

れる。

3. H7N9 不活化全粒子ワクチン免疫原性の評価

これまでの臨床試験の結果から、H7N9 ワクチンのヒトでの免疫原性は、他のワクチンよりも低いと考えられている。我々のヒト化マウスのシステムで、この免疫原性の差異を識別可能か否か検証するため、11名のドナーから各2匹ずつのヒト化マウスを作製し、それぞれ H7N9 不活化全粒子ワクチン (NIBRG-268) もしくは H3N2 不活化全粒子ワクチン (IVR-165) を接種した。その後、血清中のヒト抗 HA IgG 抗体価 (図 2A) と脾臓中のヒト抗 HA IgG 抗体産生細胞数を比較した (図 2B)。すると、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た。

4. 免疫原性を改善した変異型 H7 HA ワクチンの開発

免疫バイオインフォマティクスにより、HA タンパクの一次構造から免疫原性を数値化する手法が開発されている。実際、この手法で H7 HA の免疫原性を数値化すると、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た (図 3)。

D. 考案

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、記憶 B リンパ球と T リンパ球がドナー由来であるため、ワクチン接種に対する免疫記憶応答をこれらヒト由来細胞のみで完結させることが可能である。さらに、乳幼児を除き、ほとんどの健常人が過去のインフルエンザ罹患歴、ワクチン接種歴を反映した免疫記憶を有していること、そしてインフルエンザワクチンに対する抗体応答は、この免疫記憶に依存することを考慮すると、ドナー由来の免疫記憶を再構築できることも本ヒト化マウスの大きな利点の 1 つである。

実際、このヒト化マウスを用いることにより、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。まず、不活化全粒子ワクチンと HA ワクチンの免疫原性に差異がないことが確認され、どちらの剤形のワクチンも免疫原性評価に利用可能であると考えられた。さらに、H7N9 ワクチンの低免疫原性が、本マウスモデルにおいて再現可能であることを明らかにした。そのため、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。

E. 結論

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。

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., Nobusawa, E. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 virus by using monoclonal antibody escape mutants. *J. Virol.* 88, 12364-12373, 2014
- 2.) Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., Rajewsky, K. 2014. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur. J. Immunol.*, 44, 1258-1264, 2014.
- 3.) 安達悠、高橋宜聖、阿戸学 2014. インフルエンザワクチンの免疫原性と抗原エピトープ 感染炎症免疫 44、22-31

2. 学会発表

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.) 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)

- 3.) 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)
- 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.) 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)
- 6.) 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)
- 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)

