論文内容の要旨

論文題目　Basic research on the development of H5N1 influenza vaccines (H5N1インフルエンザワクチン開発に関する基礎研究)

氏名　村上　晋

冬季を中心に流行を繰り返すA型インフルエンザウイルスは、時に、多数の犠牲者を伴う世界的大流行（パンデミック）を引き起こす。近年、H5N1 高病原性鳥インフルエンザが、アジア、ヨーロッパ、そしてアフリカまでの広大な地域で流行し、鳥からヒトへの感染・死亡例が増加している。そのため新型 H5N1 ウイルスによるパンデミックが世界的な危惧となっている。パンデミックの際には、ワクチンが重要なインフルエンザ制圧の手段となる。そこでWHO 主導のもとH5N1 不活化ワクチンが作製され、プレパンデミックワクチンとして各国で備蓄されている。そしてこのワクチンの臨床試験が行われたが、免疫原性が低く、防御免疫を賦与するには季節性インフルエンザワクチンの 12 倍の抗原量を必要とすることが明らかとなった。またインフルエンザウイルスは頻繁に抗原変異するため、流行ウイルスの抗原性がワクチンと異なると、十分な効果を得ることができない。従って、H5N1 ウイルスに対して防御免疫を獲得するためには、多量に、かつ流行株と抗原性が合ったワクチンを投与することが求められる。

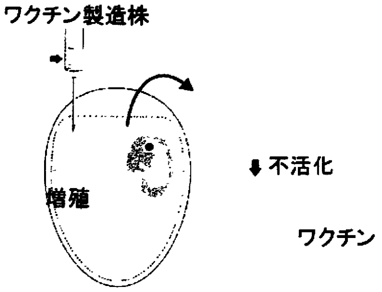

図1. 不活化ワクチン製造工程

通常、インフルエンザ不活化ワクチンは、発育鶏卵を母体にワクチン製造株を増殖させ、回収ウイルスを精製後、ホルマリン等で不活化し作製する(図 1)。そこで本研究では、まず効率的にワクチン製造株を作製することを目的として、クローン化 cDNA をコードしたプラスミドを細胞へ導入しインフルエンザウイルスを作製する技術、リバースジェネティクス法を改良した。次に発育鶏卵あたりのワクチン生産量を高めるために、発育鶏卵においてワクチン製造株が良く増殖するための分子基盤を、そしてパンデミック時の発育鶏卵不足に備えてワクチン製造用の培養細胞での分子基盤を探索した。また現在備

蓄されているプレパンデミックワクチンの効果を検討するために、H5N1 ワクチンの交差防御能を解析した。

第1章 イヌ RNA ポリメラーゼIプロモーターを用いたインフルエンザリバースジェネティクス系の確立とH5N1 ワクチン製造株の作製

ワクチン製造株は、リバースジェティクス法によって作製することが可能である。しかしワクチン製造株を作製するためには、人体用ワクチンの作製が認可されている細胞、例えば Vero 細胞あるいは MDCK 細胞を用いる必要がある。現行のリバースジェネティクス法によるワクチン製造株は、通常、Vero 細胞に、ヒト由来の RNA ポリラーゼ I(PolI)プロモーターの転写制御下でウイルス RNA を発現するプラスミド 8 個と、ウイルスタンパク質を発現するプラスミド 4 個を同時に細胞にトランスフェクションして作製している。しかし Vero 細胞は、そのトランスフェクション効率およびウイルスの増殖性の低さが足かせとなりワクチン製造株作製の確実性と効率が低いことが問題である。一方、ウイルス増殖性に優れる MDCK 細胞では、PolI プロモーター活性の種特異性が高いため、ヒト PolI プロモーターでは効率よくワクチン株が作製できない。本研究では、MDCK 細胞で効率よくワクチン製造株を作製する目的で、イヌ PolI プロモーター領域をクローニングし、イヌ PolI プロモーターを用いたリバースジェネティクス系を確立した。

MDCK 細胞 DNA から PolI プロモーター領域をクローニングし、MDCK 細胞において、そのプロモーター活性を測定したところ、ヒト PolI プロモーターよりも有意に高い値を示した。そこでイヌ PolI プロモーターを用いたリバースジェネティクス系を構築したところ、ワクチン製造株が効率よく作製された(図 2)。MDCK 細胞から H5N1 ワクチン製造株を効率よく作製するために有用である可能性が示された。

