る問題点を明らかにした。すなわち、CApdm 株では HA/NA の組み合わせが不適切であるためウイルスの増殖性、低い蛋白質(HA)収量を引き起こしている可能性を示唆した。ワクチン株開発に当たっては、このような不適切なウイルス抗原の組み合わせを持つウイルス株に対して、抗原性を変化させることなく高蛋白質収量を示すような HA/NA への改変を加えることの必要性が示された。

(3) 低変異率母体ウイルス株の開発

低変異ウイルス作製を目的として作製したウイルスには、複製忠実性向上のため置換した PB1 の K481H 変異に加え、忠実性を低下させる新たな変異 T82C が確認された。この変異ウイルスは、DI 粒子を多く含む可能性があり、82 位が複製に影響を及ぼす部位であることが示唆された。

(4) ワクチンによる効果的免疫誘導系の開発

近年、交差結合性を示す HA 抗体が作出されているが、本研究では、このような抗体を産生する B 細胞を高感度かつ再現性よく検出する系の構築に成功した。今後、この系を用いて、交差結合性を示す B 細胞を誘導できるワクチン株選別を効率的に行っていく。

E. 結論

(1) 高増殖株開発

品質管理された NIID-MDCK 細胞で高増殖性を示す細胞培養ワクチン株作製用母体ウイルスの開発に成功した。NIID-MDCK 細胞上のシアリル糖鎖構造は、鶏卵漿尿膜上の糖鎖とは異なることを示した。

(2) 高蛋白質(HA)収量株の開発

蛋白質収量が低い CApdm 株の HA/NA は、

多量体系性能や脂質ラフト親和性に異常は認められないが HA/NA の発現量が低いことが判明した。この低発現は NA の特定領域に起因し、その改善により HA/NA の細胞内輸送が改善されることを明らかにした。

(3) 低変異率母体ウイルス株の開発

PB1 ポリメラーゼ上の複製忠実性を示す部位は、ポリオウイルスの当該部位とは限らず、また 1 箇所以上存在することが示唆された。一方、82 位が複製の忠実性に関わる新たな部位であることを明らかにした。

(4) ワクチンによる効果的免疫誘導系の開発

交差結合性を示す抗体産生 B 細胞の検出系の確立に成功した。この系の利用により、交差防御性に優れた新型インフルエンザワクチン種株開発が促進される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, Takahashi Y, Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, Ato M, Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, Nobusawa E.* Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. (*Corresponding author) J Virol. 2014 Nov;88(21):12364-73.
- 2) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major

- role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 2014 May;88(10):5608-16.
- 3) Ohkura T, Momose F, Ichikawa R, Takeuchi K, Morikawa Y. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts. *J Virol* 88: 10039-10055, 2014.
 - 4) Suzuki Y, Uchida Y, Tanikawa T, Maeda N, Takemae N, Saito T. Amino acid substitutions in PB1 of avian influenza viruses influence pathogenicity and transmissibility in chickens. *J Virol.* 88:11130-9, 2014
2. 学会発表
- 1) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠：II型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、HA 開裂部位に MONO-basic なアミノ酸配列を持つ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
 - 2) 内藤忠相、齊藤峰輝、信澤枝里、小田切孝人、田代真人：インフルエンザウイルスのゲノム変異導入率を制御する RNA ポリメラーゼの機能領域
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10 日
 - 3) 大倉喬、百瀬文隆、市川玲子、竹内薫、森川裕子：インフルエンザウイルス HA と NA の極性輸送は脂質ラフトのクラスターリングを介して相互促進される
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10 日
 - 4) 滝沢直己、百瀬文隆、原口日和、森川裕子、野本明男：インフルエンザウイルス膜タンパク質 HA および M2 のウイルス粒子形成における機能解析
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 11 日
 - 5) 百瀬文隆、森川裕子：自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのポリシストロニック発現
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 11 日
 - 6) 百瀬文隆、森川裕子：2A 自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのポリシストロニック発現
第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 27 日
 - 7) Takahashi, Y., Ato, M., Adachi, Y.: B cell pathways for protective memory responses against influenza virus infection.
The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara (奈良、9 月)
 - 8) 高橋宜聖 ウイルス感染防御抗体と腸内細菌
日本食品免疫学会第 10 回学術大会 (東京、10 月)
 - 9) Adachi, Y., Inoue, T., Kurosaki, T., Ato, M., Takahashi, Y.: Persistent local germinal centers select cross-reactive antibody into immunological memory following influenza virus infection.
第 43 回日本免疫学会 (京都、12 月)
 - 10) Onodera, T., Adachi, T., Tsubata, T., Kurosaki, T., Adachi, Y., Ato, M., Takahashi, Y.: CD273+ memory B cells replenish bone marrow plasma cells in the steady state after influenza vaccination.
第 43 回日本免疫学会 (京都、12 月)
 - 11) Miyauchi, K., Sugimoto-Ishige, A., Takahashi, Y., Hasegawa, H., Takemori, T., Kubo, M.: Influenza A virus (IAV) vaccination effectively

