

201447017A

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推進研究事業

新興・再興感染症に対する画期的な新規ワクチン開発  
および実用化に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 阿 戸 学

平成27（2015）年3月

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推進研究事業

新興・再興感染症に対する画期的な新規ワクチン開発  
および実用化に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 阿 戸 学

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費（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、阿戸 学が実施した平成26年度「新興・再興感染症に対する画期的な新規ワクチン開発および実用化に関する研究」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）

新興・再興感染症に対する画期的な新規ワクチン開発および実用化に関する研究

阿戸 学 . . . . . 1

### II. 委託業務成果報告（業務項目）

#### 1. 新規ノロウイルスワクチンに関する研究

片山 和彦 . . . . . 15

#### 2. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発とインフルエンザに対する次世代ワクチンの開発

鈴木 忠樹 . . . . . 29

#### 3. 免疫原性を改善した H7N9 ワクチンの開発

高橋 宜聖 . . . . . 35

#### 4. VLP を用いた万能インフルエンザワクチンの開発

山本 典生 . . . . . 41

#### 5. TBK1 の基質分子を標的とした新規アジュバントの開発

久保田 耐 . . . . . 43

#### 6. 遺伝子組換え弱毒ウイルスの増殖が可能な自然免疫系遺伝子ノックアウト iPS 細胞の作出

竹内 隆正 . . . . . 47

III. 学会等発表実績 . . . . . 51

IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 59

## I. 委託業務成果報告（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等開発推進研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

新興・再興感染症に対する画期的な新規ワクチン開発および実用化に関する研究

業務主任者	阿戸 学	国立感染症研究所	免疫部	部長
担当責任者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部	室長
担当責任者	鈴木 忠樹	国立感染症研究所	感染病理部	室長
担当責任者	高橋 宜聖	国立感染症研究所	免疫部	室長
担当責任者	山本 典生	順天堂大学	大学院感染制御科学講座	准教授
担当責任者	久保田 耐	国立感染症研究所	ウイルス第三部	主任研究官
担当責任者	竹内 隆正	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター	主任研究官
研究協力者	脇田 隆字	国立感染症研究所	ウイルス第二部	部長
研究協力者	長谷川秀樹	国立感染症研究所	感染病理部	部長
研究協力者	小田切孝人	国立感染症研究所	インフルエンザウイルス研究センター	センター長
研究協力者	竹田 誠	国立感染症研究所	ウイルス第三部	部長
研究協力者	黒田 誠	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析センター	センター長
研究協力者	小島 朝人	国立感染症研究所	感染病理部	協力研究員
研究協力者	柴田 岳彦	国立感染症研究所	免疫部	

研究要旨：

本研究は、国立感染症研究所のワクチンシーズと開発のノウハウを共有し、製造上、ウイルス学的、または免疫学的な諸問題により、ワクチンが実用化していない感染症に対する次世代ワクチンの開発に資する橋渡し研究を行う。具体的には、1)免疫原性が低いH7N9等新型インフルエンザ、2)変異が激しい季節性インフルエンザ、3)変異しやすく、培養不能であるノロウイルス感染症、4)ワクチンの投与が重症化を引き起こす可能性があるデングウイルス感染症、およびRSウイルス感染症等を本研究の標的として選択した。これらのウイルス感染症に対して、効率性、安全性を考慮してウイルス様中空粒子(VLP)ワクチンによる防御抗体の誘導を標的とする。上記問題を克服するため、ワクチンシーズの開発に加え、以下の技術的基盤に基づいて研究を推進する：1)アジュバントのワクチンへの応用、2)ヒト主要組織適合性抗原(HLA)提示モチーフの添加による免疫原性の増強、3) VLP粒子径や形状の変化による免疫応答の調節、4)ウイルスの遺伝子操作による増殖性低下をおこなない次世代ウイルス培養細胞の開発など、各分担研究者の研究で蓄積される知見を共有し、それぞれのワクチン戦略に従って最適なオプションを選択し、免疫原性を評価した後、企業等が主体となって行われる臨床治験や製造に応用させ、日本発の優れたワクチンとして世界に発信することが期待される。

## A. 研究目的

本研究は、国立感染症研究所の部局間でワクチンシーズと開発のノウハウを共有し、製造上、ウイルス学的、または免疫学的な諸問題により、ワクチンが実用化していない感染症に対する次世代ワクチンの開発に資する橋渡し研究を行う。

### 1. 新規ノロウイルスワクチンの開発

ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV) は、感受性株化培養細胞が無く、インビトロで増殖させることができない。HuNoV は、GI~GVI の 6 種類の遺伝子グループが存在する。そのうち、HuNoV は GI, GII, GIV である。GI, GII には、それぞれ 17 種類以上の遺伝子型 GI.1~GI.17, GII.1~GII.22 が存在しており、遺伝学的にも、抗原性の面でも非常に多様である。一方、HuNoV 感染者が獲得した免疫が、再感染もしくは、発症を予防することを示す報告が発表されており、HuNoV ワクチン開発の可能性を示唆している。本研究では、第一世代として HuNoV の構造タンパク質をコードする領域をバキテリオウイルスベクターにクローニングし、作製されたウイルス様中空粒子 (VLP) ワクチン、第二世代ワクチンとしてリバーシジェネティックスの手法を応用した HuNoV の弱毒化生ワクチン、第三世代として HuNoV の中和エピトープを抗原としたペプチドワクチンなどの HuNoV ワクチンの開発研究を行う。