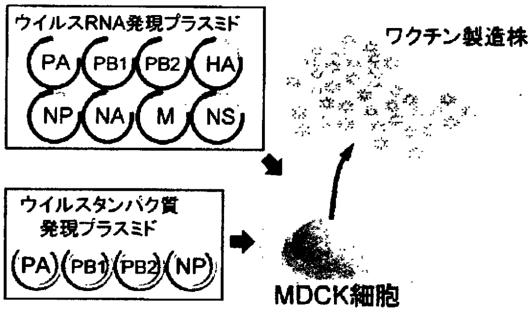

図2. MDCK細胞でのワクチン製造株作製

第2章 H5N1 インフルエンザワクチン製造株の発育鶏卵での増殖性を決める因子

H5N1 ワクチン製造株には、外被タンパク質で中和抗体を誘導する HA と NA の遺伝子を H5N1 ウイルス由来、それ以外の6つの内部遺伝子は、発育鶏卵増殖性に優れ、人への安全性が高い PR8 株由来とする遺伝子交雑ウイルスを用いることが推奨されている。この遺伝子構成を持つ、WHO 推奨のワクチン製造株 NIBRG-14 株は、発育鶏卵での増殖性が低いことが問題となっている。本研究では、発育鶏卵

での増殖性に優れるワクチン製造株の作製およびその分子基盤の解明を目的とした。

NIBRG-14 株と内部遺伝子のみを継代歴の異なる PR8 株由来のものと置き換えたワクチン製造株(UW 株)を作製し、発育鶏卵での増殖性を比較したところ、UW 株が4倍以上良く増殖することがわかった。そこで、内部遺伝子を置き換えた組換えウイルスを作製し、増殖性を調べた。その結果、ウイルスのポリメラーゼをコードする3遺伝子と核タンパク質をコードする遺伝子の4つが発育鶏卵増殖性に重要であることが明らかとなった。UW 株の増殖性をさらに高める目的で、HA が細胞レセプターに結合する強さと NA が細胞からウイルスを放出させる強さのバランスがウイルスの増殖性に重要であることに注目して、さまざまなウイルス由来の NA 遺伝子と置き換えて増殖性を調べた。その結果、内部遺伝子と同じ PR8 株由来の NA を持つウイルスが UW 株よりもさらによく増殖することがわかった。さらに他の H5N1 ウイルスの HA を用いた場合でも 4-10 倍以上の増殖増強効果があることが明らかとなった(図 3)。これらの知見は、発育鶏卵でのワクチン製造効率の向上に貢献することが期待される。

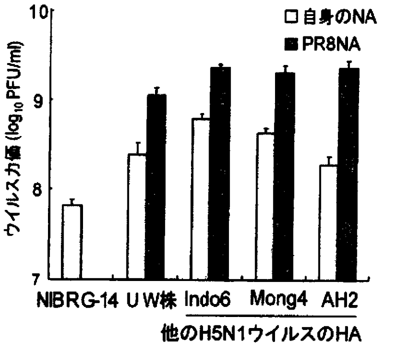

図3. H5N1ワクチン製造候補株の発育鶏卵増殖性

第 3 章 H5N1 インフルエンザワクチン製造株の培養細胞での増殖性を決める因子

パンデミック時には発育鶏卵の供給量に限界があることなどから、必要ドーズを確保することは困難である。そのため、発育鶏卵の代替母体として、ワクチン製造が認可されている MDCK 細胞などの培養細胞で良く増殖するワクチン製造株を選択する必要がある。本研究では、MDCK 細胞での増殖性に優れるワクチン製造株の作製およびその分子基盤の解明を目的とした。第 2 章で用いた WHO 推奨株 NIBRG-14 株と UW 株の増殖性を MDCK 細胞で比較したところ、UW 株が 1000 倍以上も良く増殖する事が分かった。そこで内部遺伝子交雑ウイルスやアミノ酸置換した変異体を作製し、解析した。その結果、UW 株由来 PB2(ウイルスポリメラーゼのサブユニット)の 360 番目アミノ酸がウイルスポリメラーゼの活性に関与して、NIBRG-14 株よりもよく増殖することがわかった。そして意外にも、増殖性の低かった NIBRG-14 株由来の非構造タンパク質 NS1 の 55 番目のアミノ酸が高増殖性に関与していることが明らかとなった。NS1 の 55 番目アミノ酸による IFN 拮抗