induces germinal center
independent protective immunity.

第 43 回日本免疫学会総会（京都、12
月）

- 12) Adachi, T., Yoshikawa, S.,
Onodera, T., Takahashi, Y.,
Karasuyama, H.: In vivo imaging of
calcium signaling in B cells of mice
expressing the genetically encoded
YC3.60 calcium indicator. 第 43 回日
本免疫学会総会（京都、12 月）

- 13) 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宜聖、
阿戸学、小田切孝人、板村繁之：剤形
の異なるインフルエンザワクチンに
より誘導される抗体の性状に対する
TLR アゴニストの影響
第 18 回日本ワクチン学会学術集会
（福岡、12 月）

- 14) 内藤忠相、信澤枝里、小田切孝人、
田代真人. インフルエンザウイルスゲ
ノムの変異導入率を制御する RNA ポ
リメラーゼの機能領域.
第 29 回中国四国ウイルス研究会. 山
口：2014 年 6 月 29 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

II. 業務項目

最適ワクチン株選定系の技術開発

業務主任者 信澤枝里 国立感染症研究所・室長

研究要旨 ワクチン株培養用細胞上のウイルス受容体となり得るシアリル糖鎖構造を明らかにした。その結果、検出された N 型糖鎖は 16 種類で、このうち、中性糖は 6 種、モノシアリル化糖、ジシアリル化糖は、それぞれ、7 種および 3 種であった。シアリル化糖はいずれも 2 分岐以上の枝分かれをしており、通常鶏卵等で観察される糖鎖配列とは異なり、マンノースを多く含む配列であった。

A. 研究目的

高増殖ワクチン株を開発する際、培養系（細胞、鶏卵の漿尿膜）のウイルス受容体に対するワクチン株の結合親和性は、ワクチン株の増殖性を左右する重要な因子になる。そこで、培養系の受容体構造に親和性を示すウイルスを選択する系を開発することを目的とし、今年度は、ワクチン株増殖用細胞の受容体（シアリル糖鎖）構造を明らかにした。

B. 研究方法

細胞培養ワクチン株増殖用 MDCK 細胞のシアリル糖鎖構造を明かにした。細胞から切り出した N 型糖鎖は PA 化ラベルの後、三次元 HPLC マップ法により解析を行った。DEAE カラムにより、中性糖画分とシアリル化糖画分に分離後、シアリル化糖画分のみ逆相 ODS クロマトグラフィーにより、さらに糖鎖の分離を行った。

C. 研究結果

細胞に含まれる N 型糖鎖の一次解析を行った結果、中性糖、モノシアリル化糖、ジシアリル化糖の組成比は、それぞれ 92.8, 5.1%, 2.1% であった。検出された N 型糖鎖は 16 種類で、内訳は、中性糖 6 種、モノシアリル化糖 7 種、ジシアリル化糖 3 種であった。シアリル化糖はいずれも 2 分岐以

