組換えインフルエンザウイルスの構築と応用

特集 組換えウイルスキャリア—遺伝子治療・ワクチン応用への新展開—

村上 晋・堀本泰介・河岡義裕*

Construction and application of the recombinant influenza viruses

Recently established reverse genetics of influenza virus allows us to generate the recombinant viruses with arbitrarily modified viral proteins. The recombinant viruses are now utilized as useful tools in basic research fields. Moreover, in application, H5N1 pre-pandemic vaccines, which are now stockpiled in many countries, were generated by using the reverse genetics to attenuate the virus. In the future, the technology of reverse genetics will contribute us to develop the next generation of influenza vaccines. On the other hand, construction of the recombinant viruses that express foreign proteins, epitopes, or genes may lead to application for multivalent vaccines inducing effective immune responses and vectors for gene therapy. A variety of such approaches are now in underway to exploit recombinant viruses for practical use.

インフルエンザウイルスのリバースジェネティクスの確立により、ウイルス蛋白質を任意に改変した変異ウイルスの作製が可能になった。そういった変異ウイルスは、現在のインフルエンザの基礎研究において欠かすことのできない有用なツールとして活用されている。また、応用面においても、現在備蓄が進んでいる H5N1 プレパンデミックワクチンには本法を用いて作製された弱毒変異ウイルスが用いられている。今後、変異ウイルス作製技術は、インフルエンザの次世代ワクチンの開発にも大いに貢献することが期待される。

一方、リバースジェネティクスを用いた外来性エピトープや外来性遺伝子を発現する組換えインフルエンザウイルスの構築により、効果的な免疫応答を惹起する多価ワクチンや遺伝子治療用デリバリーベクターへの応用が考えられている。現時点では、組換えウイルスの安定性、発現性、増殖性などの問題点を改善する必要性が指摘されているものの、インフルエンザウイルスベクターの持つ数多くの利点を活かすべく実用化を目指したさまざまなアプローチが展開されている。

Shin Murakami・Taisuke Horimoto・Yoshihiro Kawaoka*

key words: Influenza virus, reverse genetics, virus vector, vaccine

遺伝子治療用ベクターやワクチンベクターにとって、遺伝子導入効率と安定した遺伝子発現は重要な要素である。効率的な遺伝子導入のために、これまでにアデノウイルス、レトロウイルスなどをベースとしたウイルスベクターがさまざまな目的で開発され、臨床試験段階にある¹⁾。インフルエンザウイルスもそのベクターとしての応用性を模索するため、実験室レベルで精力的に研究されているが、実際に臨床試験にまで到達した事例はない。しかしながら、インフルエンザウイルスベクターは、他のウイルスベクターと比較しても、安全性あるいは有効性などにおいて以下のような大いに期待できる特徴が

ある。

- ① 複製に DNA ステップがないのでウイルスゲノムが宿主染色体に取り込まれるおそれがなく宿主に対する変異原性、腫瘍原性がないこと
  - ② 持続感染や潜伏感染がなく、また有効な抗ウイルス薬が使用できるためベクターウイルスを確実に制御できること
  - ③ ヒトに病原性がない弱毒ウイルス (FDA〈アメリカ食品医薬局〉認可生ワクチンウイルスを含む) が利用できること
- といった点から非常に高い安全性が見込まれる。また、有効性に関しても、
- ④ 確実に呼吸器上皮細胞に感染し、また初期免疫反応を強く誘導すること
  - ⑤ それ自体が抗原提示細胞 (未成熟樹状細胞や

* Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo 東京大学医科学研究所・ウイルス感染分野

図1
A型インフルエンザウイルスの
粒子とゲノム
インフルエンザウイルス粒子内
に8種類のゲノム分節が存在し
ている。

単球など)に効率よく感染することから発現する分子による防御効果との相乗効果が期待できること

⑥ インフルエンザ抗体保有者においてはベクターのヘマグルチニン(HA：赤血球凝集素)垂型の選択によりその感染効率を操作することが可能であること
などの特徴から非常に期待できるものである。さらに、

⑦ 発育鶏卵や培養細胞を用いて高力価のストックウイルスが用意できること
は経済性にすぐれる利点である。これらの特徴に加えて

⑧ プラスミドベースのリバースジェネティクスの開発

⑨ インフルエンザウイルスゲノムのパッケージングシグナルの同定により、従来にくらべてより容易にそしてより効率的に外来遺伝子を搭載したウイルスを作製できるようになってきた。