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

図1 インフルエンザワクチンに対するヒト液性記憶応答の再構築

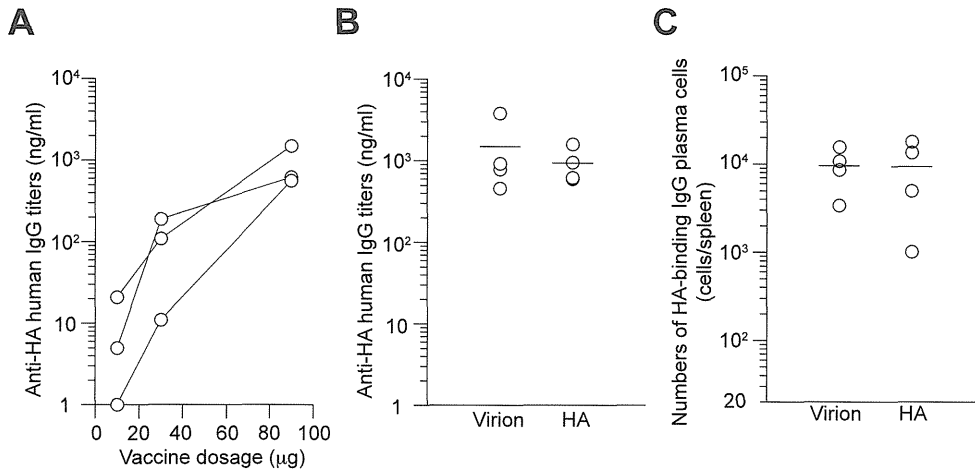


図2 H7N9ワクチンとH3N2ワクチンの免疫原性の比較

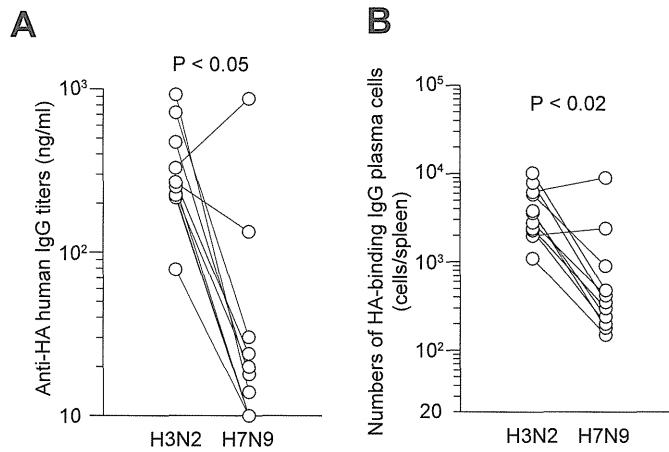
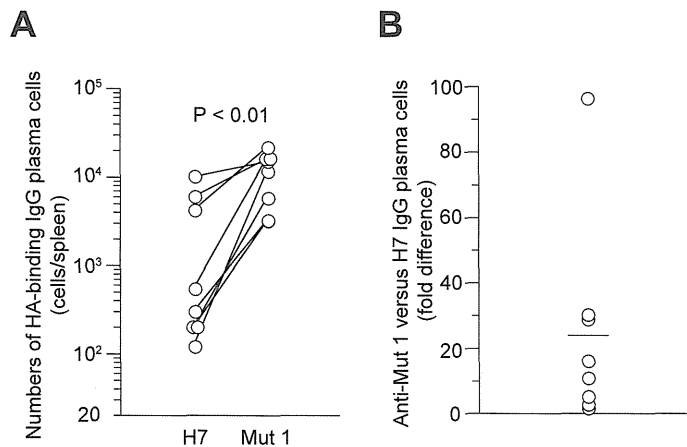


図3 免疫原性を改善したH7ワクチンの開発



VLP を用いた万能インフルエンザワクチンの開発

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
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

研究要旨：

現行のインフルエンザワクチンは、カバーできる流行ウイルスの範囲が狭く、有効な免疫を長期に渡って維持することができないという問題点がある。そのため、激しく変異するウイルスに対応するため毎年ワクチンの接種が必要というのが現状である。この問題を解決するため、保存性の高い領域を組み込んだ 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。そのためにまず VLP ワクチン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によって、インフルエンザに関連する国民の健康被害を低減できると期待される。

A. 研究目的

現行の季節性インフルエンザワクチンには、対応できる流行ウイルスの範囲が狭いという問題点がある。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。また、現在主に使用されている季節性インフルエンザワクチンでは、有効な免疫を長期に渡って維持することは難しい。このような状況にあるため、季節性インフルエンザに対応するためには、毎年ワクチンを接種しなければならない。そこで本研究では、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。これによって、インフルエンザに関連する国民の健康被害を低減することが可能になると期待される。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。もし、ワクチンで対応できるウイルスの範囲を拡大することが出来れば、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、鶏卵培養法によって製造されているため、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、培養基材に対する馴化変異は起こらないため、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。

このような利点を備えた VLP をベースにしたユニバーサルワクチンを開発することによって、インフルエンザに関連する国民の健康被害を低減できると期待される。

E. 結論

現行のインフルエンザワクチンの問題点を解決するために、保存性の高い領域を組み込んだ VLP の開発研究を実施した。今年度は、まず VLP ワクチン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によって、インフルエンザに関連する国民の健康被害を低減できると期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表

【国内会議】

山本典生、浜本いつき、田代真人
シクロスポリン A およびその誘導体のインフルエンザウイルス増殖に与える影響
についての解析
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月

【国際会議】

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
新しいワクチンの製造法（予定）
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