上の枝分かれをしており、通常鶏卵等で観察される糖鎖とは異なり、マンノースを多く含む配列であった。また、末端シアル酸とガラクトースとの結合様式も、 $\alpha 2-3$ 結合および $\alpha 2-6$ 結合いずれの配列も確認された。

D. 考察

ワクチン株増殖用培養系である鶏卵と細胞で、そのウイルス受容体候補となるシアリル糖鎖配列には違いがあることが確認された。末端のシアル酸構造は一致していても、その後の糖鎖配列の違いは、ウイルスと受容体との結合に影響を与える可能性がある。ただ、現時点では、細胞の受容体構造の主となる配列は、人工合成が困難な配列であるため、今後、類似の配列による代用が可能であるか検討が必要である。

E. 結論

ワクチン株増殖用細胞上のウイルス受容体候補となるシアリル糖鎖構造を明らかにした。その結果、モノシアリル糖鎖、ジシアリル糖鎖が、N 型糖鎖のうち約 7% を占め、末端シアル酸とガラクトースとの結合様式は、 $\alpha 2-6$ 、 $\alpha 2-3$ 結合のいずれも確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, Takahashi Y, Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, Ato M, Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, Nobusawa E.* Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. (*Corresponding author) J Virol. 2014 Nov;88(21):12364-73.
- 2) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E. Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. J Virol. 2014 May;88(10):5608-16.

2. 学会発表

- 1) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠：II型膜貫通型セリンプロテアーゼTMPRSS2は、HA開裂部位にMONO-basicなアミノ酸配列を持つA型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である
第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 2) 内藤忠相、齊藤峰輝、信澤枝里、小田切孝人、田代真人：インフルエンザウイルスのゲノム変異導入率を制御する

RNAポリメラーゼの機能領域
第62回日本ウイルス学会学術集会、
横浜、2014年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
該当なし
- 2.実用新案登録
該当なし
- 3.その他
該当なし

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

高増殖株開発

担当責任者 鈴木康司 国立感染症研究所・研究員

研究要旨

現在、日本のインフルエンザワクチンは鶏卵培養法によって製造されている。しかし、ワクチン株の鶏卵馴化による抗原変異やワクチン製造量が鶏卵の供給量に依存するなどの問題が指摘されている。これらの問題解決のため、日本では細胞培養法への切り替えが検討されている。一般的にワクチン株は高増殖であることが求められている。鶏卵培養用ワクチン株が高増殖母体ウイルスを使用して作製されているように、細胞培養ワクチン株を作製する際にも高増殖性を示す母体ウイルスが必要である。細胞で高増殖となるようなワクチン株の開発が行われており、ワクチン株の遺伝子改変や高増殖母体ウイルスの開発が進められている。本研究では、細胞培養ワクチン株開発のため、ワクチン製造用に品質管理された細胞（NIID-MDCK 細胞）で高増殖を示す高増殖母体ウイルスの開発を行った。母体ウイルスの候補には A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8 株) を使用した。PR8 株は NIID-MDCK 細胞で 20 継代することで、 1×10^9 PFU/mL のウイルス力価を示す高増殖株となった (HG-PR8)。HG-PR-8 の細胞培養ワクチン用高増殖母体ウイルスとしての有用性を検討するため、HG-PR8 を母体ウイルスとした H7N9 亜型のワクチン株をリバーシジェネティクス法で作製し、増殖性を評価した。作製したワクチン株の NIID-MDCK 細胞におけるウイルス力価は 1×10^8 PFU/mL と高増殖を示したことから、HG-PR8 は NIID-MDCK 細胞の細胞培養ワクチン用高増殖母体ウイルスとして適している可能性が示唆された。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスの培養法には鶏卵培養法と細胞培養法がある。現在、インフルエンザワクチン製造は鶏卵培養法によって行われている。しかし、ワクチン株の鶏卵馴化による抗原変異や製造が鶏卵の供給に依存していることが懸念されている。細胞培養法でワクチン製造を行うことで、これらの問題が解決されることが期待されており、日本では鶏卵培養法から細胞培養法への切り替えが検討されている。