### 2. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

デングウイルス (DENV) はフラビウイルス属に属するウイルスであり、現在認可されたワクチンは存在しない。最も開発が進んでいるのは黄熱弱毒生ワクチン株を元にしたキメラ弱毒生ワクチンである。しかし、我が国を含む先進国では遺伝子組み換え生物である当ワクチンが認可される蓋然性は

乏しい。古典的手法による弱毒ワクチンや不活化ワクチンも DENV は培養細胞での増殖能が低いため効率が悪い。また、感染性ウイルスを用いるため製造に特別な施設が必要である。本研究では、DENV-VLP を産生する技術を構築し、作製した VLP の性状解析を行なった。

### 3. 免疫原性を改善した H7N9 インフルエンザワクチンの開発

これまでの臨床試験の結果から、不活化 H7N9 ワクチンに含まれる H7 ヘマグルチニン (HA) はヒトでの免疫原性が低いと考えられている。この低免疫原性を克服するため、海外ではサポニンベースアジュバントの添加や接種量の増加が検討されているものの、導入に際して克服すべき課題を考慮すると、アジュバントや剤形に依存しないワクチン種株の開発が望ましい。本研究では、H7 HA の一次構造を修飾することにより、ヒトでの免疫原性を改善した H7N9 ワクチンの開発を試みる。

### 4. 季節性インフルエンザに対するユニバーサルワクチンの開発

インフルエンザウイルスは激しく変異するため、時間が経つと多くの場合ワクチンの内容を変更する必要がある。そのため、季節性インフルエンザワクチンを毎年接種しなければならない。本研究では、この問題を解決するために、インフルエンザウイルスが持つ蛋白質の保存性が高い部分を組み込んだ VLP によって、カバーできるウイルスの範囲が広く、亜型が異なっても有効であり、長期間にわたり感染防御可能な免疫を誘導できるワクチンの開発を目指す。

### 5. 新規ワクチンのためのアジュバントの開発

近年、インフルエンザワクチン経鼻ワク

チンにより、粘膜上の IgA 抗体の分泌を誘導が試みられているが、免疫誘導能が低く、何らかのアジュバントが必要と考えられている。しかしながら、経鼻投与ワクチンとして実績のあるアジュバントは未だ存在していない。

金ナノ粒子はそれ自身に対する抗体産生が無いため、ワクチンの抗原のキャリアとして報告がある。近年、抗原を担持したナノ粒子やナノ粒子単体によって引き起こされる、サイズ・形状依存的な免疫応答が報告されている。そこで、我々は金ナノ粒子上に鎖長の短く安全性の高い Poly(I:C) をコーティングし、これをアジュバントとして用いることで、毒性の出ない鎖長で効果的に免疫応答を惹起することのできる新たな粘膜アジュバントの開発を試みた。

近年の自然免疫受容体リガンドをアジュバントとして用いたワクチンが実用化されている。自然免疫受容体の活性化は標的細胞内の情報伝達系を広く変動させるため、このようなアジュバントを投与した細胞では膨大な数のエフェクター因子が作動している。理想的なアジュバントを開発するためには、このようなエフェクター群のなかから、獲得免疫誘導のために働く因子を特定し、それらを選択的に作動させるための物質を選び出していく必要がある。全ての自然免疫受容体の活性化に伴って酵素活性の上昇が見られるキナーゼ分子 TBK1 に、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 下流の情報伝達系制御因子である、免疫機能の調節の役割を担うことが示唆されている RGS タンパク質が結合することが明らかとなった。本研究では自然免疫受容体活性化が、TBK1 を介してケモカイン受容体などの GPCR 下流の情報伝達系にどのような影

響を及ぼすのかについて、まず細胞レベルでの詳細な検討を行い、ワクチンアジュバント開発のための標的候補分子か否かについて検討する。

## 6. 遺伝子組換え弱毒ウイルスの増殖が可能な自然免疫系遺伝子ノックアウト iPS 細胞の作出

弱毒ウイルスを用いた生ワクチンは免疫誘導能が高いが病原性復帰株の出現リスクがある。自然免疫抵抗性を減弱させる遺伝子欠失を導入することにより、安全性を向上させた弱毒ウイルスを作出する。一方、そのようなウイルスは、細胞での増殖能も低下する。そのため、ゲノム編集技術によりヒト iPS 細胞の自然免疫系の遺伝子をノックアウトしたワクチン製造用培養細胞を作出し、そのヒト iPS 細胞をウイルスの感染する細胞系譜に分化させる。この分化細胞を用いて弱毒ウイルスを増殖させ、最終的には大規模化により生ワクチンとしての製造を可能にする。こうした流れの中で、ゲノム編集によるヒト iPS 細胞での I 型インターフェロン遺伝子群の欠失を初期目標とした。

## B. 研究方法

### 1. 新規ノロウイルスワクチンの開発

#### 1) 第一世代 VLP ベースワクチンシーズの開発

HuNoV GI および GII 遺伝子については、データベース上の塩基配列に基づき、遺伝子配列を合成し、シャトルベクターにクローニングした後、バキュロウイルスゲノムのポリヘドリンプロモーター下流にサブクローニングした。作製したバキュロウイルスゲノムは、SF9 細胞にトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを産生させ、プラークアッセイにて純化したプラークを



