

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
総合研究報告書

新型コロナウイルスの代理ウイルス感染系の確立と中和活性解析系への応用

研究分担者 大隈 和 関西医科大学医学部 微生物学講座 教授

研究要旨：新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染後の回復者やワクチン接種者の献血血液中には SARS-CoV-2に対する中和抗体をはじめ種々の抗ウイルス活性物質等が存在すると考えられるが、その安全性の評価は十分ではない。その評価にはSARS-CoV-2感染実験が必要であるが、本来BSL3レベルで行う必要があるため実施可能施設等の制限がある。そこで、BSL2レベルで取り扱い可能な水疱性口内炎ウイルス(VSV)を用いた代理ウイルスを開発し、SARS-CoV-2を用いたウイルス感染系との比較を行い、BSL2レベルで実施可能な感染評価系の構築を目指す。具体的には、SARS-CoV-2臨床分離変異株等からスパイクタンパク遺伝子をクローニングした後、スパイクタンパク質発現組換えVSVの産生を試みた。SARS-CoV-2の代理ウイルス感染系を確立することで、血液製剤の安全性確保と安定供給に貢献する。

研究協力者

上野孝治 関西医科大学医学部 微生物学講座
助教

A. 研究目的

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)について、感染後の回復者やワクチン接種者の献血血液にはSARS-CoV-2に対する中和抗体をはじめ種々の抗ウイルス活性物質が含まれると考えられるが、現状ではそれらの安全性が十分に評価されているとは言えない。この安全性評価のためには、SARS-CoV-2の感染実験による評価系が必要であるが、SARS-CoV-2はBSL3レベルでの取り扱いが求められるため、実施可能施設に限られる等の様々な制約があり、生ウイルスの使用は容易ではない。

そこで本研究では、BSL2レベルでの取り扱いが可能な水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロープタンパク質（Gタンパク質）をSARS-CoV-2スパイクタンパク質に置き換えた代理ウイルスを開発する。この代理ウイルスによる*in vitro*感染系は、血液中の中和抗体の検出等に有用であり、これらの性状を解析することで血液の安全性確保に貢献できる。

B. 研究方法

・SARS-CoV-2スパイク遺伝子のクローニング

各種SARS-CoV-2から抽出したウイルスRNAを用いて逆転写反応によりcDNAを合成した後、特異的PCRにてSARS-CoV-2スパイク遺伝子を増幅した。

・組換えVSV感染性クローンのプラスミドの作成
SARS-CoV-2（オリジナル株、アルファ株、オミクロン株）よりスパイクタンパク遺伝子をクローニン

グし、野生型VSVのGタンパク遺伝子と置換した。

・組換えVSVの産生

293T細胞あるいはVeroE6/TMPRSS2細胞にT7発現ワクシニアウイルスを感染させたのち、組換えVSVプラスミドおよびVSV-N, P, G, L発現ヘルパープラスミドをトランスフェクションし、組換えVSVを含む上清を回収した。

・プラークアッセイ

VSVあるいはSARS-CoV-2を感染させた後、メチルセルロース含有培地を添加して2日間培養し、メタノール固定してクリスタルバイオレットで染色した。

C. 研究結果

SARS-CoV-2は株によりスパイクタンパク質の性質が大きく異なるため、各変異株のスパイクタンパク質を有する代理ウイルスが必要となる。臨床分離株の各種SARS-CoV-2（オリジナル株、アルファ株、デルタ株、オミクロン株）から抽出したウイルスRNAを用いてスパイク遺伝子を増幅し電気泳動した結果、いずれのウイルスRNAからも予想された3.8kbp付近にバンドが検出された。

SARS-CoV-2各株よりスパイクタンパク遺伝子をクローニングし、VSV感染性クローンプラスミドへのサブクローニングを行った。これらを用いて組換えVSV産生実験を施行したところ、対照の野生型VSVおよびEGFP発現組換えVSV(VSV-EGFP)に関してはVSV特有のコメットサインあるいはEGFP発現が目視あるいは蛍光顕微鏡で観察され、ウイルス産生が確認できた。（図1、図2）

しかし、スパイクタンパク質発現組換えVSVに関してはウイルス産生が確認できなかった。この原因として、VSV粒子は細胞表面でエンベロープタンパ

ク質を纏うが、SARS-CoV-2スパイクタンパク質のC末にER retention signalが存在するために、ウイルス粒子へのスパイクタンパク質の供給がうまくいかない可能性が考えられた。そこでER retention signal を含むC末の18アミノ酸を欠失したスパイクタンパク遺伝子をサブクローニングした。さらにウイルス感染を可視化し、観察を容易にするためにEGFP発現ユニットをスパイク発現組換えVSVプラスミドに組み込んだ。現在、ウイルス産生の可否を検討中である。

(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

D. 考察

VSVはスパイクタンパク質に相当するGタンパク質を細胞表面でウイルス粒子に取り込んだ後に細胞外へ放出されるが、SARS-CoV-2は主にER-Golgi周辺でウイルス粒子にスパイクタンパク質を取り込み、エクソサイトーシスにより細胞外へ放出される。従って、SARS-CoV-2スパイクタンパク質をVSV粒子により効率良く取り込ませるためには、スパイクタンパク質を細胞表面に発現させる必要がある。そのためスパイクタンパク質のC末に存在するER retention signalを欠失させることで、VSV粒子への取り込み効率が上がると考えられる。

SARS-CoV-2およびスパイクタンパク質発現VSVは細胞変性効果(CPE)あるいは感染細胞死を観察することで感染を確認するが、EGFP発現組換えVSVを用いることでCPE等の細胞の変化が生じる以前からウイルス感染の存在を確認可能で、感染細胞死の誘導およびその広がりを観察できるようになる。

E. 結論

SARS-CoV-2スパイクタンパク質を発現する組換えVSVを作成中である。尚、スパイクタンパク質全長にはC末にER retention signalが存在するため、細胞表面でエンベロープ（スパイク）を受け取るVSV粒子にスパイクタンパク質をより効率良く供給するために、ER retention signalを含む領域を欠失させたスパイクタンパク質を作成した。

この改善により、VSVを用いたSARS-CoV-2代理ウイルス感染系が確立され、様々なSARS-CoV-2変異株においても、抗ウイルス活性物質を含む可能性のある血液について安全性を検証できるようになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

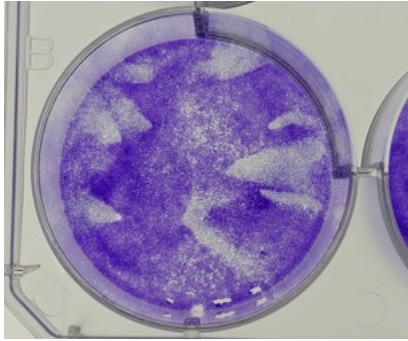


図1 .野生型VSV感染による
コメットサイン

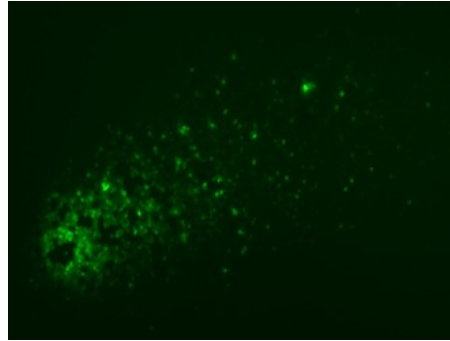


図2 .VSV-EGFP感染細胞に
おけるEGFP発現