現在のワクチン株は、野生株と母体ウイルスのリアソータントウイルスである。リアソータントウイルスを作製する方法は 2 種類ある。1 つはコンベンショナルな方法で、野生株と母体ウイルスを同時に鶏卵に感染させ、少なくとも表面抗原のヘマグル

チニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) が野生株由来のウイルスを選別する。季節性ワクチン株の作製にはコンベンショナルな方法が使用されている。もう 1 つはリバーシジェネティクス (RG) 法で、野生株由来の HA と NA の遺伝子、母体ウイルス由来の内部タンパク質の遺伝子 (PB2、PB1、PA、NP、M、NS) をそれぞれ挿入したプラスミドを細胞にトランスフェクションし、ウイルスを作製する。新型ワクチン株やプレパンデミックワクチン株はこの方法で作製されている。一般的にワクチン株は高増殖株であることが求められている。鶏卵培養ワクチン株は、鶏卵用高増殖母体ウイルスがワクチン株を作製する際に使用されている。細胞培養においても高増殖を示すワクチン株作製のために

は高増殖母体ウイルスが必要となる。
現在、細胞培養ワクチンは主に Vero 細胞や MDCK 細胞を使用して製造されている。これらの細胞で高増殖を示すワクチン株を作製するため、母体ウイルスの開発や、HA や NA のノンコーディング領域を含めた遺伝子の改良、セグメント間のリアソートメントが行われている。本研究では細胞培養ワクチン株を開発する事を目的に、ワクチン製造用に品質管理された細胞 (NIID-MDCK 細胞) で高増殖を示す高増殖母体ウイルスの開発を行った。また、母体ウイルスとしての有用性は HA と NA を H7N9 亜型ウイルス由来にしたワクチン株を作製し、その増殖性から評価した。

B. 研究方法

・細胞とウイルス

細胞は ATCC-MDCK 細胞に由来し、ワクチン製造用に品質管理が行われた NIID-MDCK 細胞を使用した。細胞の培養は動物由来成分を含まない培地 (OPTI-PRO SFM (2mM L-Glutamine)) を使用した。ウイルスは実験室株の A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)(PR8 株)を使用した。

・高増殖母体ウイルスの開発

高増殖を示す PR8 株を開発するため、PR8 株を限界希釈法で 10 継代した後に、ブランク精製を繰り返し行い合計 20 継代した。この NIID-MDCK 細胞での PR8 株の継代には、TPCK Trypsin (終濃度 2 μ g/ml) を含むウイルス感染用培地を用いて 34 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で培養した。

回収した培養上清は 2000 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分の遠心により細胞断片などを除いた後に一時的には 4 $^{\circ}$ C、長期的には -80 $^{\circ}$ C で保管した。

・ウイルス力価の測定

NIID-MDCK 細胞にウイルスを 1×10^{-5} で感染させ、34 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で培養した。感染 24 時間後、48 時間後、72 時間後に細胞上清を回収し、-80 $^{\circ}$ C で保管した。回収したウイルスの PFU/mL を測定し、ウイルス力価を計算した。

・遺伝子解析とクローニング

1 継代、10 継代、20 継代した PR8 株のウイルス RNA をそれぞれ抽出し、各セグメント (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS) に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。各セグメントの増幅が確認された PCR 産物を用いてダイレクトシーケンスを行った。

20 継代した PR8 株の全セグメント (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS) をそれぞれ RNA 発現プラスミドに挿入し、RG 法に用いた。

・RG 法によるウイルス作製

8 セグメント分の RNA 発現プラスミド (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS) と 4 種のタンパク質発現プラスミド (PB2、PB1、PA、NP) を 293T 細胞にトランスフェクションし、ウイルスを作製した。作製したウイルスは NIID-MDCK 細胞で増殖させた後に使用した。

