RNAウイルスベクター系の開発と実用化

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-06-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00051039

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

RNAウイルスベクター系の開発と実用化

（課題番号：09357002）

平成９～11年度科学研究費補助金（基盤研究(A)(1)）
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者　榎　並　正　芳
（金沢大学医学部助教授）

金沢大学附属図書館
8000-88994-3

はしがき

研究組織

研究代表者：榎並正芳（金沢大学医学部・助教授）
研究分担者：伊藤康彦（三重大学医学部・教授）
研究分担者：加藤　篤（国立感染症研究所・室長）
研究分担者：黒田和道（大阪薬科大学・助教授）
研究分担者：佐藤　威（国立感染症研究所・主任研究官）

研究経費

平成　９年度	11,500 千円
平成１０年度	6,200 千円
平成１１年度	6,100 千円
計	23,800 千円

華　者　宮　増

インフルエンザウイルスベクター系の開発と実用化

金沢大学医学部・助教授・榎並正芳
大阪薬科大学薬学部・助教授・黒田和道
国立感染症研究所・主任研究官・佐藤　威

要　旨

インフルエンザウイルス WSN 株を親株とする弱毒変異株 NS 遺伝子(N110) を利用したベクター系を開発した。組換え体ウイルスはマウスに対し、高度に弱毒化され、また免疫原性を有していた。外来蛋白発現量は野生株NA蛋白と同程度であった。そこで、ワクチンベクターとしての応用を試みた。

目　的

ベクターは基礎生物学の手法として、あるいは遺伝子治療やワクチンの開発、有用生理活性物質の大量生産の手法としても重要である。インフルエンザウイルスはRNA ウイルスであるが、ベクターとして、DNA ウイルスと比較していくつかの長所が存在する。本件究では、インフルエンザウイルスをベクター、特にワクチンベクターとして、開発実用化することを目的とした。

方法と結果

インフルエンザウイルス WSN 株の NS1 蛋白のC端を削除した短い NS1 蛋白をコードする遺伝子の下流に、自己切断活性を持つ 17 アミノ酸からなる 2A プロテアーゼ配列を介在配列として、モデル遺伝子としてクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を導入した（図 1、NS2ACAT)。組換え体ウイルス感染MDBK細胞内ではCAT蛋白は NS1 蛋白との融合蛋白として発現され、約 20％が速やかに自己切断され成熟型蛋白となった（図 2)。発現量は WSN 株 NA 蛋白と程度であった。組換え体ウイルスは温度感受性で、マウスに対し高度に弱毒化されていた（図４)。致死量のインフルエンザウイルス WSN 株チャレンジ実験では、組換え体ウイルス感染により完全なプロテクションが見られ、高度な免疫原性を有していることが示された。CAT 蛋白に対する CTL 誘導能、インターフェロンγ誘導能は WSN 株と比べ低かったが、これはウイルスの増殖能の低さによ

るものと思われる。また、感染 12 時間後には CAT 蛋白の約 50%が細胞外に検出されたが、これは細胞の CPE によるもと考えられる。生体内でも同様に細胞外へ放出され、免疫の抗原となることが期待さる。実際、感染マウスの血清中に弱いながらも抗 CAT 抗体化の上昇が確認された。また CAT 遺伝子は、ウイルスを経代しても比較的安定に保持された（図３）。

次に、WSN 株と組換え体ウイルスのサル脳内接種実験を行った。WSN 株を、視床、および側坐核に脳内接種したところ、死亡または瀕死に陥った。そこで、WSN 株と NS2ACAT 株を接種したサル中枢神経における病変の検索を行った。病変は、側脳室、第４脳室における、脈絡髄膜炎、上衣細胞の変性、側脳室周囲の囲管性細胞浸潤、アストログリアの増生、脳室の拡張でった。WSN 株は致死的であり、NS2ACAT 株は致死的では無かったが、病理学的には類似の所見であった。