Sf9 で増殖させることでマスターシードウイルス候補を作製した。さらに、マスターシードウイルス候補は、電子顕微鏡観察にて VLP 構造があることを確認し、濃縮後に次世代シーケンサーにより全長塩基配列を決定し、HuNoV インサート配列と、バキュロウイルス遺伝子配列を確認し、変異を持たないことを確認した後、マスターシードウイルスとした。それぞれの HuNoV の遺伝子型の VLP は、Hi5 細胞を用いて作製し、上清中のバキュロウイルスを分離精製した後、 $-80^{\circ}\text{C}$  に小分け分注して保管した。

2) ワクチンシード検出用ウサギ抗血清；ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の作製

定法にて VLP をウサギ、モルモット、マウスにそれぞれ免疫し、抗 VLP ウサギ血清、抗 VLP モルモット血清をポリクローナル抗体として得た。ポリクローナル抗体の交差反応性を VLP-ELISA にて調べ、交差反応性のある VLP に関しては、それぞれの遺伝子型 VLP に特異的なモノクローナル抗体の作成を行い、特異性は VLP を 96 ウェルプレートにコーティングし、ELISA によって確認した。

3) 小児 HuNoV 感染患者の時系列解析

研究協力者のご子息がノロウイルスに感染したため、保護者の同意を得て便検体のサンプリング、解析を行った。対照児は、1 歳 5 ヶ月の男児で、急な発熱、嘔吐、下痢の症状が認められた。クイックナビ・ノロ（デンカ生研）にてノロウイルス陽性を確認した後、4 月 18 日より、5 月 13 日まで 27 日間経過観察を行いながら 13 サンプルの（便検体）を採取した。また、この期間、Vesikari clinical scoring system に準拠して、体温、嘔吐症状、下痢症状、腹痛などの臨床症状の記録より、臨床症状のスコアリングを行った。また、QRT-PCR 法を用いて患者便中の HuNoV -RNA の定量と ELISA 法を用いた便中 IgA の検出を行った。

得られた NoV ゲノムシーケンスは、アライメント後、トレーサーにて時系列系統の解析パラメーターを設定した。その後、ベイジアンモンテカルロ法にて、進化速度、時系列を加味した分子系統解析を施行した。

2. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

1) VLP 発現ベクターの構築

DENV1 型、WNV ゲノムのうち、構造タンパク質コード領域である prM、E 領域を組み込んだ cDNA プラスミドを発現ベクターとして作製した。

2) VLP の一過性発現系および野生型 DENV の発現

上記構造タンパク質の遺伝子をトランスフェクションにより Expi293F 細胞に導入した。導入細胞から培養上清中に放出された VLP を、フラビウイルス特異的な E タンパク質領域を検出する抗体(4G2)を用いてサンドイッチ ELISA を行い、DENV または VLP を定量した。Vero E6 細胞に野生型 DENV1 型ウイルスを  $\text{moi} = 0.03$  で感染させ、4 日後の培養上清を回収し、上述した ELISA を用いて定量した。

3) 発現 VLP の性状解析

細胞外に放出された DENV または VLP を含む培養上清を、ショ糖密度勾配遠心法で分画し、ELISA で検出することで DENV、VLP を沈降速度の違いによって比較し、濃縮・精製した VLP を透過型電子顕微鏡で観察し、実際に粒子形成しているかを確認した。

3. 免疫原性を改善した H7N9 インフルエンザワクチンの開発

1) インフルエンザワクチンの調製

リバースジェネティクスによりヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) 以外を A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8) 由来に置き換えた H7N9 型ワクチン株 NIBRG-268 (A/Anhui/1/2013 由来) と、対照として、同様

に PR8 由来の内部タンパクを有する H3N2 型ワクチン株である IVR-165 と X31 を発育鶏卵で増幅した後、精製し、0.05%ホルマリンで不活化した。また、HA ワクチンとして、バキュロウイルス発現系を用いて作製した組換え HA タンパクを使用した。

2) ヒト末梢血細胞を移植したヒト化マウスの作製

H7N9 に対する血清 HI 抗体価が 10 以下の健常人から末梢血単核球を分離した。これを NOD/SCID/Jak3<sup>-/-</sup>マウスに移植したヒト化マウスを作製した。

3) ワクチンに対するドナー由来液性免疫応答の測定

ヒト化マウスの尾静脈にワクチンを接種し、その 10 日後に血清と脾臓細胞を回収した。組換え HA タンパクをプレートにコーティングし、ヒト血清中に含まれるヒト抗 HA IgG 抗体濃度と、ヒト抗 HA IgG 抗体産生細胞数を ELISA と ELISPOT 法により測定した。

4. 季節性インフルエンザに対するユニバーサルワクチンの開発

VLP を作製するための条件について、発現条件等、様々な面から検討を行った。特許出願を予定しているため、ここに詳細を記載することはできない。

5. 新規ワクチンのためのアジュバントの開発

1) 金ナノ粒子の合成

金ナノ粒子は直径  $38 \pm 4.3\text{nm}$  もしくは  $20 \pm 1.4\text{nm}$  の球状金ナノ粒子、及び長軸  $27 \pm 3.1\text{nm}$ 、短軸  $7.3 \pm 0.97\text{nm}$  の金ナノロッドを得た。(16-mercaptohexadecyl) trimethylammonium bromide (MTAB) を加え、金ナノ粒子表面を MTAB で修飾した。ナノ粒子の終濃度が  $1\text{nM}$  (40nm 球状金ナノ粒子、金ナノロッド)、または  $5\text{nM}$  (20nm 球状金ナノ粒子)、Poly(I:C)の終濃度が  $1\text{mg/ml}$  とな