TBK1 の基質分子を標的とした新規アジュバントの開発

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

研究要旨：新規ワクチンの開発に伴い、標的とする宿主防御系を特異的に惹起したり、免疫原性の低いワクチン抗原でより強い免疫応答を誘導したりする必要が生じているが、既存のアジュバントとの組み合わせでは十分な効果が得られないケースが頻出している。また社会的に、より副反応が抑制されたワクチンの開発が必要とされるなど、これらの要請に合致する新規アジュバント開発のニーズは非常に高い。

本研究では、アジュバント効果に直接関与する、宿主自然免疫情報伝達経路のキナーゼ分子 TBK1 の基質を標的とした新規アジュバントの開発を目指している。我々はこれまでに、TBK1 と結合する宿主因子として 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、RGS タンパク質群を見出している。RGS タンパク質は、免疫細胞の遊走や免疫組織の形成に関わる GPCR であるケモカイン受容体下流の情報伝達系に作用し、獲得免疫発動に直接影響を与える可能性が指摘されている。そこで本年度は自然免疫受容体活性化が、TBK1 を介して RGS タンパク質にどのような変化をもたらすのかについて、RGS1 および RGS18 タンパク質をモデルに検討を行った。

A. 研究目的

近年の自然免疫受容体研究の進展に伴い、これらの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と考えている。

本研究に先立ち、「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 の下流に獲得免疫誘導に必要な未知のエフェクターが存在する」との仮説に基づき、このリン酸化酵素の新規結合分子のスクリーニングを行った。その結果 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、RGS1 タンパク質が TBK1 と結合していることが明らかになった。RGS タンパク質は、免疫細胞の遊走や免疫組織の形成に関わる GPCR であるケモカイン受容体下流の情報伝達系に作用し、獲得免疫発動に直接影響を与える可能性が指摘されている。RGS タンパク質は、20 以上のタンパク質からなるファミリーである。RGS1 は RGS タンパク質群の中でも免疫細胞で強く発現が見られ、免疫

機能の調節の役割を担うことが示唆されている R4 サブグループに属する。RGS1 以外の R4 サブグループと TBK1 との相互作用について調べたところ、TBK1 は調べた R4 サブグループを構成する全ての RGS タンパク質と結合することが明らかとなった。これらの結果から、自然免疫系が TBK1/RGS を介して GPCR 下流の情報伝達系を制御しており、この調節機構が獲得免疫の発動と密接に関わる可能性が示唆される。RGS タンパク質は、ケモカイン受容体をはじめとする免疫機能の制御以外にも様々な GPCR が関与する生体機能の制御に関わっている。統合失調症や心疾患などでは GPCR の感受性低下が病態改善の鍵となることが予想されるため、GPCR の制御因子である RGS タンパク質は、創薬の標的分子となっている。このような理由から RGS の機能を抑制する物質のスクリーニングは盛んに行われており、これらの物質がワクチン効果に直接影響を与える可能性が考えられる。

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っていく。本年度はまず、RGS タンパク質が本当にキナーゼ TBK1 の基質であるのか否かを明らかにし、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。

B. 研究方法

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

HA タグを付加した TBK1 及び IKK ϵ

(HA-TBK1 及び HA-IKK ϵ) 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。

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

Strep-Tactin カラムを用いて、HA-TBK1 と共発現させた Strep-RGS1 または Strep-RGS18 を細胞抽出物から精製した。対照として、RGS 単独発現細胞の抽出物からもそれぞれの RGS タンパク質を精製した。生成した 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。