次に、ワクチンベクターとしての応用を目指し種々の遺伝子の導入と解析を試みた。導入を試みた遺伝子は、HIV ワクチンの開発を目指して HIV-I gp41 及び nef 遺伝子、結核ワクチンの開発を目指して結核菌 Antigen 85A 遺伝子、癌の遺伝子治療として Bax 及び Bcl2 遺伝子を取り上げた。組換え体ウイルスの増殖は、NS2ACAT ウイルスと比較して悪く、導入蛋白発現量も満足の行くものでは無かった。そこで、ウイルスの増殖を阻害せず、かつ外来遺伝子の発現も促進される様、導入方法を再検討している。

考　察

我々が作成した NS 遺伝子を利用したベクター系 NS2ACAT は従来の NA 遺伝子を利用したベクター系と比較し蛋白の発現量が高く、ワクチンベクターとして有効であることが示された。一方、いくつかの導入遺伝子を検討したところ遺伝子によっては発現量や安定性に問題の有ることが明らかとなってきた。そこで、より、応用性を高めるため、今後は導入方法の再検討も必要と思われる。

論文発表

1)　M. Enami, K. Kuroda, S. Kawashima, and Y. Watanabe. A novel influenza virus vector system. Sbmitted for publication.
2) S. Itamura, H. Nishimura, M. Enami, ... Influenza A virus with genetically engineered hemagglutinin of virulent avian

H5N1 virus isolated from human is Attenuated and confers protection of mice from lethal challenge. Sbmitted for publication.
3) M. Enami, and K. Enami. Characteriztion of influenza virus NS1 protein using a novel helper-virus-free reverse genetic system. J. Virol., 74, 2000. in press.
4) A. Takada, N. Kuboki, K. Okazaki, A. Ninomiya, H. Tanaka, H. Ozaki, S. Itamura, H. Nishimura, M. Enami, M. Tashiro, K. F. Shortridge, and H. Kida. A virulent avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. J. Virol. 73, 8303-8307, 1999.
5) 榎並正芳. インフルエンザウイルスの遺伝子工学と応用. ウイルス 49, 47-52, 1999.
6) 榎並正芳. インフルエンザウイルスベクター. 第2版 微生物学実習提要, 東京大学医科学研究所学友会編, 丸善, 東京, pp194-196, 1998.
7) 榎並正芳. インフルエンザウイルスの分子生物学. ーウイルス工学と細胞生物学の接点. 実験医学 15, 2356-2361, 1997.
8) 榎並正芳. インフルエンザウイルス NS1, NS2 蛋白の構造, 機能と発現制御. 日本臨床 55, 2605-2609, 1997.
9) Hosaka Y., Taguchi K., Iwamoto T., Kuroda K., Tsuruoka H., Xu H., Hamaoka T. Ultrastructure of murine tumour cell lines defective in MHC class I expression before and after interferon-g treatment. J. Electron Microsc., 47, 495-503, 1998.
10) Xu H., Yasui O., Tsuruoka H., Kuroda K., Hayashi K., Yamada A., Ishizaki T., Yamada Y., Watanabe T., Hosaka Y.Isolation of type B influenza virus from the blood of children. Clin. Infect. Dis. 27, 654-655, 1998.
11) Hosaka Y., Kuroda K., Ikeura A., Iwamoto T., Suzuki Y. Binding of influenza and paramyxoviruses to group B Streptococcus with the terminal sialyl-galactose linkage. J. Electron Microsc., 47, 169-174, 1998.
12) Tsuruoka H., Xu H., Kuroda K., Hayashi K., Yasui O., Yamada A., Ishizaki T., Yamada Y., Watanabe T., Hosaka Y. Detection of influenza virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of influenza patients. Jpn. J. Med. Sci. Biol., 50, 27-34, 1997.

口頭発表

1) Genetically engineered influenza virus as a vaccine strain for newly emerged virulent H5N1 viruses. S. Itamura, H. Nishimura, M. Enami, ... Frontiers of RNA virus Research II. January, 2000, Kyoto.