るようにそれぞれ体積比 1:1 で混合し、ナノ粒子表面をコーティングした。

2) マウスを用いた免疫/攻撃感染実験

BALB/c マウスに HA タンパク量で  $10\text{ng}$  の HA split vaccine A/California/7/2009 (H1N1pdm09) にアジュバント候補物質を混合し片鼻  $5\mu\text{L}$  合計  $10\mu\text{L}$  を 3 週間隔で 2 回接種した。最終接種から 2 週間後に A/Narita/1/09 (NRT 株、(H1N1)pdm09) を  $4000\text{PFU}/4\mu\text{L}$  で鼻腔内に感染させた。感染 3 日後に安楽殺を行い、血清および鼻腔洗浄液を回収した。MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により、鼻腔洗浄液中のウイルス価を算出した。

3) RGS タンパク質の TBK1 依存的リン酸化修飾パターンの解析

HA タグを付加した TBK1 及び IKK $\epsilon$  (HA-TBK1 及び HA-IKK $\epsilon$ ) を発現するプラスミドを作成し、Strep タグを付加した RGS1 及び RGS18 (Strep-RGS1 及び Strep-RGS18) を発現するプラスミドと共に 293T 細胞に導入した。これらの細胞からの抽出液を通常の SDS-PAGE ゲル、又はリン酸化物の分離が可能な Phos-tag PAGE ゲルを用いて分離し、リン酸化修飾パターンを調べた。

4) RGS1 および RGS18 の TBK1 依存的リン酸化修飾部位の同定

細胞抽出物から精製した Strep-RGS1 と Strep-RGS18 を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色後それぞれの RGS タンパク質に対応するバンドを切り出して、リン酸化修飾部位を同定するために LC-MS/MS を用いて質量分析を行った。HA-TBK1 の発現の有無で、リン酸化修飾部位を比較し、TBK1 依存的リン酸化部位を特定した。

6. 遺伝子組換え弱毒ウイルスの増殖が可能な自然免疫系遺伝子ノックアウト iPS 細胞の作出

JCRB 細胞バンクから分与された Tic 細胞 (MRC-5 細胞から樹立されたヒト iPS 細胞) を用いた。フィーダー細胞との共培養から開始し、培養により、フィーダー細胞を不要とし、さらに単細胞からの培養が可能になりエレクトロポレーション及びクローニングも可能にした。ゲノム編集には CRISPR/Cas9 システムを用い、I 型インターフェロン遺伝子群の標的配列は truncated gRNA (tru-gRNA: Fu et al. Nat. Biotechnol. 2014) に従って設計した。tru-gRNA を合成し、水溶液中で Cas9 蛋白質と tru-gRNA の複合体を形成させた後、Tic 細胞浮遊液と混合しエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション 2 日後に細胞を回収し、GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (ライフテックノジーズ社) あるいは GuideGuide-it Mutation Detection Kit (タカラバイオ社) を用いて変異導入効率を求めた。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程および動物実験委員会規程に従い実施した。動物実験は、動物実験委員会の承認を得てから行い、ヒト試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得てから行った。

## C. 研究成果

### 1. 新規ノロウイルスワクチンの開発

#### 1) 第一世代 HuNoV-VLP ベースワクチンシーズの開発

大腸菌-バキュロウイルスシャトルベクターにクローニングした HuNoV GI の GI.1 から

GI.9、HuNoV GII の GII.1 から GII.22 までの (GII.11, 18, 19 は、ブタウイルスのため除外) ORF2, 3 領域は、デザイン通りのクローンである事を確認した。

大腸菌-バキュロウイルスシャトルベクターよりバキュロウイルスのゲノムに HuNoV の配列を Bac-to-Bac システムにより移し、組み換えバキュロウイルスゲノムを作製した。このゲノムを SF9 細胞にトランスフェクションし、フィンガープリンティングによる均一性を満たしたシードウイルスの作製が終了した。

シードウイルスより作製したワーキングシードと、Hi5 細胞を用いて VLP の大量発現作業を行った。

#### 2) ワクチンシード検出用ウサギ抗血清；ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の作製

それぞれの抗原 (VLP) に特異的な抗体を作製するため、免疫源として使用した VLP 以外の遺伝子型の VLP に交差反応するか否かを、VLP-ELISA を用いて調べた。特異性が高いことが確認されたポリクローナル抗体を除く遺伝子型については、定法に従ってモノクローナル抗体作製を実施した。各種遺伝子型、バリエーション特異的抗体のクローニングは終了したが、各クローンのスクリーニングは現在進行中である。

#### 3) 小児 HuNoV 感染患者の時系列解析

症例は、1歳五ヶ月の男児、2014年4月17日に嘔吐下痢症を発症、初期症状は激しい嘔吐、その後、発熱と激しい下痢に見舞われた。ノロウイルス陽性となった4月18日より、5月13日まで27日間経過観察を行いながら13サンプル (便検体) を採取した。発症後2日では重症度スコア9を示した。その後13日目にはスコアはゼロを示し、症状は消失した。