C. 研究結果

・母体ウイルスの作製

NIID-MDCK 細胞で 20 継代した PR8 株の経時的なウイルス力価の測定を行い、増殖性を検討した。継代前のウイルス力価は 1×10^6 PFU/mL だったが、20 継代した後のウイルス力価は 1×10^9 PFU/mL と高増殖となった (図 1)。この高増殖となった PR8 株を HG-PR8 とした。HG-PR8 のアミノ酸を継代前と比較すると、PB2、PB1、PA、NA、M、NS に計 7 カ所アミノ酸変異が確認された。

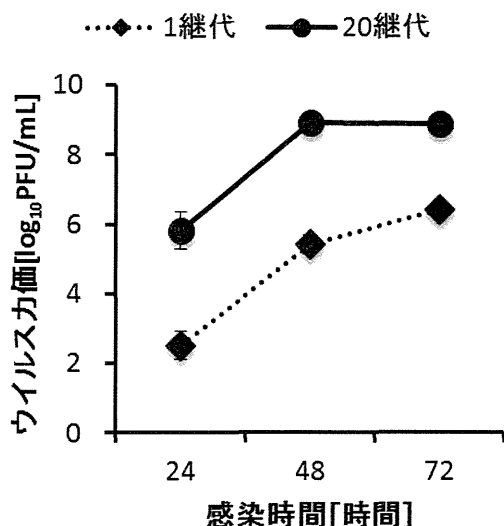


図1 ウイルス力価の測定

・RG法で作製したウイルスの増殖性
HG-PR8の細胞培養ワクチン用高増殖母体ウイルスとしての有用性を検討するため、RG法でウイルスを作製し、増殖性を評価した。まず、RG法が機能する事を確認するため、HG-PR8をRG法で作製した。RG法で作製したHG-PR8は元株と同等の増殖性を示し、RG法が機能している事が確認された。次にHAとNAをH7N9亜型(A/Anhui/1/2013(H7N9))に、内部タンパク質をHG-PR8にしたワクチン株をRG法で作製し、増殖性を検討した。作製したワクチン株のウイルス力価は 1×10^8 PFU/mLであり、高増殖を示す事が確認された。

D. 考察

本研究では、細胞培養ワクチン株開発のため、ワクチン製造用に品質管理されたNIID-MDCK細胞で高増殖を示す高増殖母体ウイルスの開発とその有用性の検討を行った。NIID-MDCK細胞で20継代後に分離されたHG-PR8はウイルス力価が 1×10^9 PFU/mLを示す高増殖株であった。HG-PR8にはPB2、PB1、PA、NA、M、NSの計7カ所にアミノ酸変異が生じており、これらの変異によって高増殖となったことが示唆された。これらの変異がPR8株の病原性を高めたという報告はない。

ワクチン株は野生株と母体ウイルスとのリアソータントウイルスで、少なくとも表面抗原のHAとNAは野生株由来である。今回分離したHG-PR8は抗原性に関わるHAに変異を起こす事なく高増殖を示した。内部タンパク質の変異によって高増殖を示すHG-PR8は細胞培養ワクチン用高増殖母体ウイルスに適していると考えられた。また、HG-PR8を母体ウイルスとして作製したH7N9亜型のワクチン株も高増殖を示した。HAとNAを組換えたワクチン株でも高増殖を維持していたことから、HG-PR8は細胞培養ワクチン用高増殖母体ウイルスとして有用である事が示唆された。

今後、HG-PR8を母体ウイルスとして作製したH7N9亜型のワクチン株のタンパク収量を確認する。また、季節性のH1N1亜型やH3N2亜型、H5N1亜型などのHAおよびNA遺伝子を導入したワクチン株を作製し、HG-PR8の母体ウイルスとしての有用性をさらに確認していく。

E. 結論

NIID-MDCK細胞で高増殖を示す細胞培養ワクチン製造用母体ウイルス、HG-PR8株の開発に成功した。HG-PR8株を用いてH7N9用細胞培養ワクチン株(6:2)を作成した結果、NIID-MDCK細胞で高増殖を示す事が確認され、HG-PR8株の母体ウイルスとしての有用性が、確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki Y, Uchida Y, Tanikawa T, Maeda N, Takemae N, Saito T.