これらの利点を発揮すべく、現在、インフルエンザベクターの臨床応用を目指した開発研究が精力的に行われている。本稿では、これまでに報告されている組換えインフルエンザウイルスの概要についてワクチンウイルスを含め概説する。

インフルエンザウイルス

A型インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、マイナス鎖RNAをゲノムとして持つエンベロープウイルスである。ヒトインフルエンザウイルスは内部蛋白質の抗原性が異なるB型、C型も知られているが、世界的大流行(パンデミック)の原因となるのはA型ウイルスである。

A型ウイルスは8本に分節化されたRNAをゲノムとし、少なくとも11種類の蛋白質がコードされている(図1)。分節状RNAのうち長い3本のRNA分節がウイルスポリメラーゼのサブユニット(PB2, PB1, およびPA)をコードしている。この三つのサブユニットからなるポリメラーゼはウイルスRNA(vRNA)をメッセンジャーRNA(mRNA)に転写、あるいは自身のvRNAを複製する働きをもつRNA依存性RNAポリメラーゼで、核蛋白質(NP)とともにvRNAに結合しリボ核蛋白質複合体(RNP複合体)を形成する。

ウイルスの表面にあるHAとノイラミニダーゼ(NA)はそれぞれHA分節、NA分節にコードされる。HAは細胞のシアル酸を末端に持つ糖鎖をレセプターとして認識し、またエンベロープとエンドソーム膜との融合能を有する。NAはウイルスが感染細胞から放出されるときに細胞表面のシアル酸を

図2 リバースジェネティクスによる組換えインフルエンザウイルスの作製

ウイルス遺伝子分節を合成するプラスミドを8種類用意する。目的の遺伝子に改変や変異を導入することが可能である。これに加えてウイルス遺伝子分節の転写・複製に必要な蛋白質(PB2, PB1, PA, とNP)を発現する4種類のプラスミドを用意する。

合計12種類のプラスミドを293T細胞等に導入すると、培養上清に組換えウイルスが回収される。

切断し、ウイルス粒子の放出を促す。

M分節にはM1とmRNAのスプライシングによって産生されるM2の二つの蛋白質がコードされている。M1はエンベロープの裏打ち構造を形成する。M2はイオンチャネルとして働き、感染初期にエンドソームにおけるウイルス粒子内のpHを低下させ、RNP複合体の細胞内への放出(脱殻)を促進する。

NS分節もNS1蛋白質とmRNAのスプライシングによって産生されるNS2/NEP蛋白質をコードしている。NS1は多機能であるが、特にインターフェロンのアンタゴニストとしての働きが知られる。一方、NS2/NEPは新しく合成されたRNP複合体の核外輸送に関わっている。

リバースジェネティクスの開発

1989年に外来遺伝子を導入した組換えインフルエンザウイルスの作製がはじめて報告された²⁾。レポーター(CAT)遺伝子をNS分節の3'と5'末端の非コード領域の間に挿入した組換えDNAをT7プロモーターによって*in vitro*で転写した組換えRNA分子を、ウイルスから精製したポリメラーゼおよび

NPと反応させRNP複合体が作製された。それをヘルパーウイルスを感染させた細胞にトランスフェクトすると、ヘルパーウイルスのポリメラーゼによってCAT遺伝子を持つ組換えRNAが複製し、その結果、ウイルス粒子にRNA分節の一つとしてパッケージングされた。しかし、この組換えウイルスのCAT遺伝子分節は、数回の継代により脱落した。

このようにヘルパーウイルスを用いる初期のリバースジェネティクス(RNPトランスフェクション法)は、操作が煩雑なうえに変異ウイルスの選択手段が限られていたため任意のウイルス遺伝子进行操作することは不可能であった。

これを一気に解決したのが1999年に筆者らが開発したヘルパーウイルスを必要としないプラスミドベースのリバースジェネティクス(プラスミドトランスフェクション法)である^{3,4)}。これによってウイルス遺伝子を持つプラスミドから改変された任意の組換えウイルスを効率よく作製することが可能になった。

プラスミドトランスフェクション法は、ヒトRNAポリメラーゼI(PolI)プロモーターの制御によって8種類のウイルスRNA発現させる8個のプラスミドと、転写、複製を制御する4種類のウイルス蛋白質(PA, PB1, PB2とNP)を発現する4個のプラスミドの計12個のプラスミドを細胞に同時にトランスフェクトすることによって、ウイルスを作製する方法である(図2)。