C. 研究結果

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

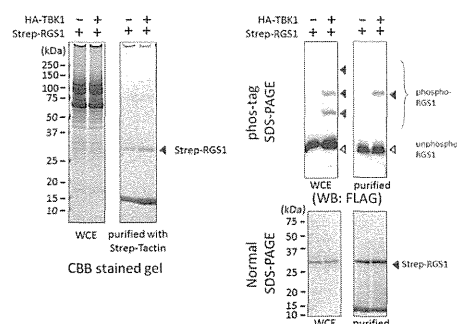


図1 RGS1タンパク質の精製およびリン酸化パターンの解析

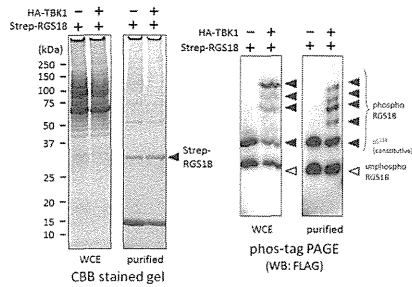


図2 RGS18タンパク質の精製およびリン酸化パターンの解析

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 非存在下では一本のバンドが、TBK1 存在下では4本のバンドが確認された(図1)。このことから、RGS1 は TBK1 発現により、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、TKB1 非存在下では2本、TBK1 存在下では少なくとも6本のバンドが確認されことから、RGS18 は TBK1 非存在下でも一箇所がリン酸化修飾をうけているが、TBK1 発現により最低2箇所、新たにリン酸化修飾を受けることが予想された(図2)。

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

RGS1 及び RGS18 とともに、CBB 染色で検出可能な量を精製することに成功したため、それぞれのタンパク質に対応するバンドを切り出して LC-MS/MS による質量分析にかけた。その結果、Phos-tag PAGE のパターンから予想されたとおり、TBK1

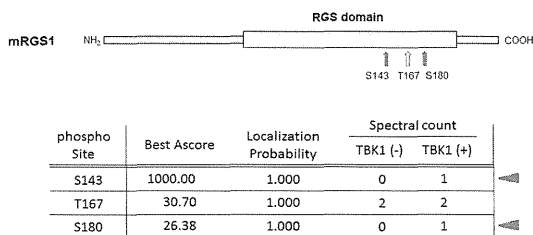


図3 RGS1タンパク質の質量分析の結果

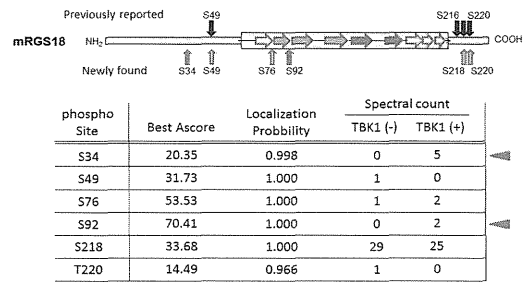


図4 RGS18タンパク質の質量分析の結果

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、これらの修飾は TBK1 非発現細胞では見られなかった(図3)。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(図4)。

D. 考案

RGS1 および RGS18 は、TBK1 と結合するだけでなく、TBK1 のキナーゼ活性の上昇が起こる TBK1 強制発現により共にリン酸化修飾がみられることから、これらは TBK1 のリン酸化基質である可能性が極めて高い。一方で TBK1 の強制発現系だけではなく、ウイルス感染や LPS 刺激などの自然免疫受容体の刺激により活性化された TBK1 によって RGS の同様の部位にリン酸化修飾が見られるか否かは今後確認する必要がある。

今回明らかになった RGS1 と RGS18 のリン酸化部位は、2つのタンパク質間で保存されていなかった。またそれぞれの TBK1 依存的リン酸化部位は、RGS タンパク質 R4 サブグループ内で保存されているアミノ酸残基ではなかった。なぜ TBK1 によりリン酸化修飾を受ける部位が RGS タンパク質間で異なるのかについては今後明らかにするべき課題として残

されたが、現時点でもいくつかの可能性をあげることができる。RGS タンパク質は、自然免疫受容体刺激により i) 発現量が増加するもの、ii) 発現量が減少するもの、iii) 発現量の変化が見られないもの、の3種類に分けることができる。RGS1 は i) のグループに属し、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) であることが報告されている。一方 RGS18 は ii) のグループに属し、自然免疫受容体刺激でタンパク質量が減少する。すなわち、いずれも自然免疫受容体刺激により量的変化が起こるが、変化の方向は逆である。TBK1 のリン酸化がこのようなタンパク質の量的変化に直接関わるとすると、TBK1 は RGS タンパク質の量的変化に対して異なる効果をもたらすために、異なる部位を修飾しているのかもしれない。本研究で RGS1 と RGS18 の TBK1 のリン酸化修飾標的残基が明らかになったことで、それぞれの修飾部位特異的抗体の作成が可能になった。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。