感染したノロウイルスについて、遺伝子型解析を実施したところ、GII.4 Sydney 2012 variantであった。便中ノロウイルスRNAタイターは、発症2日後で最大であり、その後重症度スコアが0となった13日目には $10^7$  copies/g・stoolまで低下した。しかし、低下傾向は認められるが27日目でも $10^6$  copies/g・stoolの排泄量が保たれていた。

ICキットは $10^7$  copies/g・stoolを下回ると検出不能と成り、陰性を示した。この結果から、ICキットの検出限界は $10^7$  copies/g・stoolであることが明らかになった。

本症例の感染後2日目の便検体に含まれるGII.4株より作出したVLPを用いて、特異的IgA2抗体を検出した。その結果、IgA2の量は13日目にピークを迎え、その後下降傾向を締めた。

感染後の便に排泄されたHuNoVの塩基配列の経時的quasispeciesの変化、ゲノム塩基配列アミノ酸配列の変化を比較検討した。その結果、感染15日目以降になって初めて、ウイルス生存に有利なアミノ酸変異が検出され、NTPaseコード領域、キャプシド蛋白質のP領域に多発していた。これは、13日目以降のIgA2のピーク以降、ウイルスのキャプシド領域に非常に強い免疫学的選択圧がかかっていたことを示唆していた。次に、BEASTにより各ポイント間の進化速度を算出したところ、15日目以降進化速度が上昇し、27日目にはピークを迎えていたことが明らかになった。この速度増加はウイルスRNAタイターの減少傾向と平行し、IgA2のピーク以降に観察されることから、宿主からの免疫学的選択圧でウイルス量を減らしながらもウイルスゲノム進化を加速させて、適応しようとしていると考えられた。

## 2. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

### 1) DENVおよびVLPの、細胞外に放出される抗原量の比較

4G2:HRP-4G2 (フラビウイルスEタンパク質多量体検出) サンドイッチELISAを用いてDENVおよびVLPの培養上清中のELISA価を定量した結果、単位培養上清あたりDENV-VLPはDENVの約10倍、WNV-VLPはDENV-VLPのさらに約10倍のELISA価の抗原が培養上清中に存在することが確認された。

### 2) DENVおよびVLPの速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心解析

DENV、VLPの培養上清を速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心法で解析したところ、DENVとWNV-VLPは、それぞれ二相性のピークを描いて分離された。分画されたDENVの感染性をVero E6細胞を用いたブランクアッセイ法で確認した所、沈降速度の早い分画( $d=1.111$ )には感染性が確認され、沈降速度の遅い分画( $d=1.091$ )には感染性が確認されなかった。DENVの感染性の無い沈降速度の遅い分画( $d=1.091$ )は、DENV-VLPの沈降速度の早い分画( $d=1.089$ )とほぼ同等の沈降速度である。

### 3) VLPの透過型電子顕微鏡観察

DENV-VLPおよびWNV-VLPの培養上清をシヨ糖クッション法で濃縮した後、平衡沈降シヨ糖密度勾配遠心法で分画したところ、共に $d=1.180$ から $d=1.150$ の分画に単相性のピークを描いて分画された。その分画を、限外濾過法を用いてシヨ糖からPBS(-)に置換した後、透過型電子顕微鏡で観察したところ、共に大きさの異なる粒子形の構造を確認した。

## 3. 免疫原性を改善したH7N9インフルエンザワクチンの開発

### 1) ヒト化マウスを用いたインフルエンザワ

#### クチン免疫原性の評価

現行のインフルエンザワクチンは免疫記憶リンパ球を再活性化して、抗 HA 抗体を惹起することを主目的とする。実際、我々のヒト化マウスのシステムで、インフルエンザワクチンに対するヒト抗体応答が認められるか否か検証するため、ヒト化マウスを作製し、H3N2 ワクチンを接種したところ、インフルエンザワクチンに対するヒト抗体応答がマウス血中で検出されることが確認された。また、ワクチン剤型による免疫応答もヒト健常人を反映していることが明らかとなった。

#### 2)H7N9 不活化全粒子ワクチン免疫原性の評価

我々のヒト化マウスのシステムで、H7N9 ワクチンのヒトでの免疫原性を評価したところ、これまでに報告された臨床試験の結果と同様、H7N9 ワクチンの抗体産生誘導能は、季節性ワクチンに比べて劣ることが再現され、本システムが、臨床試験の代わりとしてインフルエンザワクチンの免疫原性を評価できることが示された。免疫バイオインフォマティクスにより H7 HA の一次構造から免疫原性を数値化すると、H7HA の免疫原性は、季節性ウイルスの HA よりも有意に低いことが報告されている。そこで、H7 HA に変異を導入し、この数値を季節性ウイルスのものと同程度まで向上させた変異型 H7 HA を作製した。この変異型 H7 HA をヒト化マウスに接種すると、大変興味深いことに野生型の H7 HA よりも抗体産生誘導能が 20 倍以上増加することが確認され、新規ワクチン候補となることが示唆された。