この方法によって、導入した変異がウイルスにとって致命的ではない限り任意の変異をウイルスに導入できる。その後、いくつかの変法や改良が加えられ、より効率的なウイルス産生が可能となった。たとえば、PolIによるRNA発現ユニットを挟み込むようにRNAポリメラーゼII(PolII)とポリAシグナルを付加したプラスミドを用いて、一つのプラスミドからウイルス遺伝子とウイルス蛋白質を発現させる方法により、8個のプラスミドのトランスフェクトにより変異ウイルスを作製することも可能になった⁵⁾。

また、ウイルスRNA発現のためのPolII転写ユニットを8個連結させたプラスミドの利用により、

表 1 HA 蛋白質に挿入された外来遺伝子を発現する組換えインフルエンザウイルス

外来遺伝子	挿入アミノ酸残基数	抗原部位	参考文献
<i>Plasmodium yoelii</i> スポロゾイト周囲蛋白質	12	B	37)
HIV-1 gp120	12	B	38,39)
HIV-1 gp41	7	B	40,41)
HIV-1 gp41	8	B	41)
<i>Plasmodium falciparum</i> スポロゾイト周囲蛋白質	12	B	13)
β -galactosidase	9	B	12)
HIV-1 gp120	12	B	39,42)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> F	11	B	43)
オボアルブミン	17	B	44)
Influenza NP	9	E	45)
<i>Plasmodium yoelii</i> スポロゾイト周囲蛋白質	12	E	37,38,46)

トランスフェクトするプラスミド数を 3 個(蛋白質発現プラスミドは 2 個を含む)にまで減少させることで、さらに効率のよいウイルス産生も可能となった⁶⁾。さらに、効率はわるいものの、PolII プロモーター(T7)の制御でウイルス RNA を発現させる系や⁷⁾、アデノウイルスベクターを利用した系なども報告されている。

このように開発されたインフルエンザウイルスのリバースジェネティクス系は、それぞれの目的に応じて使い分けられている。

外来性抗原エピトープや蛋白質を発現する組換えインフルエンザウイルス

リバースジェネティクス(RNP トランスフェクション法あるいはプラスミドトランスフェクション法)の開発によって、外来性エピトープや外来性蛋白質を持ったインフルエンザウイルスの作製が可能になった。

これまでに、① HA や NA に外来性抗原エピトープを挿入したウイルス、② 追加の分節(9 本目)に外来遺伝子を搭載し発現させるウイルス、③ ウイルス蛋白質と外来性蛋白質を融合させ発現させるウイルス、④ 外来性蛋白質をコードする遺伝子とウイルス遺伝子を bicistronic に一つの RNA 分節から発現させるウイルスなどが作製されている。

さらに、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング配列の同定によって、より効率的に外来性遺伝子を取り込ませたウイルスの作製が可能となった。いくつかの報告例について記載したい。

HA 分節に外来性遺伝子を挿入した組換えインフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスに感染した宿主では多くの抗体が HA に対して産生される。したがって、特異的な B 細胞エピトープ応答を効率よく誘導するために、外来性ペプチド配列を HA の抗原部位に挿入した組換えウイルスが作製された。HA 上の抗原部位は 5 領域(A, B, C, D と E)同定されているが、そのうち B あるいは E 領域に外来性抗原エピトープを挿入した組換えウイルスの作出に成功している(表 1)。加えて、動物実験レベルでは、これらの組換えウイルス感染によってそれぞれの導入したエピトープに対する免疫反応の誘導も確認されている。また、T 細胞エピトープを抗原部位 E に挿入した組換えウイルスでは感染宿主内で細胞傷害性 T 細胞(CTL)応答が観察されている。

ペプチド(抗原エピトープ)の挿入に加えて、より分子量の大きなポリペプチドを HA に挿入した増殖可能な組換えウイルスについても報告されている⁸⁾。HA の N 末端に炭疽菌(*Bacillus anthracis*)の PA ドメイン 1'(致死浮腫因子: 90 アミノ酸残基)あるいは PA のドメイン 4(レセプター結合部位: 140 アミノ酸残基)を挿入した組換えウイルスは、野生型のウイルスに匹敵する増殖性を示し、また挿入した遺伝子は数回の継代を経ても安定に維持された。そして、このウイルスで免疫したマウスは炭疽を効果的に防御した。