Amino acid substitutions in PB1 of avian influenza viruses influence pathogenicity and transmissibility in chickens.

J Virol. 88(19):11130-9, 2014

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
該当無し
- 2.実用新案登録
該当無し
- 3.その他
該当無し

高タンパク(HA)収量株の開発に関する研究

担当責任者 森川裕子 北里大学北里生命科学研究所・教授

研究要旨

現行の季節性インフルエンザワクチンに含まれる H1N1 株 (X-179A 株) は、ウイルスの増殖性、総蛋白質収量、HA 収量が低い。H26 年度は、X-179A 株の HA/NA、すなわち CApdm 株 HA/NA の蛋白質としての特徴（欠点）を、その発現量や安定性、脂質ラフト親和性、膜輸送効率、分子集合の観点から解析した。①CApdm 株 HA/NA の脂質ラフト親和性や中性 pH における多量体形成は標準株である PR8 株 HA/NA と同程度であった。②CApdm 株 HA/NA の蛋白発現量はいずれも低いが、特に HA 発現量が低いことが判明した。NA の発現量は NA キメラ化 (cytoplasmic Tail-transmembrane-stalk 領域を PR8 株のものに置換) することで改善できた。③CApdm 株 HA/NA の膜輸送効率は PR8 株 HA/NA に比べて悪かった。しかし、NA キメラ化により、CApdm 株 HA と NA の両者の膜輸送効率が改善した。CApdm 株 HA の発現量の改善がなお必要と思われる。

A. 研究目的

現行の季節性インフルエンザワクチンに含まれる H1N1 株すなわち A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1) pdm09 株は、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株（豚由来のパンデミック株、CApdm 株）と A/PR/8/34 (H1N1) 株（標準株、PR8 株）の classical reassortant 株をさらに鶏卵で選抜した株である。この X-179A 株の HA, NA, PB1 遺伝子は CApdm 株由来であるが、その他の遺伝子は PR8 株由来である。鶏卵で選抜した高増殖株であるが、ウイルスの増殖性、総蛋白質収量、HA 収量はワクチン製造の観点ではまだ十分でない。

CApdm 株の HA は構造的に不安定であることが報告されている (BMC Biotechnol, 12: 77, 2012; J Virol, 86: 1405-1410, 2012; J Virol, 88: 4828-4838, 2014)。HA2 のアミノ酸を置換してヘリックス構造の三量体形成を安定させ、高増殖性を改良した報告がある (J Virol, 86: 1405-1410, 2012; J Virol, 88: 4828-4838, 2014)。また、

HA のシグナル領域と transmembrane (TM)-cytoplasmic tail (CT) 領域を PR8 株の TM-CT 領域に置換し、増殖性をやや改善した報告もある (J Virol, 85: 6086-6090, 2011)。しかしながら、このような問題（低増殖性や低 HA 収量等）の原因を理論的に理解できていないし、また、体系的な解決方法を考案できていない。

近年のワクチン開発は classical reassortant 法か reverse genetics (RG) 法を用いて行われ、バックボーン株として PR8 株が用いられることが多い。分担者らは予備実験で「HA と NA が、膜輸送や分子集合といった蛋白質レベルでも (J Virol, 88: 10039-10055, 2014)、また分節集合といった遺伝子レベルでも (未発表)、相互作用 (相関性) を示す」という現象を見いだしている。そこで本年度は、CApdm 株 HA/NA の蛋白質としての特徴（発現量や安定性、脂質ラフト親和性、膜輸送効率、等）を解析し、それらの効率の良い HA/NA 基本構造の考案を試みることにした。本研究で得られる知見を体系化することによ