2) Application of the influenza virus vector. N. Takasuka, M. Enami, K. Kuroda, and T. Takemori. Frontiers of RNA virus Research II. January, 2000, Kyoto.

3) Attenuation of influenza virus by mutation of NS1 produced by reverse genetics. Y. Harada, C. Suzuki, T. Sagawa, M. Enami, and K. Kuroda. Frontiers of RNA virus Research II. January, 2000, Kyoto.

4) Development of a new influenza virus vaccine vector using a helper-virus-free reverse genetics system. XIth International Congress of Virology. August 1999, Sydney.

5) Reverse genetics. M. Enami. Fifty years of Influenza Surveillance – a challenge for the 21st Century. WHO, Geneva, February 1999.

6) 新型インフルエンザ（A/H5N1）に対するワクチンのマウスにおける防御効果。板村繁之、西村秀一、岩崎琢也、、、、、榎並正芳。第 47 回日本ウイルス学会、1999 年 11 月、横浜

7) 新型インフルエンザ（A/H5N1）に対するワクチン候補株弱毒化の遺伝学的基盤。板村繁之、西村秀一、岩崎琢也、、、、、榎並正芳。第 47 回日本ウイルス学会、1999 年 11 月、横浜

8) 香港 H5N1 インフルエンザウイルスに対するカモの弱毒ウイルス不活化ワクチンの感染防御効果。喜田宏、、、榎並正芳、、。第 47 回日本ウイルス学会、1999 年 11 月、横浜

9) 遺伝子組換型弱毒インフルエンザウイルスによる免疫反応の検討。高須賀直美、榎並正芳、、、。第 3 回日本ワクチン学会、1999 年 11 月名古屋。

10) インフルエンザウイルスの遺伝子工学と応用。RNA ウイルス研究の新展開。1998 年 11 月、名古屋

11) Reverse genetics of influenza virus. M. Enami. Internal Symposium on Influenza and other Respiratory Viruses. December 1998, Hawaii.

12) Influenza virus NS gene as a vector. M. Enami. Viral and Host Factors as Determinats of Virus

Pathogenesity. May 1998, Marburg.

13) A nove linfluenza virus vector system. Workshop on Negative Strand RNA Viruses. June 1998, Evanston.

14) インフルエンザウイルスベクター系の開発と応用。川島五月、、、榎並正芳。第 46 回日本ウイルス学会、1998 年 10 月、東京

15) 新型インフルエンザウイルス(H5N1) に対するワクチン開発 (I) リバースジェネティクスによるワクチン候補株の作成。板村繁之、西村秀一、、、、、、榎並正芳、、、。第 46 回日本ウイルス学会、1998 年 10 月、東京

16) 新型インフルエンザウイルス(H5N1) に対するワクチン開発 (II) 作成したワクチン候補株の病原性及び免疫原性の検討。西村秀一、板村繁之、、、、、、榎並正芳、、。第 46 回日本ウイルス学会、1998 年 10 月、東京

17) Improved technique to genetically manipulate influenza virus. M. Enami. 10th International Conference on Negative Strand Viruses. September 1997, Dublin.

18) Improved technique to genetically manipulate influenza virus. M. Enami. Froniers of RNA Virus research. May 1997, Kyoto.