E. 結論

RGS タンパク質は TBK1 活性化依存的にリン酸化修飾されることが明らかとなり、自然免疫受容体による GPCR 制御系の存在が示唆された。TBK1 のリン酸化修飾の標的である RGS タンパク質ファミリーには、自然免疫受容体により逆の量的変化が見られるものがあるが、これらの

TBK1 によるリン酸化部位は異なっていた。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 を標的としたアジュ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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakatsu Y, Matsuoka M, Chang TH, Otsuki N, Noda M4, Kimura H, Sakai K1, Kato H, Takeda M, Kubota T.: Functionally distinct effects of the C-terminal regions of IKK ϵ and TBK1 on type I IFN production. PLoS One. 9(4):e94999. 2014.

2. 学会発表

国内会議

なし

国際会議

なし

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

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

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

研究要旨：

安全性の高い新規生ワクチン創出のために、弱毒ウイルスが増殖できるような自然免疫系遺伝子をノックアウトした細胞を作出することを目指す。CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によりヒト iPS 細胞から I 型インターフェロン遺伝子群を欠失させることを初期目標とする。オフターゲット切断を避けるため、ミスマッチに敏感な truncated gRNA (tru-gRNA) を用い、Cas9 蛋白質と tru-gRNA の複合体をヒト iPS 細胞にエレクトロポレーションで導入する系を立ち上げた。遺伝子欠失には欠失領域を挟む同時切断が必要なため、切断効率の高い tru-gRNA の探索を行い、I 型インターフェロン遺伝子群欠失クローンを取得する。

A. 研究目的

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、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する。具体的にはゲノム編集技術によりヒト iPS 細胞の自然免疫遺伝子群をノックアウトし、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

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。

Tic 細胞の培養はゼラチンでコートした容器上でフィーダー細胞との共培養から開始した。次にマトリゲル (コーニング社) でコートした容器上で mTeSR1 培地 (STEMCELL Technologies 社) を使用することによりフィーダー細胞を不要とした。ここまでの培養はコロニーでの増殖・継代が必要であったが、さらに容器をヒトラミン 521 (BioLamina 社) でコートすることにより、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なった。

ゲノム編集には CRISPR/Cas9 システムを用い、標的配列は truncated gRNA (tru-gRNA: Fu et al. Nat. Biotechnol. 2014) に従って設計した。I 型インターフェロン遺伝子群のセントロメア側とテロメア側で転写されておらず繰り返し配列に乏しい領域内で、GN16NGG という配列を検索した。得られた配列の 5' 末端に G を付加することにより T7RNA ポリメラーゼによる転写開始に適した配列を得た。オフターゲット切断を避けるため、得られた GGN16 と完全一致あるいは 1 塩基のみ mismatches する配列であり、かつ NGG あるいは NGA あるいは NAG という配列が続く配列がヒトゲノム上で標的配列以外に存在しないものを選択した。

in vitro での tru-gRNA の切断活性は Guide-it Complete sgRNA Screening System (タカラバイオ社) を用いて調べた。

Cas9 蛋白質と tru-gRNA の複合体の電圧ポレーションは以下のように行った。T7 プロモーターから tru-gRNA が転写されるカセットを PCR で増幅し、それを鋳型として MEGAshortscript T7 Transcription Kit (ライフテクノロジーズ社) を用いて tru-gRNA を合成した。His タグ及び核移行シグナルが付加された *Streptococcus pyogenes* Cas9 蛋白質は PNA Bio 社から購入した。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電圧ポレーションを行った。ヒト幹細胞 Nucleofector スターターキット (ロンザ社) 及び Nucleofector II (ロンザ社) を用いた。

電圧ポレーション 2 日後に細胞を回収し、GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (ライフテクノロジーズ社) 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。

