



| | |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title | Generation of a Recombinant Oka Varicella Vaccine Expressing Mumps Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein as a Polyvalent Live Vaccine |
| Author(s) | 吉井, 洋紀 |
| Citation | 大阪大学, 2008, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49926 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

| | |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名 | 吉井 洋紀 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 22352 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成20年4月21日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学 位 論 文 名 | Generation of a Recombinant Oka Varicella Vaccine Expressing Mumps Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein as a Polyvalent Live Vaccine (ムンプスウイルスのヘマグルチニン-ノイラミニダーゼを発現する多価生ワクチンの可能性としての組換え岡株水痘ワクチンの作成) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教授 生田 和良 (副査) 教授 松浦 善治 教授 塩田 達雄 |

論文内容の要旨

[目 的]

水痘帶状疱疹ウイルス(VZV)はアルファヘルペスウイルス亜科に属し、全長約125kbのDNAゲノムを有する。VZVは初感染時には水痘を発症する。この時ウイルスの一部は神経節に到達して潜伏感染し、高齢化や過度のストレス、免疫抑制療法等に伴う免疫低下状態において再活性化し、帯状疱疹を発症する。

水痘ワクチンの開発においては臨床分離株である岡株(Oka親株; pOka)をヒトおよびモルモットの細胞を用いて継代を繰り返すことにより弱毒化し、現在これをワクチン株(Okaワクチン株; vOka)として用いている。

一方、おたふくかぜの原因ウイルスであるムンプスウイルス(MuV)に対して、日本では以前ムンブス、麻疹、風疹の弱毒生ウイルスの混合ワクチン(MMR)が用いられていたが、副反応として無菌性髄膜炎が多発するという問題のため、現在では混合でないムンプスワクチンが用いられている。

本研究において我々は、300kb以上のDNAをクローニングすることが可能であるBacterial Artificial Chromosome(BAC)システムを用いて、少なくとも9種類のクローンのmixed populationであるvOkaより単クローンのvOkaゲノムをクローニングして感染性ウイルス粒子を再構築することを試みた。さらにvOkaゲノムに外来遺伝子としてMuVのヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ(HN)遺伝子を導入し、組換えウイルスにおいてHNタンパクを発現させることを試みた。

[方法ならびに成績]

ヒト胎児細胞であるMRC-5細胞にVZVゲノムと相同な配列をアームに持つBACベクターを導

入し、そこにvOkaを感染させることによって、相同組換えによりBACが挿入されたVZVを作製した。

組換えVZVはBACにコードされているGreen fluorescent Protein(GFP)及びGuanine phosphoribosyl transferase(GPT)を用いてクローニングし、感染細胞より環状VZVゲノムDNAを抽出して大腸菌DH10Bに導入することにより単クローンのVZVゲノムを持つ大腸菌コロニーを得た。

得られたクローンよりVZVゲノムを精製し、制限酵素切断パターンを確認した結果、予想された切断パターンとの明確な差異は認められなかった。また、これらのクローンについて、pOkaとvOkaにおいてアミノ酸置換を伴う20の塩基配列変異箇所について塩基配列を確認した結果、クローンは2グループに分けられた。

上記の2グループの1クローンずつから感染性ウイルス粒子を再構築してcell free virusを作製し、MRC-5細胞における増殖性をpOka及びvOkaと比較した結果、得られた2グループ間において増殖性の差は認められなかつたが、pOka及びvOkaと比較して有意な増殖性の低下が認められた。

これら2グループのうち、塩基配列がpOkaに近いクローンに大腸菌内においてMuVのHN遺伝子を導入した。HN遺伝子は、培養細胞におけるVZVの増殖に必須ではないthymidylate synthetaseを発現するORF13の全長と入れ替えた。

HN遺伝子を導入したvOkaゲノムをMRC-5細胞に導入した結果、感染性ウイルス粒子が再構築され、感染細胞においてHNタンパクが発現していることが確認された。

感染細胞よりcell free virusを調製し、MRC-5細胞における増殖性をHN遺伝子を導入する前のvOkaと比較した結果、増殖性に有意な差は認められなかつた。

このcell free virusをモルモットに経鼻投与した結果、2回投与でVZVとMuVの双方に対する高い中和抗体値の誘導が見られた。

[総 括]

我々は本研究においてBACシステムを用いてVZV vOkaの全ゲノムをクローニングすることを試み、これに成功した。部分的な塩基配列の確認により、得られたクローンは2グループに分けられた。2グループ間での変異箇所はORF62/71において1箇所のみに認められた。上記の2グループの1クローンずつよりcell free virusを作製し、培養細胞における増殖性を比較した結果、両クローンともpOka及びvOkaと比較して有意に増殖性が低下していた。これにより、得られたクローンがvOkaのpopulationの中でもより高度に弱毒化された性状を有する事が示唆された。

2グループのうち一方のクローンにMuVのHN遺伝子を導入した結果、組換えvOkaゲノムより感染性ウイルス粒子が再構築され、またこの組換えウイルスは、感染細胞においてHNタンパクを発現していた。この組換えウイルスは元になったvOkaクローンより再構築された組換えウイルスと増殖性に差が見られなかつた。さらにHNを発現するcell free virusをモルモットに経鼻投与することで、モルモットにおいてVZVとMuVの双方に対する中和抗体値を誘導した。

今後、より多くの種類のvOkaクローンを得てその分子生物学的性状を解析すると共に、様々な外来遺伝子を導入することにより、vOkaゲノムを外来遺伝子を発現するベクターとして用いることが可能となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者の論文において、水痘带状疱疹ウイルス(VZV)ワクチン株(vOka)のゲノムをBacterial Artificial Chromosome(BAC) systemを用いてクローニングした。すでに全長がクローニングされていたワクチン株の原株(pOka)との制限酵素切断断片の比較により、得られたBACクローンはvOkaゲノムの全長を含むことが示唆された。

上記のBACクローンを用いてVZVとMuVの双方の感染を防御する多価ワクチンを作製することを目的とし、BACクローンにムンプスウイルス(MuV)の粒子表面に存在する糖蛋白であり、中和抗体誘導に重要と考えられているヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ(HN)の遺伝子を導入し、HN蛋白を発現する組換えVZVの作製を試みた。

HN導入BACクローンを培養細胞に導入した結果得られた組換えウイルスは、培養細胞においてHN蛋白を発現することが確認された。また、このウイルスとHN遺伝子導入前の組換えウイルスとの*in vitro*での増殖性に有意差は認められなかった。さらに組換えウイルスをモルモットに接種した結果、VZVとMuVの双方に対する中和抗体を誘導した。

上記よりこの研究において得られた組換えウイルスはVZVとMuVの双方に対し感染防御する多価ワクチンとして使用できる可能性を示した。以上の点を鑑みると、今回申請された論文は学位論文に値するものと考えられる。