Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

A recombinant varicella vaccine harboring a respiratory syncytial virus gene induces humoral immunity

Murakami, Kouki

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2016-09-21
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙第3311号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003311

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

A recombinant varicella vaccine harboring a respiratory syncytial virus gene induces humoral immunity

RS ウイルス遺伝子をもつ組換え水痘ワクチンによる液性免疫の誘導

指導教員： 神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 森 康子 教授
村 上 宏 起

【背景】

水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus, VZV) は、αヘルペスウイルス亜科に属すウイルスであり、水痘や帯状疱疹を引き起こす。小児までに初感染し、ウイルス感染後、神経節の中で終生、潜伏感染する。そして、免疫力が低下してくると再活性化して、神経分布に沿って帯状疱疹を引き起こす。その予防には、大阪大学の高橋理明博士らによって開発され、水痘生ワクチンとして世界で初めて認可された水痘弱毒生ワクチン Oka 株 (vOka) が使用されており、日本で定期接種も行われている。vOka は、小児へ水痘の予防に、高齢者へ帯状疱疹の予防にと、世界中で多くの使用実績があり、副反応もほとんどなく、有効性についても高く評価されている。このように、vOka が有効性と安全性の高い生ワクチンであり、多価ワクチンのワクチンベクターとして候補と成り得るといえる。

VZV は直鎖状の二本鎖 DNA をもつウイルスで、約 70 種の遺伝子 (ORF) をコードしている。その中にはウイルスの増殖に非必須な領域があり、相同組換えの標的として外来遺伝子に置き換えることができる。このように vOka をベースとして、別の病原体のもつ抗原遺伝子を組込んだ外来抗原発現組換え水痘生ワクチンを作製し、複数の感染症を同時に予防できる新しい組換え生ワクチンの開発を行ってきた。

今回、RS ウイルス (RSV) の抗原を発現した組換え水痘ワクチンウイルスの作製を試みた。RSV は、ウイルス性肺炎や気管支炎等の重篤な疾患の原因となることがある。RSV 感染は、生後 6 週間から 2 歳までの小児での発症例が多数で、乳児期においてはしばしば重症化する。また、高齢者や免疫不全者においても、重篤な疾患を発症することがある。予防には、現在のところヒト化モノクローナル抗体製剤はあるが、安全で有効なワクチンはない。RSV は、パラミクソウイルス科に属するマイナス一本鎖 RNA ウイルスである。ウイルスの膜タンパク質の Glycoprotein (RSV G) によって、A 型と B 型の 2 つに分類されている。RSV の膜タンパク質の RSV-G と Fusion protein (RSV F) は、中和抗体の標的抗原であることが知られている。

【目的】

RSV の抗原を発現する組換え水痘ワクチンウイルスを作製し、モルモットに免疫することで、VZV と、A 型と B 型の両方の型の RSV に対する液性免疫の誘導を確認する。

【方法】

vOka の全ゲノムを保持させた大腸菌を作製し、大腸菌の DNA 組換え機構を利用することで RSV の F タンパク質の遺伝子をもつ組換え vOka ゲノムを作製した。その組換え vOka ゲノムを VZV 感受性細胞 (MRC-5) に導入することで感染性の組換え水痘ワクチンウイルスを得た。得られた組換え水痘ワクチンウイルスによる RSV の F タンパク質の発現の確認、増殖性の比較などウイルスの性状解析を行った。モルモットへ接種を行い、VZV と RSV に対する抗体の誘導を確認した。

【結果】

[1] RS ウイルス抗原の遺伝子をもつ vOka ゲノムの作製

vOka ゲノムの ORF11 と ORF12 の間に Bacterial artificial chromosome (BAC) 配列を挿入することで、vOka の全ゲノムを保持させた大腸菌を作製した。大腸菌の DNA 組換え機構を利用することで、RSV の F タンパク質発現カセットを、水痘ウイルスの *in vitro* での増殖に非必須である ORF13 (thymidylate synthase) と置き換えることで、水痘ウイルスゲノムに挿入した (Fig. 1A, B, C)。次に I-SceI によりポジティブ選択マーカーの aphAI 配列を除いた (Fig. 1D, E)。そして、下記の組換え vOka (recombinant vOka: rvOka) の BAC ゲノムを大腸菌より回収した。

