

論文審査の結果の要旨

氏名 村上 晋

本論分は4章からなる。第1章はH5N1インフルエンザワクチンシードウイルスの作製法について、第2章は発育鶏卵における高増殖性のH5N1ワクチンシードウイルスについて、第3章は培養細胞における高増殖性のH5N1ワクチンシードウイルスについて、そして第4章はH5N1プレパンデミックワクチンの交差防御免疫能について述べられている。以下に各章ごとの結果を示す。

第1章

ワクチン製造株は、リバーシジェネ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を用いる必要がある。現行のリバーシ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シジェネティクス系を確立した。

第2章

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。WHO推奨の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。UW株の増殖性をさらに高める目的で、HAとNAの機能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株よりもさらに良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。

第3章

発育鶏卵不足時の代替母体として、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。また増殖性の低かった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。さらに、柄の部が長いNAを持つことでHA・NAバランスについては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。

第2、3章で得られた知見は、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

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、これらの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。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。

本研究で作製したH5N1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

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。

これらの研究から、H5N1インフルエンザワクチン開発を進展させるために重要な知見が得られた。

なお、本論文第1章は、堀本 泰介、山田 晋弥、角川 学士、五藤 秀男、河岡 義裕との共同研究、第2章は堀本 泰介、村本 裕紀子、山田 晋弥、藤井 健、木曾 真紀、岩附 研子、城野 洋一郎、河岡 義裕との共同研究、第3章は堀本 泰介、Le thi Quynh Mai、Chairul A. Nidom、Hualan Chen、村本 裕紀子、山田 晋弥、岩佐 彩香、岩附 研子、下島 昌幸、岩田 晃、河岡 義裕との共同研究、第4章は岩佐 彩香、岩附 研子、伊藤 睦美、木曾 真紀、喜田 宏、高田 礼人、Chairul A. Nidom、Le thi Quynh Mai、山田 晋弥、今井 博貴、坂井(田川) 優子、河岡 義裕、堀本 泰介との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。