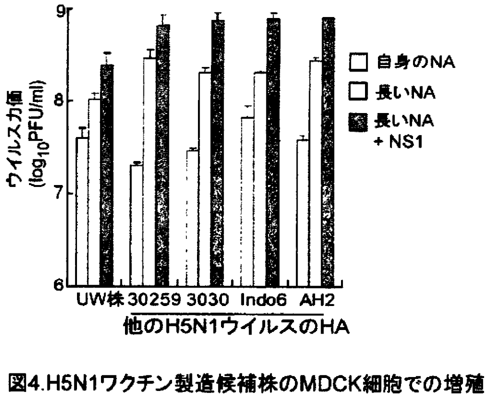

図4.H5N1ワクチン製造候補株のMDCK細胞での増殖

作用の違いを調べたところ、NIBRG-14 株由来の方が UW 株由来よりも有意に強かった。

また鶏卵の場合と同じくMDCK 細胞での増殖に最適なHAとNAの機能バランス決定するために、NA 遺伝子を置き換えて調べたところ、柄の部が長い NA を持つウイルスの増殖が有意に向上することが分かった。これらの内部遺伝子と長いNAを併せ持つことで増殖効率を最高30倍も高めることが出来た(図4)。これらの知見は、MDCK 細胞でのワクチン製造効率の向上に貢献すると期待される。

第 4 章 H5N1 不活化インフルエンザワクチンのクレード間交差防御免疫能のマウスモデルにおける解析

現在、H5N1 インフルエンザウイルスは多様な進化系統集団(クレード0～9)を形成しており、それぞれ HA 抗原性が異なることが報告されている。そのため、異なるクレードに基づくプレパンデミックワクチンの備蓄が WHO により推奨されている。しかしながらそれらワクチン間での交差免疫性についての詳細はわかっていない。そこで本章では、H5N1 不活化ワクチンの防御免疫能におけるクレード間交差性をマウスモデルを用いて解析した。

WHOが推奨するクレード (クレード1、2.1、2.2および2.3.4)の各ウイルス株からワクチン製造株を作製し、これらのワクチン製造株から不活化ワクチンを試作し、マウスに免疫した。4 週間後に各クレードの野生型 H5N1 ウイルスによる攻撃試験を行い、クレード間の交差防御免疫能をマウスの生死(図 5)および臓器中のウイルス力価によって評価した。その結果、試作ワクチンは同じクレードのウイルスによる攻撃に対して有効で、マウスは生存し、肺におけるウイルス力価も顕著に減少していた。一方、異なるクレードのウイルスで攻撃した場合も、組み合わせにより程度の差はあるものの防御免疫を付与することが出来た。特に、クレード 2.1 由来のワクチンはもっとも広範囲な交差免疫性を示し、このワクチンで免疫されたマウスは他の全てのクレードのウイルスによる攻撃に抵抗した。一方、クレード 2.2 由来のワクチンはクレード 2.3.4 のウイルスの攻撃に対してマウスを防御できなかったが、肺でのウイルス力価は免疫により 10 倍以上減少していた。

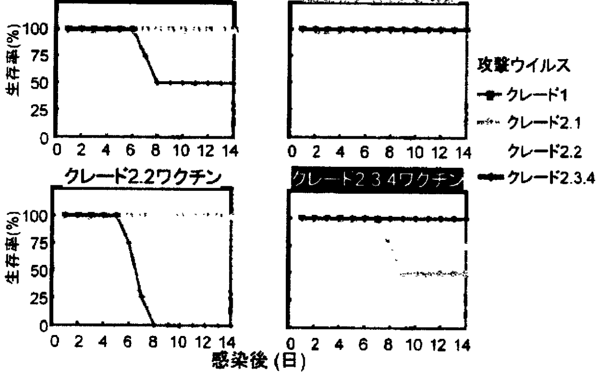

図5. H5N1ワクチンの交差免疫

これらの結果より、現在プレパンデミックワクチンとして備蓄されているワクチンは、パンデミック発生時の備蓄用ワクチンとして有用である可能性が示唆された。