C. 研究結果

CRISPR/Cas9 システムは精力的に研究が進められているが tru-gRNA を用いた報告は少ない。通常の gRNA は 20 塩基の認識配列を持つのに対して、tru-gRNA は 17-18 塩基の認識配列を持ち、 mismatches に敏感であると報告されている。まず *in vitro* で実際に tru-gRNA が gRNA 同様の配列特異的切断活性を示すのかを検討した。

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。

Tic 細胞への CRISPR/Cas9 システム導入は当初ウイルスベクターを用いる計画であったが、Cas9 蛋白質と tru-gRNA の複合体を直接電圧ポレーションで導入することに変更した。その理由は以下の通りである。1) 多くのウイルスベクターは細胞の核内で DNA から遺伝子発現を行うため、その DNA 自体が細胞ゲノムに組み込まれる可能性があること。2) DNA からの Cas9 蛋白質の発現では Cas9 蛋白質存在時間が長く、切断効率を高めるために発現量を増やすとオフターゲット切断も起こりやすくなること。

Cas9 蛋白質と tru-gRNA の複合体の Tic 細胞への導入にあたっては、tru-gRNA の報告論文に記載されている VEGFA 遺伝子を標的とする tru-gRNA を用いて電圧ポレーションの条件検討を行った。その後、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 細胞に電圧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

ゲノム編集は配列特異的な DNA 二本鎖切断から開始される。ゲノム編集による遺伝子ノックアウトでは蛋白質コード領域内に DNA 二本鎖切断変異を導入し、non-homologous end joining (NHEJ) による修復の結果としてフレームシフトを生じさせる手法が広く使われている。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。遺伝子欠失は複数の DNA 二本鎖切断が生じた場合に本来連続していなかった断端同士が NHEJ により連結されることにより生じる。それには (両アレルでの) テロメア側及びセントロメア側の同時切断が必要であり、高い切断効率が求められる。

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 システムは Cas9 蛋白質と gRNA から構成され、gRNA と標的 DNA 間の相補性により配列特異性が確保されている。複数の標的配列に対応しやすく、また塩基配列に基づいたオフターゲットの想定が行いやすい長所がある。

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。

in vitro では tru-gRNA はすべて設計通りの切断活性を示した。一方で細胞内での

変異導入効率は標的配列ごとに異なっていた。CRISPR/Cas9 システムの切断効率は標的配列の塩基構成のみならず、クロマチン構造など様々な因子に影響されると考えられており、細胞内での切断効率は実験的に調べる必要があることが確認された。ただし変異導入効率は DNA 二本鎖切断後に NHEJ による修復過程で変異が導入されたものの割合であり、切断効率自体は変異導入効率より高いものと考えられる。

tru-gRNA の検索は I 型インターフェロン遺伝子群近傍でのみ行ったが、遺伝子欠失を目標としているため、検索範囲は遺伝子間領域の範囲内で拡大が可能である。その中で切断効率の高い tru-gRNA を選択し、Cas9 蛋白質と tru-gRNA の複合体を複数同時に細胞内に導入することにより、I 型インターフェロン遺伝子群を欠失させたクローンを取得できると考えられる。

E. 結論

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た。オフターゲット切断の起こりにくい系として、tru-gRNA を用い、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。細胞内での切断効率は tru-gRNA ごとに異なるため、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