- A 型 RSV の F タンパク質 (RSV A-F) の発現カセットを挿入した組換え vOka-BAC ゲノム (rvOka- RSV A-F-BAC)
- B 型 RSV の F タンパク質 (RSV B-F) の発現カセットを挿入した組換え vOka-BAC ゲノム (rvOka- RSV B-F-BAC)

[2] RS ウイルス抗原遺伝子の挿入の確認とウイルス再構築

組換え vOka-BAC ゲノムを制限酵素 BamHI で処理し、アガロースゲルで泳動し、vOka-BAC の制限酵素切断パターンと比較した。vOka- RSV F-BAC では ORF13 を含むバンド (Fig. 2A;black arrow) が、サイトメガロウイルスのプロモーターと RSV F 遺伝子に置換しているため大きくなり、このバンドの位置が上部にシフトしていた (Fig. 2A;white arrow)。このことから、目的の位置に RSV F 遺伝子発現カセットが挿入されていることが確認できた。

BAC DNA を水痘ウイルス感受性細胞に導入することで、組換え vOka を再構築させた。BAC 配列には green fluorescence protein (gfp) 遺伝子が組込まれており、水痘ウイルスによる細胞変性 (cytopathic effect, CPE) が観察された場所と同じ部位で、gfp による蛍光が観察された (Fig. 2B)。感染性の組換え水痘ウイルスの rvOka-RSV A-F と rvOka-RSV B-F を得ることができた。

[3] 組換え水痘ウイルス感染細胞での RS ウイルス抗原の発現の確認

rvOka-RSV A-F と rvOka-RSV B-F の感染細胞において、RSV F タンパク質が発現しているのかを、間接蛍光抗体法とウェスタンブロッティングで確認した。間接蛍光抗体法 (IFA) では、VZV gB と RSV F タンパク質に対する抗体で、二重染色をした。VZV の gB (赤) が発現している部位で、RSV の F タンパク質 (緑) の蛍光が確認された (Fig 3A)。

ウェスタンブロッティングでは、rvOka-RSV A-F (Fig. 3B; lane 1) と rvOka-RSV B-F(lane 2) の感染細胞を回収しアクリルアミドゲルに泳動し、PVDF 膜にブロッティング後、RSV F タンパク質に対する抗体で反応させた。すると、ポジティブコントロールの A 型 RSV Long 株感染細胞 (lane 4) と B 型 RSV 9320 株感染細胞 (lane 5) と同じ位置にバンドが観察された。

以上から作製した組換え水痘ウイルスの感染細胞において、外来抗原である RSV F タンパク質が発現していることが確認された。

[4] 組換え水痘ウイルスの増殖能の比較

作製した組換え水痘ウイルスの rvOka-RSV A-F と rvOka-RSV B-F、そしてオリジナルの vOka を MRC-5 細胞に感染させた。経時的にセルフリーウイルスを回収し、それぞれのウイルス力価を測定することで、ウイルスの増殖曲線を求めた。感染 48 時間後において、どのウイルスも力価がピークとなり、そのウイルス力価もオリジナルの vOka とほぼ同じであった (Fig. 4)。組換え水痘ウイルスの増殖曲線が、オリジナルの vOka を同じような挙動であり、ピーク時の感染力価も同程度であった。RSV F 遺伝子を組み込んだことによる vOka の増殖性における性状変化は認められなかった。

[5] モルモットへの接種試験

モルモットに組換え水痘ウイルスを経気道接種で接種試験を行い、抗体の誘導を確認した。接種スケジュールは、2 週間間隔で 2 回行い、その 4 週間後に 3 回目の接種(追加免疫)を行った。採血を 2 回目接種と 3 回目接種後にそれぞれ行い、血清中の抗体価を測定した。