19) 新しい遺伝子操作技術を用いたインフルエンザウイルス NS1 蛋白質欠損変異株の作成。第 45 回日本ウイルス学会 1997 年 9 月、京都

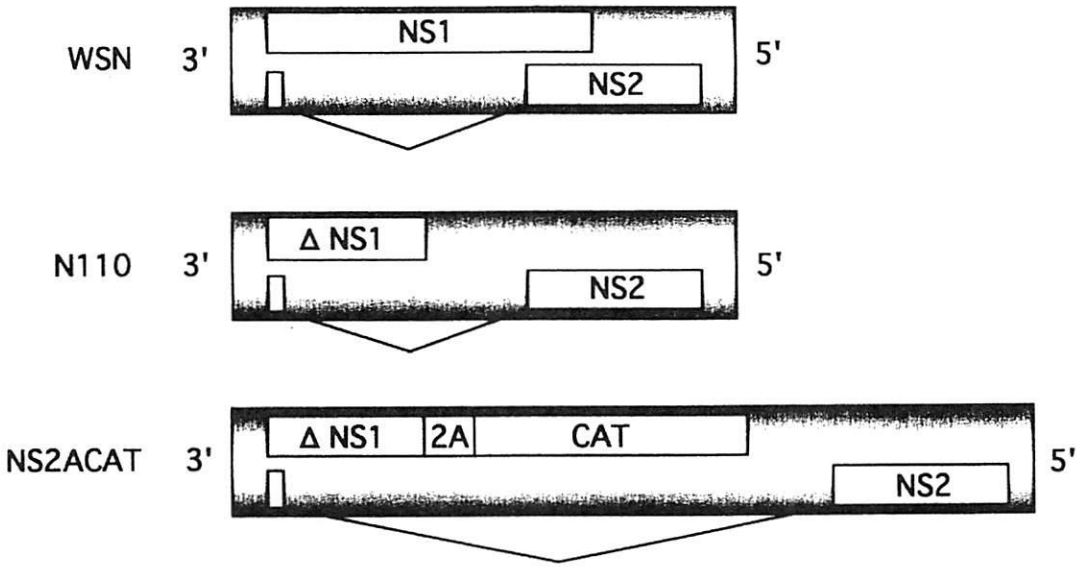

図１、組換体 NS 遺伝子の構造。

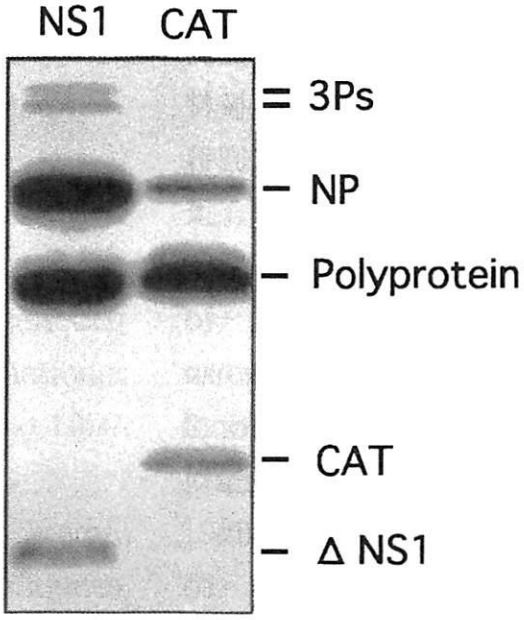

図２、NS2ACAT 感染 MDBK 細胞ないでの、CAT 蛋白の発現。

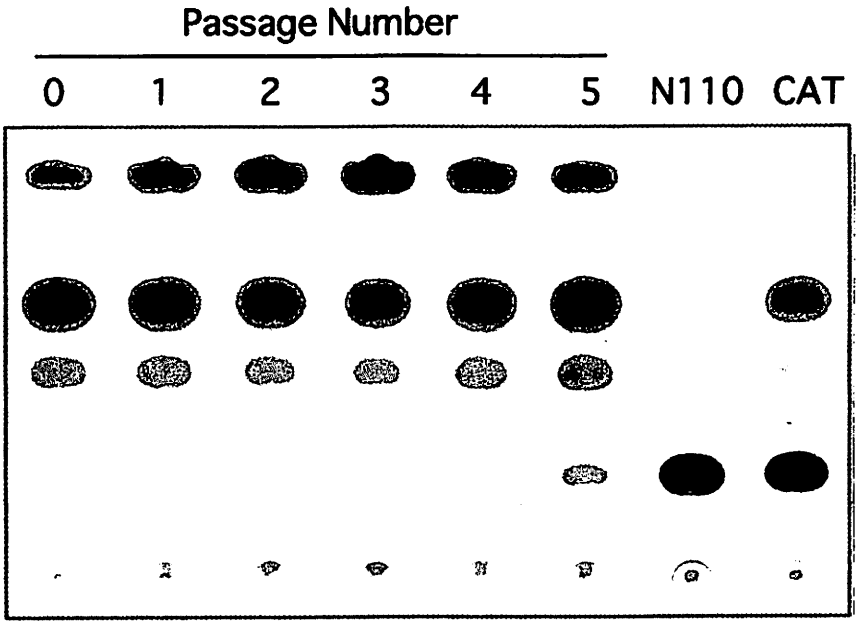

