

[ 別紙 1 ]

## 論文の内容の要旨

論文題目 インフルエンザウイルスベクターを用いた多価ワクチンの開発

指導教官 河岡義裕 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 前田寧子

長い間、ウイルスは生命体を脅かす未知なる病原体であった。しかし、近年の目覚ましい科学の発展は、様々なウイルスの正体を明らかにしてきた。生命体を苦しめてきた幾つかのウイルスは、現在では人工的な作出が可能になり、時代はウイルスとの戦いを続けながら、ウイルスの積極的な利用へと移りつつある。

インフルエンザは世界中で猛威を振るい、人類が克服を目指しているウイルス感染症の 1 つである。毎年冬に流行して、多くの高齢者の死亡原因となるばかりか、近年、世界各地で発生している高病原性トリインフルエンザのように家禽や豚・馬などの家畜でも大流行を起こして多大な経済的被害を与える、人獣共通感染症である。

様々な動物で流行するインフルエンザはオルソミクソウイルス科の A 型インフルエンザウイルスが原因である。ウイルス感染症の克服には疫学的調査に加えて、ウイルスの増殖機構の詳細を解明することが重要であり、ウイルスを効率的に人工合成する技術は強力な研究手段となる。8 分節に分かれたマイナス一本鎖 RNA をゲノムとして持つ A 型インフルエンザウイルスの人工合成法(リバース・ジェネティクス法)の開発は困難を極めたが、1999 年、他の DNA ウ

イルスやプラス一本鎖 RNA ウイルスの人工合成法に遅れながら、インフルエンザウイルスのリバーシ・ジェネティクス法がついに確立された(Neumann et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96:9345-9350)。このリバーシ・ジェネティクス法は I 型 RNA ポリメラーゼを用いてウイルス RNA (vRNA) を合成するプラスミドとウイルス蛋白質を発現するプラスミドを培養細胞に同時に導入することで、効率よく人工的にインフルエンザウイルスを作出する実験系である(図 1)。この実験系によって自由自在に変異を導入した組み換えインフルエンザウイルスを、簡単に作出することが可能になった。

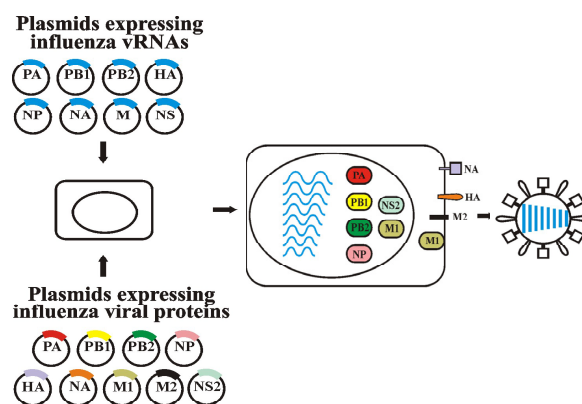


図 1 リバーシ・ジェネティクス法  
ウイルス RNA を合成するプラスミドとウイルス蛋白質を合成するプラスミドを細胞に同時に導入する。細胞内で合成されたウイルス RNA と蛋白質はウイルス粒子を形成して、培養上清中に放出される。

A 型インフルエンザウイルスはヒトでは主として呼吸器上皮細胞で増殖し、時に重篤な肺炎を引き起こして命を奪う。一方で、本ウイルスは宿主の液性免疫ならびに細胞性免疫の両者を刺激して、強力な粘膜免疫と免疫記憶を誘導する。そのため、ベクターを弱毒化し、安定に外来遺伝子を発現することができれば、本ウイルスは多くの病原体に対して有効なウイルスベクターになると考えられる。

そこで、本研究ではリバーシ・ジェネティクス法を駆使し、インフルエンザウイルスを基にしたワクチンベクターの開発を試みた。まず、ワクチンベクターにおいて外来遺伝子産物の発現調節が可能かどうかを調べるために、Kozak 配列の影響を検討した。続いて、インフルエンザウイルスの感染防御には必須ではない蛋白質を異なる病原性ウイルスの感染防御蛋白質で置換した組み換えインフルエンザウイルスを作製し、インフルエンザウイルスの多価生ワクチンベクターとして可能性をマウスモデルで検証した。

### 1) A 型インフルエンザウイルスの蛋白質発現調節における Kozak 配列の意義

インフルエンザウイルスをワクチンベクターとして用いる場合、外来遺伝子産物の発現量が重要となってくる。そこで、インフルエンザウイルスの蛋白質発現機構について調べた。

インフルエンザウイルスに感染した細胞では 11 種類のウイルス蛋白質が合成される。それらウイルス蛋白質の発現量はそれぞれ異なるが、その発現量を調節するメカニズムはよく分かっていない。一方、真核細胞では蛋白質発

現調節メカニズムのひとつとして翻訳開始コドン(AUG)が効率よく機能するために最適な AUG の前後配列(Kozak 配列)が知られ、蛋白質発現プラスミドベクターでは目的蛋白質の発現効率を高めるためにこの配列が汎用されている。ところが、インフルエンザウイルスの遺伝子では、Kozak の最適配列を持つものと持たないものがある。そこで、本ウイルスの蛋白質の発現調節に Kozak 配列が影響するか否かを調べた。