まず RSV F タンパク質に対する特異的抗体を測定した。細胞に RSV A-F または RSV B-F をトランスフェクションによって発現させ、抗原プレートとした。モルモットの各希釈段階の血清を IFA での一次抗体として用い、蛍光が観察された血清の希釈倍数の最大値を RSV F タンパク質に対する抗体価とした。次に RSV の A 型 Long 株、B 型 9320 株、VZV vOka を攻撃ウイルスとしたプラークリダクションアッセイで中和抗体価を測定した。攻撃ウイルスによるプラークの数が 50%以上減少した血清の最大希釈倍数を中和抗体価とした。

RSV F タンパク質に対する特異的抗体は、rvOka-RSV A-F と rvOka-RSV B-F を接種した群で誘導が確認された。接種 2 回目より 3 回目後が、また、同じ型の RSV F タンパク質に対する抗体価が高くなっていた (Table. 1)。中和抗体価については、VZV では、水痘ウイルスを接種したすべての群で抗体価が上昇していた。RSV に関しては、接種 2 回目後では、RSV の異なる型に対する抗体誘導は確認できなかったが、3 回目の追加免疫を行い、ブーストをかけることで、RSV A 型と B 型両方に対する抗体の誘導が確認できた (Table. 2)。

【結論】

作製した組換え水痘ウイルスのモルモットへの接種で、VZV と、A 型と B 型の両方の型の RSV に対する液性免疫の誘導が確認された。この組換え水痘ウイルスは VZV と RSV に対して効果がある二価ワクチンとして期待される。加えて、今回用いた vOka は、組換え多価ワクチンのベクターとして有用であり、RSV 以外の病原への利用も可能であると思われる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2152 号	氏 名	村上 宏起
論文題目 Title of Dissertation	A recombinant varicella vaccine harboring a respiratory syncytial virus gene induces humoral immunity RS ウイルス遺伝子をもつ組換え水痘ワクチンによる液性免疫の誘導		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 勝二郎夫 副 査 Vice-examiner 平井みどり 副 査 Vice-examiner 西尾久英		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

内容要旨

【背景】

水痘帯状疱疹ウイルス（Varicella-zoster virus, VZV）は、αヘルペスウイルス亜科に属すウイルスであり、水痘や帯状疱疹を引き起こす。小児に初感染し、ウイルス感染後、神経節の中で終生、潜伏感染する。そして、免疫力が低下してくると再活性化して、神経分布に沿って帯状疱疹を引き起こす。その予防には、大阪大学の高橋理明博士らによって開発され、水痘生ワクチンとして世界で初めて認可された水痘弱毒生ワクチン Oka 株（vOka）が使用されており、日本で定期接種も行われている。vOka は、小児へ水痘の予防や高齢者へ帯状疱疹の予防にと、世界中で使用実績があり高く評価されている。このように、vOka が有効性と安全性の高い生ワクチンであり、多価ワクチンのワクチンベクターとして候補と成り得るといえる。

VZV は直鎖状の二本鎖 DNA をもつウイルスで、約 70 種の遺伝子(ORF)をコードしている。その中にはウイルスの増殖に非必須な領域があり、相同組換えの標的として外来遺伝子に置き換えることができる。このように vOka をベースとして、別の病原体のもつ抗原遺伝子を組込んだ外来抗原発現組換え水痘生ワクチンを作製し、複数の感染症を同時に予防できる新しい組換え生ワクチンの開発を行ってきた。

今回、RS ウイルス(RSV)の抗原を発現した組換え水痘ワクチンウイルスの作製を試みた。RSV は、ウイルス性肺炎や気管支炎等の重篤な疾患の原因となることがある。RSV 感染は、小児での発症例が多数で、乳児期においてはしばしば重症化する。また、高齢者や免疫不全者においても、重篤な疾患を発症することがある。予防には、現在のところ認可されたワクチンはない。RSV は、パラミクソウイルス科に属するマイナス一本鎖 RNA ウイルスである。ウイルスの膜タンパク質の Glycoprotein (RSV G) によって、A 型と B 型の 2 つに分類されている。RSV の膜タンパク質の RSV-G と Fusion protein (RSV F) は、中和抗体の標的抗原であることが知られている。

【目的】

RSV の抗原を発現する組換え水痘ワクチンウイルスを作製し、モルモットに免疫することで、液性免疫の誘導を確認し、多価生ワクチンとなりうる水痘組換えワクチンウイルスを作成する