#### 4. 季節性インフルエンザに対するユニバーサルワクチンの開発

VLP を作製するための条件・方法について検討を行った結果、より優れた VLP ワクチン作製条件・方法を見出すことが出来た。特許出願を予定しているため、こ

こに詳細を記載することはできないが、従来の季節性インフルエンザワクチンよりもカバーできるウイルスの範囲を広くすることができるかと期待される。

#### 5. 新規ワクチンのためのアジュバントの開発

40nm 球状金ナノ粒子、金ナノロッド、20nm 球状金ナノ粒子を Poly(I:C)と結合させた各アジュバントと HA 抗原を含むワクチンを経鼻接種したマウスにインフルエンザウイルス攻撃感染したところ、ロッド型金ナノ粒子-Poly(I:C)からなるアジュバント添加群でのみ鼻腔洗浄液中ウイルス量が有意に減少していた。これらの有意な変化はロッド型金ナノ粒子単体添加群および Poly(I:C)単体添加群では認められなかったことから、Poly(I:C)のアジュバント活性がロッド型金ナノ粒子-Poly(I:C)複合体化によって増幅されたと考えられた。また、球型金ナノ粒子-Poly(I:C)を含む組成物添加群でもウイルス量の有意な減少が認められなかったことから、ロッド型の粒子形状が Poly(I:C)のアジュバント活性上昇に寄与していると考えられた。

#### 1) RGS タンパク質の TBK1 依存的リン酸化修飾パターンの解析

Phos-tag PAGE によるリン酸化修飾パターンの解析の結果、RGS1 は TBK1 により、2 箇所がリン酸化修飾を受けると予想された。同様に RGS18 では、TBK1 発現により最低 2 箇所、新たにリン酸化修飾を受けると予想された。LC-MS/MS による質量分析の結果、TBK1 発現細胞では RGS1 の S143 および S180 位の二箇所のリン酸化修飾が検出され、RGS18 に関しては、S34 および S92 位のリン酸化修飾が TBK1 発現細胞で亢進していた。

## 6. 遺伝子組換え弱毒ウイルスの増殖が可能な自然免疫系遺伝子ノックアウト iPS 細胞の作出

I 型インターフェロン遺伝子群のテロメア側 5kb、セントロメア側 3kb の領域内でオフターゲット切断の可能性が低いと考えられる tru-gRNA 配列を 12 個と 8 個見出した。おのおのに対して *in vitro* で tru-gRNA を合成し、Cas9 蛋白質及び切断対象 DNA と混合すると 20 個全てで想定された長さの DNA 断片が得られた。

I 型インターフェロン遺伝子群のテロメア側 3 個、セントロメア側 2 個の tru-gRNA をおのおの Cas9 蛋白質との複合体として Tic 細胞にエレクトロポレーションにより導入した。変異導入効率は tru-gRNA ごとに異なっていたが、調べたものの中では最大で 10%程度だった。

## D. 考察

### 1. 新規ノロウイルスワクチンの開発

本研究により、2014年現在の時点で、論文上に報告されている全ての遺伝子型のVLP作製準備が整った。また、それぞれの抗原 (VLP) に特異的な抗体 (VLP特異的抗体) は、原薬の品質管理だけでは無く、数種類のVLPを混合して免役するHuNoVの多価ワクチンを想定した場合、VLP混合後の混合比確認のため必須である。そのためには、ウサギ抗血清の特異性を明らかにする必要がある。GII.3, 4に関しては特異性が高いことが予想されたが、両遺伝子型共にバリエーション (亜株) の微妙な抗原性の違いによって流行が引き起こされることが報告されているため、バリエーション特異的VLPとそれを識別可能な抗体が必要になる可能性がある。そこで、これらについては、バリエーション特異的モノクローナル抗体を作製することとした。各種遺伝子型、バリエーション特

異的抗体のクローニングは終了したが、各クローンのスクリーニングは現在進行中である。今後、全てのVLPが揃ったところで、再スクリーニングを実施し、ウサギ血清、もしくはモノクローナル抗体の特異性を再確認する必要がある。

仮想VLPワクチンの力価試験法の開発研究  
ワクチンの品質管理試験において、原薬、最終小分け製品までの工程管理試験で想定されるVLPに対する品質管理に使用する抗原、抗体についての開発研究は順調に進行している。しかし、ワクチンの力価試験、つまりワクチンの能力を測る試験に関しては、来年度以降に開発研究を進める必要がある。現時点で想定している力価試験法は、ワクチン接種した動物体内で誘導される抗体が、VLPの細胞への吸着を阻害可能か、否かを測定する方法である。

ワクチンの接種方法、ワクチンによる感染防御のメカニズムがあまりよく分からないまま、力価試験法を開発することは、困難である。上記方法についても、腸管粘膜、細胞で引き起こされる感染とその防御に関する現象を、血清中に誘導される抗体の性質を調べることで予測可能か否かなど、明らかにすべき問題は山積している。そこで、本年度は、実際にノロウイルス感染患者の腸管で起きる抗体誘導とその抗体が症状の改善、ウイルスの排除に対し、どのように影響を与えているのかを調べることを目的とした臨床症例の解析を試みた。その結果、腸管に分泌されるIgA2分子を主とする体内でのウイルスに対する免疫の誘導が、便中ウイルスRNAタイターを下降させ、症状の軽減を導くこと等が示唆された。このような状況をあらかじめワクチンで誘導することで、ノロウイルス感染による症

状を抑えることができるかもしれない。報告症例においては抗体上昇後もウイルスの排泄は続いており、ウイルスは遺伝子を変化させることで、細々とではあるが体内での増殖を維持していた。従って、ワクチン接種により、ノロウイルスの感染を完全に防御することは困難である可能性が高い。我々はウイルスの進化を加速させてしまう可能性もあり、ワクチンの開発には、基礎的なデータの積み重ねと、慎重な対応が必要であると考えられる。