なし

2. 学会発表

【国内会議】

なし

【国際会議】

なし

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

Ⅲ. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」

機関名：国立感染症研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
Leukocytopenia following influenza vaccination. International Medical Sciences Conference 2014	Ato M.	Translational Research from Molecular Basis to Health Care	2014年7月	国外
B cell pathways for protective memory responses against influenza virus infection. (シンポジウム、口頭)	Takahashi, Y., Ato, M., Adachi, Y.	第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム in 奈良	2014年9月	国内
Investigation of human norovirus shedding and genome evolution in a single infection cycle in infant	Motohiro Miki, YoungBin Park, Kei Haga, Yen Hai Doan, Yoshiyuki Suzuki and Kazuhiko Katayama	台北、台湾(17th International Conference on Emerging Infectious Diseases)	2015	国外
Reverse genetics system of Human and Murine Norovirus	Kazuhiko Katayama, Reiko Takai-Todaka, Akira Nakanishi, Kosuke Murakami, Tomoichiro Oka, Susana Guix, Tyler M. Sharp, Robert L. Atmar, Sue E. Crawford, and Mary K. Estes	台北、台湾(17th International Conference on Emerging Infectious Diseases)	2015	国外
Functional complementation of VP2 in murine norovirus、口演発表	Yoshida K, Zhou Y, Takai-Todaka R, Katayama K, and Nakanishi A	台北、台湾(17th International Conference on Emerging Infectious Diseases)	2015	国外
レポーター遺伝子を内包したノロウイルス感染性粒子作製の試み、口演発表	戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、朴英斌、中西章、脇田隆字、片山和彦	横浜（第62回日本ウイルス学会学術集会）	2014	国内
ノロウイルスRNA依存的RNAポリメラーゼのin vitro転写活性	下池貴志、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦	横浜（第62回日本ウイルス学会学術集会）	2014	国内
ウイルス感染防御抗体と腸内細菌（シンポジウム、口頭）	高橋宜聖	日本食品免疫学会第10回学術大会	2014年10月	国内

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」

デングウイルス(DENV)のエンベロープタンパク質を持つウイルス様粒子の作製と性状解析	山口喜之、小島朝人、長谷川秀樹、鈴木忠樹	第62回日本ウイルス学会学術集会	2014年11月	国内
高病原性鳥インフルエンザA (H5N1) ウイルスの経鼻不活化全粒子ワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析	齊藤慎二、van Riet Elly、相内章、鈴木忠樹、池田千将、伊藤良、泉地恭輔、高橋宜聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹	第62回日本ウイルス学会学術集会	2014年11月	国内
低毒性型合成二重鎖RNA uPICを用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発	大原有樹、鈴木忠樹、中野哲郎、齊藤慎二、相内章、秋本和憲、長谷川秀樹	第62回日本ウイルス学会学術集会	2014年11月	国内
経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗体応答の比較	長谷川秀樹、相内章、鈴木忠樹、川口晶、田村慎一、小田切孝人、田代真人	第18回日本ワクチン学会学術集会	2014年12月	国内
経鼻インフルエンザワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析	齊藤慎二、van Riet Elly、相内章、鈴木忠樹、大原有樹、池田千将、伊藤良、泉地恭輔、高橋宜聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹	第18回日本ワクチン学会学術集会	2014年12月	国内
経鼻インフルエンザワクチンの動態と抗体応答	相内章、鈴木忠樹、齊藤慎二、田村慎一、幸義和、小田切孝人、田代真人、清野宏、長谷川秀樹	第18回日本ワクチン学会学術集会	2014年12月	国内
合成二本鎖RNA uPICをアジュバントとする経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発	鈴木忠樹、大原有樹、中野哲郎、齊藤慎二、寺内芳彦、相内章、長谷川秀樹	第18回日本ワクチン学会学術集会	2014年12月	国内
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 (口頭)	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	第18回日本ワクチン学会学術集会	2014年12月	国内
Persistent local germinal centers select cross-reactive antibody into immunological memory following influenza virus infection. (口頭)	Adachi, Y., Inoue, T., Kurosaki, T., Ato, M., Takahashi, Y.	第43回日本免疫学会	2014年12月	国内
CD273+ memory B cells replenish bone marrow plasma cells in the steady state after influenza vaccination.	Onodera, T., Adachi, T., Tsubata, T., Kurosaki, T., Adachi, Y., Ato, M., Takahashi, Y	第43回日本免疫学会	2014年12月	国内