【方法】

vOka の全ゲノムを保持させた大腸菌を作製し、大腸菌の DNA 組換え機構を利用することで RSV の F タンパク質の遺伝子をもつ組換え vOka ゲノムを作製した。その組換え vOka ゲノムを VZV 感受性細胞 (MRC-5) に導入することで感染性の組換え水痘ワクチンウイルスを得た。得られた組換え水痘ワクチンウイルスによる RSV の F タンパク質の発現の確認を行った。モルモットへ接種を行い、VZV と RSV に対する抗体の誘導を確認した。

【結果】

[1] RS ウイルス抗原の遺伝子をもつ vOka ゲノムの作製

vOka ゲノムの ORF11-ORF12 間に Bacterial artificial chromosome (BAC) 配列を挿入し、vOka の全ゲノムを保持した大腸菌を作製した。大腸菌 DNA 組換え機構を利用し、RSV の F タンパク質発現カセットを、水痘ウイルスの *in vitro* での増殖に非必須な ORF13 (thymidylate synthase) と置き換え、水痘ウイルスゲノムに挿入した。次に I-SceI によりポジティブ選択マーカーaphAI 配列を除いた。そして、下記の組換え vOka (recombinant vOka: rvOka) の BAC ゲノムを大腸菌より回収した。

・rvOka-RSV A-F-BAC　・rvOka-RSV B-F-BAC

[2] vOka-BAC ゲノムからのウイルス再構築

BAC ゲノムを水痘ウイルス感受性細胞に導入し、組換え vOka を再構築した。BAC 配列には green fluorescence protein (gfp) 遺伝子が組込まれ、水痘ウイルスによる細胞変性 (cytopathic effect, CPE) と同じ部位で gfp 蛍光が観察された。感染性組換え水痘ウイルス rvOka-RSV A-F, rvOka-RSV B-F を得た。

[3] 組換え水痘ウイルス感染細胞での RS ウイルス抗原の発現の確認

rvOka-RSV A-F と rvOka-RSV B-F の感染細胞において、RSV F タンパク質発現を、間接蛍光抗体法とウェスタンブロッティングで確認した。間接蛍光抗体法 (IFA) では、VZV gB と RSV F タンパク質に対する抗体で、二重染色した。VZV の gB (赤) が発現している部位で、RSV の F タンパク質 (緑) の蛍光を確認した。ウェスタンブロッティングでは、RSV F タンパク質に対する抗体で反応させ、ポジティブコントロールと同じ位置にバンドを観察した。以上から作製した組換え水痘ウイルスの感染細胞での、外来抗原 RSV F タンパク質の発現を確認した。

[4] モルモットへの接種試験

モルモットに組換え水痘ウイルスを経気道接種で接種し、抗体誘導を確認した。接種は、2 週間間隔で 2 回行い、その 4 週間後に 3 回目の接種(追加免疫)を行った。採血を 2 回目接種と 3 回目接種後にそれぞれ行い、血清中の抗体価を測定した。RSV の A 型 Long 株、B 型 9320 株、VZV vOka を攻撃ウイルスとしたプラークリダクションアッセイで中和抗体価を測定した。VZV では、水痘ウイルスを接種したすべての群で抗体価が上昇していた。接種 2 回目後では、RSV の異なる型に対する抗体誘導は確認できなかったが、3 回目の追加免疫ブーストし、RSV A 型と B 型両方の抗体誘導が確認できた。

【結論】

作製した組換え水痘ウイルスのモルモットへの接種で、VZV と、A 型と B 型の両方の型の RSV に対する液性免疫の誘導が確認された。この組換え水痘ウイルスは VZV と RSV に対して効果がある二価ワクチンとして期待される。加えて、今回用いた vOka は、組換え多価ワクチンのベクターとして有用であり、RSV 以外の病原への利用も可能であると思われる。

以上、本研究は RS ウイルス遺伝子をもつ組換え水痘ワクチンを作製し、VZV と RSV 両方に対する液性免疫を誘導することを明らかにしたものであり、組換え水痘ウイルスの二価ワクチンとしての可能性を示し、新しいワクチン技術について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。