## 2. デングウイルス感染症に対する次世代ワクチンの開発

Expi293F 細胞を用いて発現させた DENV-VLP の単位培養上清あたりのウイルス価は、Vero E6 細胞を用いて作製した DENV と比較して約 10 倍であり、より効率良くワクチン抗原を作製できることが確認された。速度ゾーンシヨ糖密度勾配遠心法を用いて解析した DENV の VLP は、二相性のピークを描いて分画され、DENV-VLP の沈降速度の早い分画は、内部にゲノムが取り込まれていない不完全なウイルス粒子と同じ分画である。この不完全ウイルス粒子にも感染性粒子と同様の免疫原性があることが知られているので、DENV-VLP にも十分な免疫原性が期待できる。

## 3. 免疫原性を改善した変異型 H7 HA ワクチンの開発

インフルエンザワクチンの免疫原性は、記憶 B リンパ球と T リンパ球の両者を再活性化できるか否かに依存する。これら記憶リンパ球のクロストークを規定する MHC クラス II 分子の構造は、動物種により大きく異なる。そのため、マウス等の動物モデルで得られたデータをヒトへ適用することは困難であり、免疫原性評価には臨床試験に頼らざるを得ない。

我々が採用したヒト化マウスのシステムは、ヒト臨床試験で報告されているいくつかの現象を再現することが可能であったことから、本ヒト化マウスはインフルエンザワクチンのヒト免疫原性評価に非常に有用なツールであると考えられる。

本ヒト化マウスを用い、我々は H7 HA の一次構造を改変した変異型 H7 の免疫原性が大きく改善されることを明らかにした。今後、この変異型 H7 HA を発現したワクチン種株の作製に着手し、ワクチン種株の増殖効率や安定性等、ワクチン製造に必要な様々な課題を検証する予定である。

## 4. 季節性インフルエンザに対するユニバーサルワクチンの開発

現在使われている季節性インフルエンザワクチンは、そのスペクトラムが狭いため、インフルエンザウイルスの変異によりワクチン用のウイルス株を変更する必要が出てくる。ユニバーサルワクチンの開発によって、流行ウイルスとワクチン株が免疫学的に不適合となるリスクを低下させ、ワクチン株変更の頻度を低くすることが可能となる。

さらに現行の季節性インフルエンザワクチンは、鶏卵馴化により抗原性が変化するリスクもある。一方、VLP 技術によるワクチン製造の場合は、抗原性が変化するリスクはない。従って、VLP ワクチンは、より有効性の高いワクチンを提供可能な方法だと考えられる。

## 5. 新規ワクチンのためのアジュバントの開発

本研究では、新たなインフルエンザワクチン開発のために経鼻インフルエンザの粘膜アジュバントとなる物質の新規合成を行った。鎖長が短く毒性の低い Poly(I:C)は、それ単独では、アジュバント活性は見られず、金ナノ粒子単体でもアジュバント活性は見

られなかったら、両者を結合させることにより、アジュバント活性を誘導することに成功した。さらに、この核酸のナノ粒子化によるアジュバント効果の制御という技術は、全く新しい観点でのアジュバントとして、様々なワクチンに応用できることが期待される。

RGS1 および RGS18 は、TBK1 のリン酸化基質である可能性が極めて高い。RGS1 は、自然免疫受容体刺激または I 型インターフェロン (IFN) により発現が誘導される、いわゆる IFN 誘導性遺伝子 (IFN inducible genes; ISGs) である。一方 RGS18 は自然免疫受容体刺激でタンパク量が減少する。TBK1 による RGS のリン酸化は RGS タンパク質の量的変化に対応して異なる部位を修飾し、免疫応答の制御を行っている可能性がある。今後このような抗体を用いることで、ワクチン接種後や、病原体感染後の修飾部位特異的な効果を明らかにすることが期待できる。

#### 6. 遺伝子組換え弱毒ウイルスの増殖が可能な自然免疫系遺伝子ノックアウト iPS 細胞の作出

I 型インターフェロン遺伝子群は 10 個以上の遺伝子が含まれるため、個々の遺伝子に変異を導入するかわりに、遺伝子群全体を欠失させることを目標とした。ゲノム編集に用いられる DNA 切断酵素は複数あるが、CRISPR/Cas9 システムを用いた。CRISPR/Cas9 システムではオンターゲットの切断効率を高めるとオフターゲット切断も起こりやすくなることが報告されている。そこでオフターゲット切断を避ける対策を取った上でオンターゲット切断効率を高めることとした。ミスマッチに敏感な tru-gRNA を用い、かつ

Cas9 蛋白質と tru-gRNA の複合体を直接ヒト iPS 細胞に導入する系を立ち上げた。切断効率の高い tru-gRNA を選択することにより、I 型インターフェロン遺伝子群を欠失させた iPS クローンを取得できると考えられる。