図３、NS2ACAT ウイルスの経代と CAT 発現の安定性。

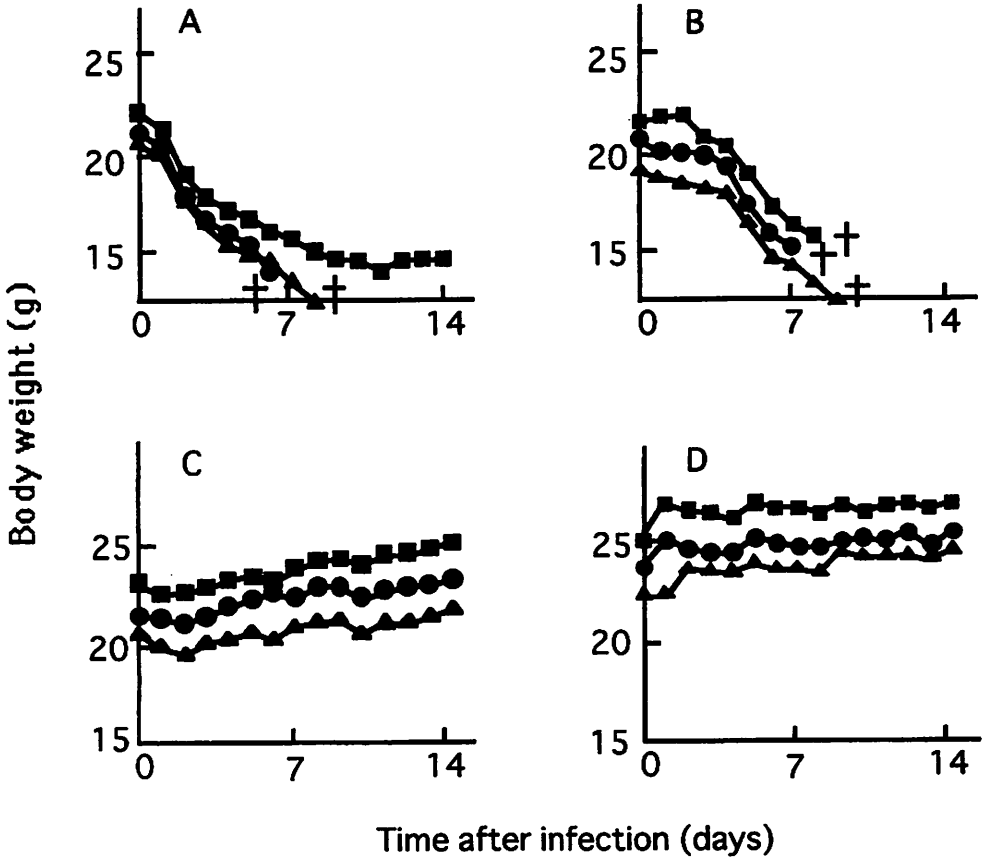

図４、NS2ACAT ウイルスのマウスに対する弱毒化と免疫原性。WSN (10^4pfu) (A)、 N110 (10^4pfu) (B)、 NS2ACAT (10^4pfu) (C)感染実験。 NS2ACAT (10^4pfu) 感染後、WSN (60 x LD50) チャレンジ実験 (D)。