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」

Influenza A virus (IAV) vaccination effectively induces germinal center independent protective immunity.	Miyauchi, K., Sugimoto-Ishige, A., Takahashi, Y., Hasegawa, H., Takemori, T., Kubo, M.	第43回日本免疫学会	2014年12月	国内
In vivo imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded YC3.60 calcium indicator.	Adachi, T., Yoshikawa, S., Onodera, T., Takahashi, Y., Karasuyama, H.	第43回日本免疫学会	2014年12月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin.	Kobayashi-Isihara M, Takahashi H, Ohnishi K, Nishimura K, Terahara K, Ato M, Itamura S, Kageyama T, Tsunetsugu-Yokota	PLoS One. 9(6):e99201	2014	国外
Clinical Characteristics of Yamakagashi (Rhabdophis tigrinus) Bites: a National Survey in Japan, 2000-2013.	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.	J Intensive Care. 2:19.	2014	国外
Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 virus by using monoclonal antibody escape mutants.	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.	J. Virol. 88, 12364-12373.	2014年11月	国外
Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013.	Fang-TzyWu, Hsieh-Cheng Chen, Catherine Yen Ching-Yi Wu, Kazuhiko Katayama, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu.	Arch Virol.	2015	国外
Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan.	Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y.	J. Vet. Med. Sci.	2014	国外

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」

Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA.	Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK.	Proc Natl Acad Sci U S A.	2014	国外
ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型2014年版	片山和彦	IASR	2014	国内
ノロウイルス感染症とその対策	片山和彦	救命救急	2014	国内
質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性	片山和彦	日本医事新報	2014	国内
特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは	片山和彦	調剤と情報	2014	国内
備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態	片山和彦	感染症対策ICTジャーナル	2014	国内
ノロウイルスの感染予防	片山和彦	少年写真新聞社 中学保健ニュース	2014	国内
ノロウイルスの感染予防	片山和彦	少年写真新聞社高校保健ニュース	2014	国内
Generation of memory B cells inside and outside germinal centers.	Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., Rajewsky, K.	Eur. J. Immunol. 44, 1258-1264.	2014年5月	国外
インフルエンザワクチンの免疫原性と抗原エピトープ	安達悠、高橋宜聖、阿戸学	感染炎症免疫 44, 22-31	2014年8月	国内

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」

機関名：順天堂大学大学院

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
シクロスポリンAおよびその誘導体のインフルエンザウイルス増殖に与える影響についての解析、ポスター発表	山本典生、浜本いつき、田代真人	第62回日本ウイルス学会学術集会	2014年11月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Establishment of In-House Quantitative Real-Time RT-PCR Assay for HIV-1 Viral Load Measurement: Application to Evaluate Efficacy of ART in Ghanaian Patients in an Urban Setting., 論文発表	Barnor JS, Yamamoto N, Brandful J, Ampofo W, Bonney K, Bonney E, Odoom JK, Aidoo S, Alale M, Ntiml NA, Amoah YO, Ofori SB, Ndzinu I, Aziati ID, Addo NA, Nyarko A, Ido E, Ishikawa K, Yamaoka S	Journal of AIDS & Clinical Research	2014年6月	Ghana

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi-Isihara M, Takahashi H, Ohnishi K, Nishimura K, Terahara K, Ato M, Itamura S, Kageyama T, Tsunetsugu-Yokota	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	2014
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.	Clinical Characteristics of Yamakagashi (Rhabdophis tigrinus) Bites: a National Survey in Japan, 2000-2013.	J Intensive Care.	2	19	2014
Fang-TzyWu, Hsieh-Cheng Chen, Catherine Yen Ching-Yi Wu, Kazuhiko Katayama, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu.	Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013.	Arch Virol.	In press.	In press.	2015
Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y.	Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan.	J. Vet. Med. Sci.	76(7)	1045-1050	2014
Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK.	Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA.	Proc Natl Acad Sci U S A.	111 (38)	E4043-52	2014
片山和彦	ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型2014年版	IASR	35	ノロウイルス特集号	2014
片山和彦	ノロウイルス感染症とその対策	救命救急	17	12-15	2014
片山和彦	質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性	日本医事新報	4723	59-60	2014
片山和彦	特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは	調剤と情報	20	14-19	2014
片山和彦	備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態	感染症対策 ICTジャーナル	9		2014