り、インフルエンザウイルスワクチン株の設計・考案に役立つ一般則や方法論が見いだせると期待される。

B. 研究方法

(1) DNA 構築

プラスミド：真核細胞発現 pCAGGS プラスミド (Actin プロモーター、スプライシング配列、SV40 ori をもつ) を用いて、CApdm 株と PR8 株の HA/NA 蛋白をそれぞれ発現させた。

HA 発現量を比較する目的で、CApdm 株と PR8 株の HA に H5 HA epitope (Biochim Biophys Res Comm, 418: 38-43, 2012) を導入 (aa141-145 を YQGKS に置換) した。また、NA stalk 領域を短縮する目的で、PR8 株 NA の CT-TM-stalk (ST) 領域と CApdm 株 NA の head 領域をもつキメラ NA を作製し、同様に発現させた。

(2) 細胞培養と transfection

MDCK 細胞あるいは 293T 細胞に上記の HA/NA 発現プラスミドを transfection した。

(3) 細胞内局在

MDCK 細胞に HA/NA 蛋白を発現させた。固定後、抗 HA/NA 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。PR8 株 HA 蛋白と CApdm 株 HA 蛋白の検出にはそれぞれに特異的なモノクローナル抗体 (Sino Biological) を用いた。NA 蛋白の検出には抗 N1 NA ヒツジ抗体 (R&D Systems) を用いた。50 個の抗原陽性細胞を共焦点顕微鏡で観察

し、xy, xz 面画像から抗原の細胞内局在を 3 つ (細胞質のみ、細胞質+形質膜、アピカル膜のみ) に分類した。

(4) 脂質ラフト親和性と多量体形成

293T 細胞に HA/NA 蛋白を発現させた。終濃度 1% TritonX-100 を添加して 4°C で 30 min、膜を可溶化した。15,000 rpm で 30 min 遠心し、pellet 画分 (raft 画分)

と supernatant 画分 (nonraft 画分) を分画した。多量体の解析には Blue Native PAGE を用いた。

(5) Western blotting

Western blotting には、抗 PR8 HA モノクローナル抗体、抗 CApdm HA モノクローナル抗体 (Sino Biological)、抗 H5 HA モノクローナル抗体 (Biochim Biophys Res Comm, 418: 38-43, 2012)、抗 N1 NA ヒツジ抗体 (R&D Systems) を用いた。

(倫理面への配慮)

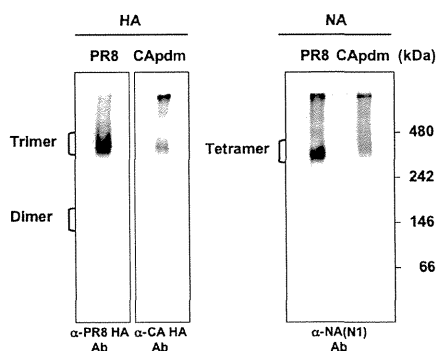
臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

C. 研究結果

(1) HA/NA 蛋白の多量体形成

CApdm 株 HA の三量体構造は、pH 感受性が高く単量体に解離しやすい、あるいは、蛋白質分解酵素で分解されやすいことが報告されている (BMC Biotechnol, 12: 77, 2012; J Virol, 86: 1405-1410, 2012; J Virol, 88: 4828-4838, 2014)。293T 細胞で CApdm 株 HA と PR8 株 HA を発現させ、それらの三量体形成を Blue Native PAGE で調べたところ、中性 pH ではいずれの HA も安定した三量体形成が認められた。NA の場合も、中性 pH では安定した四量体形成が認められた (図 1)。