インフルエンザ vRNA はそれぞれコード領域と非コード領域からなる。各ゲノム RNA のコード領域をレポーター蛋白質遺伝子に置換したモデル vRNA を用いて、Kozak 配列がウイルス蛋白質産生にどのように影響を与えるかを調べた。モデル RNA と、この RNA の転写に必要なウイルス蛋白質 (核蛋白質[NP]、PA、PB1、そして PB2) のみ存在している条件では、レポーター蛋白質の発現は Kozak 配列の影響を強く受けた。ところが、開始コドン近隣に変異を持つ組換えウイルスを人工的に作製し、親株と比較したところ、培養細胞においても、マウスにおいても、顕著な違いは見られなかった。したがって、Kozak 最適配列の有無は、インフルエンザウイルスベクターにおける蛋白質の発現、ならびにウイルスの増殖と病原性に影響を与えないことが明らかとなった。しかし、以上の成績から、インフルエンザウイルスの蛋白質の発現調節には Kozak 配列による翻訳開始調節以外のメカニズムが関与していることが示唆された。

## 2)インフルエンザウイルスを基にした多価生ワクチンの開発

感染症の予防には病原体の進入門戸における防御が重要であり、粘膜面を進入門戸とする多くの病原体に対しては粘膜免疫を誘導するワクチンが効果的である。インフルエンザ及びパラインフルエンザはヒトにおける重要なウイルス性呼吸器疾患であるが、前者に対しては現行の不活化ワクチンよりも弱毒生ワクチンが感染防御に有効である。一方、後者に対しては、不活化ワクチンは症状を重篤化する作用があるので、そのような副作用を誘導しない弱毒生ワクチンの開発が望まれている。そこでインフルエンザウイルスをベクターとしてインフルエンザとパラインフルエンザの両方に対して同時に効果を示す多価生ワクチンの開発を試みた。

インフルエンザ、パラインフルエンザウイルスともに、感染防御に重要な抗原は表面糖蛋白質(前者では主として HA、後者では F と HN)である。本研究では、リバーズ・ジェネティクス法を用いて、インフルエンザウイルスの NA (感染防御抗原としては HA に劣る) をパラインフルエンザウイルスの HN で置換し、感染細胞においてインフルエンザウイルスの HA とパラインフルエンザウイルスの HN の両抗原を安定的に発現する組み換えウイルスをリバーズ・ジェネティクス法によって作出した。組み換えウイルスの性状を調べたところ、

この組み換えウイルスは発育鶏卵において親株と同様に効率よく増殖し、感染細胞において HA と HN の両抗原を発現した。また、発育鶏卵で 10 代継代を重ねても増殖効率に変化は見られず、HA と HN の両抗原の発現も安定していた。しかし、マウスでは、親株が致死性的なのに対して、組み換えウイルスでは弱毒化していた。さらに、組み換えウイルスを経鼻接種したマウスでは、両ウイルスに対して有意な抗体価の上昇が見られ、さらに、これらのマウスを、致死量のインフルエンザあるいはパラインフルエンザウイルスで攻撃したところ、いずれのウイルスに対しても 100%の生存率を示した。これらの結果はこの組み換えウイルスが 2 つの異なるウイルス感染症に対して有効な弱毒生ワクチンであることを示している。

以上の結果は、インフルエンザウイルスの多価生ワクチンベクターとしての可能性を世界に先駆けて証明したものである。ウイルス蛋白質の発現機構を解明することは、ウイルスをベクターとして使用する際に重要であるばかりでなく、抗ウイルス薬開発のためのターゲットの同定にもつながる。インフルエンザウイルスの蛋白質合成における Kozak 配列の役割は、長年、インフルエンザウイルスの謎の 1 つであった。本研究では、これまで作成が困難であった非コード領域に変異を持つ組み換えインフルエンザウイルスをリバーシ・ジェネティクス法によって作出し、ウイルス増殖過程におけるコザック配列の意義を検証した。結果として、Kozak 配列の重要性は認められなかったが、長年の疑問を解決した。

多くのウイルス感染症において、自然感染に倣って投与される生ワクチンが効果的である。また、ワクチン投与に関する時間的・経済的負担を軽くするため、一度に複数の感染症に対して免疫を付与する混合(多価)ワクチンの需要は高い。しかし、MMR(三種混合ワクチン；はしか、風疹、おたふく風邪)以外の生ワクチンの投与では、ウイルス同士の緩衝作用が懸念されるため、1 ヶ月以上の間隔をあけて単品投与することが基本となっている。米国では、弱毒 A 型インフルエンザウイルス 2 株 (H1N1,H3N2) と弱毒 B 型インフルエンザウイルスを混合したインフルエンザ生ワクチンが、すでに認可されている。これら 3 株の NA をヒトパラインフルエンザタイプ 1, 3 の HN ならびに Respiratory Syncytial virus の G または F に置き換えることで呼吸器感染症混合多価ワクチンとすることも可能であろう。