#### E. 結論

- ヒトノロウイルス(HuNoV)の構造タンパク質をコードする領域をバキュロウイルスベクターにクローニングし、現在まで報告されている全ての遺伝子型の VLP 作製のためのマスターシードウイルスを準備した。また、VLP 力価試験法に用いる特異抗体パネルの作製を順次進めている。
- Expi293F 細胞を用いて作製した DENV-VLP は Vero E6 細胞を用いた DENV よりも約 10 倍の抗原を発現し、免疫原性も DENV と同等と予想され、DENV-VLP はワクチン抗原の候補となりうると考えられる。
- インフルエンザワクチンのヒト免疫原性評価に有用なヒト化マウスのシステムを構築した。このシステムを用い、免疫原性の改善に繋がる変異型 H7 HA を作製することに成功した。
- インフルエンザウイルスの保存性の高い領域を組み込んだ VLP の作製に適した条件の絞り込みを行った。VLP をベースにしたユニバーサルワクチンの開発を推進する。
- 金ナノ粒子上に鎖長の短く安全性の高い Poly(I:C) をコーティングし、これをアジュバントとして用いることで、毒性の出ない鎖長で効果的に免疫応答を惹起することのできる新たな粘膜アジュバントの開発を試みた。
- TBK1 依存的 RGS タンパク質リン酸化修飾には、GPCR 情報伝達系の正と負の両方の制御効果をもたらす可



能性があり、RGS を標的としたアジユバント開発のためには、修飾部位ごとの詳細な効果の検討が必要である。

- ヒト iPS 細胞での CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集システムを立ち上げ、Cas9 蛋白質と tru-gRNA の複合体を直接ヒト iPS 細胞にエレクトロポレーションにより導入した。今後、I 型インターフェロン遺伝子群を欠失させたクローンを取得できると考えられる。

#### F. 健康危険情報

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, E Nobusawa. Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of A/(H1N1)pdm09 Virus by Using Monoclonal Antibody Escape Mutant. *J Virol.* 2014 88(21):12364-73.
- 2) Kobayashi-Isihara M, Takahashi H, Ohnishi K, Nishimura K, Terahara K, Ato M, Itamura S, Kageyama T, Tsunetsugu-Yokota Y. 2014. Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin. *PLoS One.* 9(6):e99201.
- 3) Hifumi T, Sakai A, Yamamoto A, Murakawa M, Ato M, Shibayama K, Ginnaga A, Kato H, Koido Y, Inoue J,

Abe Y, Kawakita K, Hagiike M, Kuroda Y. 2014. Clinical Characteristics of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) Bites: a National Survey in Japan, 2000-2013. *J Intensive Care.* 2:19.

##### 2. 学会発表

###### 【国際会議】

- 1) Ato M. 2014. Leukocytopenia following influenza vaccination. International Medical Sciences Conference 2014: Translational Research from Molecular Basis to Health Care (Khon Kaen, Thailand, 7月)

###### 【国内会議】

- 1) 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)
- 2) Shibata T, Hogaboam C, Ato M.: Role of Gas6/TAM signaling in the development and exacerbation of fungal allergic airway disease in mice. 第 43 回日本免疫学会 (京都、12月)
- 3) Adachi Y, Inoue T, Kurosawa 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)
- 4) 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)
- 5) Sato K, Asanuma H, Ato M.: Evaluations of influenza vaccine immunogenicity using human cell lines. 第 43 回日本免疫

学会（京都、12月）第43回日本免疫学会（京都、12月）

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）

- 6) Matsumur T, Ato M.: Immature myeloid cells are the major producers of IL-6 in severe invasive group A streptococcal infections.
- 7) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：
2. 実用新案登録：
3. その他：

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

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推進研究事業)  
委託業務成果報告(業務項目)

新規ノロウイルスワクチンに関する研究

担当責任者	片山和彦	国立感染症研究所ウイルス第二部第一室室長
研究協力者	染谷雄一	国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官
研究協力者	岡智一郎	国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官
研究協力者	藤井克樹	国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官
研究協力者	村上耕介	国立感染症研究所ウイルス第二部研究員
研究協力者	芳賀 慧	国立感染症研究所ウイルス第二部研究員
研究協力者	高橋宜聖	国立感染症研究所免疫部第四室室長
研究協力者	中西 章	国立長寿医療センター老化制御研究部遺伝子治療研究室室長
研究協力者	村田和義	自然科学研究機構生理学研究所 准教授
研究協力者	戸高玲子	国立感染症研究所ウイルス第二部非常勤職員
研究協力者	朴英 斌	国際厚生事業団 流動研究員
研究協力者	団 海燕	国際厚生事業団 流動研究員
研究協力者	藤本 陽	国際厚生事業団 流動研究員
研究協力者	三木元博	国立感染症研究所ウイルス第二部協力研究員

研究要旨：ヒトに感染するノロウイルス(HuNoV)は、感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、冬季に多発する非細菌性食中毒の原因ウイルスとしてもよく知られている。HuNoV感染症による患者数は数万人規模に達するなど、社会的、経済的ダメージは極めて深刻である。HuNoVはヒトの体内以外で増殖できない。つまり、HuNoVはヒトが感染源であり、ヒトが維持し、ヒトからヒトへの伝播形態によって大規模な流行を起こしているのである。HuNoVの流行基盤であるヒト-ヒト感染を効果的に予防することができれば、HuNoVの流行、大規模食中毒を防ぐことが可能になる。そのため、ワクチン開発並びに実用化が切望されている。

本研究では、HuNoVのウイルス様中空粒子(VLP)を基盤とした第一世代ワクチン、第二世代ワクチンとしてリバーシジェネティックスの手法を応用したノロウイルスの弱毒化生ワクチン、第三世代としてノロウイルスの中和エピトープを抗原としたペプチドワクチンなどのHuNoVワクチンの開発研究を行う。