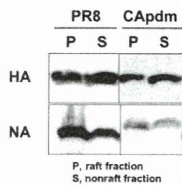
図 1. HA/NA の多量体形成



(2) HA/NA 蛋白の脂質ラフト親和性

HA/NA は脂質ラフト親和性の蛋白質であり、このラフト親和性がウイルスの増殖性や力価に重要であることが報告されている (Proc Natl Acad Sci USA, 100: 14610-14617, 2003; J Virol, 78: 5258-5269, 2004; J Virol, 79: 13673-13684, 2005)。現行季節性ワクチン X-179A 株の増殖性や HA 収量はまだ低く、その HA/NA は CApdm 株に由来する。そこで、CApdm 株の HA/NA の脂質ラフト親和性を 293T 細胞で調べた。CApdm 株 HA の場合、45-46% がラフト画分に、54-55% が非ラフト画分に分画された。PR8 株 HA でもこの分画比率は同程度であった。NA の場合、56-57% がラフト画分に、43-44% が非ラフト画分に分画され、CApdm 株と PR8 株で有意な差は認められなかった (図 2)。

図2. HA/NAの脂質ラフト親和性

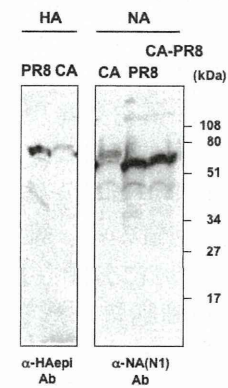


(3) HA/NA 蛋白の発現量

CApdm 株 HA/NA と PR8 株 HA/NA の発現量を比較した。HA は株特異性が高いため、CApdm 株と PR8 株の両者に H5 HA epitope (Biochim Biophys Res Comm, 418: 38-43, 2012) を導入 (aa141-145 を YQGKS に置換) し、共通の epitope をもたせた。この epitope 導入により H5 HA モノクロナール抗体で特異的に認識されるが、増殖性は変化しない PR8 株の RG ウイルスが回収されている (J Virol, 88: 10039-10055, 2014)。この抗モノクロナール抗体を用いた Western blotting で、CApdm 株 HAepi と PR8 株 HAepi を比較したところ、CApdm 株の発現量は PR8 株の 1/4-5 と極めて低かった。また、N1 亜型 NA に対し交差反応性を示す抗 N1

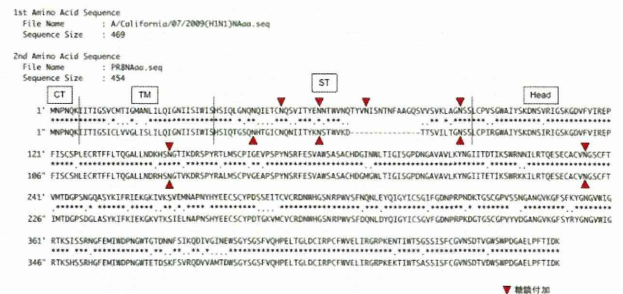
NA ヒツジ抗体を用いて CApdm 株と PR8 株の NA 発現量を調べたところ、CApdm 株 NA の発現量は PR8 株 NA の 1/2 であった (図 3)。

図3. HA/NAの発現量



HA のアミノ酸長は CApdm 株と PR8 株ではほぼ同じであるのに対し、NA のアミノ酸長には顕著な違いが認められた。すなわち、PR8 株 NA の ST 領域は 15 アミノ酸の短縮が観察された (図 4)。そこで、PR8 株 NA の CT-TM-ST 領域と CApdm 株 NA の head 領域をもつキメラ NA を作製したところ、その発現量はほぼ PR8 株 NA の発現量と同程度になった (図 3)。

図4. NAのアミノ酸配列



(4) HA/NA 蛋白の形質膜輸送

HA/NA 蛋白の脂質ラフト親和性は TM-CT 領域で規定され (Proc Natl Acad Sci USA, 100: 14610-14617, 2003; J Virol, 78: 5258-5269, 2004; J Virol, 79: 13673-13684, 2005; J Virol, 88: 10039-10055, 2014)、ラフト親和性は形質