表2 NA のストック領域に組み込まれた外来遺伝子を発現する組換えインフルエンザウイルス

外来遺伝子	挿入アミノ酸残基数	参考文献
Flag エピトープ	8	47)
<i>Plasmodium yoelii</i> スポロゾイト周囲蛋白質	9	37)
<i>Plasmodium yoelii</i> スポロゾイト周囲蛋白質	9	48)
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) NP	12	49)
オボアルブミン	8	50)
E75 HER-2 KIF	9	51)
<i>Chlamydia trachomatis</i> 主要外膜蛋白質	12	52)
β -galactosidase	9	12)
HSV-1 gB	8	50, 53)
HSV-1 RR	8	50)
influenza NP	9	50)

表3 NA 遺伝子に組み込まれた外来遺伝子を発現する組換えインフルエンザウイルス

外来遺伝子	戦 略	参考文献
CAT	口蹄疫ウイルス 2A	11, 16)
SIV Gag	口蹄疫ウイルス 2A	14)
SIV Gag	口蹄疫ウイルス 2A	15)
<i>Plasmodium yoelii</i> スポロゾイト周囲蛋白質	IRES (BIP)	13)
β -galactosidase	IRES (BIP)	12)
CAT	IRES (BIP)	11)
HIV-1 Gp41	IRES (BIP)	11)
VP0 Mengo virus	内在性プロモーター	9)
CAT	内在性プロモーター	9)
GFP	内在性プロモーター	10)

NA 分節に外来遺伝子を挿入した組換えインフルエンザウイルス

NA は一般にマッシュルーム型の構造をとり、NA 活性ドメインはその頭部領域に存在する。したがって、NA 機能に影響しないストック領域に外来性ペプチド配列を挿入する試みがいくつか報告されている。

そのなかでも主に T 細胞エピトープを導入した組換えウイルスの例を表 2 に示した。病原体に対して有効なワクチンは液性免疫だけではなく細胞性免疫も必要とされるが、この方法によって防御免疫を誘導することが可能であった。また、外来性抗原のエピトープのみならず遺伝子レベルの NA 分節への挿入もいくつかの組換えウイルスで報告されている (表 3)。その場合、主に三つの戦略によって外来遺伝子の挿入が行われている。

一つ目は NA 遺伝子の下流にウイルスプロモーター配列 (3' 非翻訳領域) を導入し、それを内部プロモーターとしてその下流の外来性遺伝子を bicistronic に発現させる方法である¹⁰⁾。

二つ目は bicistronic な遺伝子 (NA 遺伝子と外来性遺伝子) をヒト免疫グロブリン重鎖結合蛋白質 (Bip) 由来の internal ribosomal entry site (IRES) で連結し発現させる方法である¹³⁾。IRES 配列を持った RNA は cap 非依存的に ORF が翻訳されることから、NA と外来性遺伝子を一本の RNA から発現させることができる。

三つ目には口蹄疫ウイルス由来の 2A 蛋白質認識配列 (FMD 2A) を NA と外来性蛋白質の間に挿入する方法である¹⁶⁾。この認識配列によって外来性蛋白質がウイルス蛋白質から切断される。

NS 分節に外来遺伝子を挿入した組換えインフルエンザウイルス

つぎに、NS 分節に外来性遺伝子を挿入した例を紹介する (表 4)。インフルエンザウイルスの NS1 蛋白質は I 型インターフェロンのアンタゴニストの機能を持つ蛋白質である。外来性遺伝子配列を NS 分節に挿入して発現させることは実用的なアプローチであると考えられる。つまり、

表 4 NS 遺伝子に組み込まれた外来遺伝子を発現する組換えインフルエンザウイルス

外来遺伝子	戦 略	参考文献
HIV-1 Nef	口蹄疫ウイルス 2A	54, 55)
CAT	口蹄疫ウイルス 2A	21)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ESTA-6	口蹄疫ウイルス 2A	56, 57)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PUT3	NS1 と融合	58)
<i>Drosophila melanogaster</i> DmNcd	NS1 と融合	58)
GFP	カスパーゼ認識配列	20)
GFP	Stop-Start コドン	22)
Human IL-2	Stop-Start コドン	22)

表 5 パッケージングシグナル配列を用いた外来遺伝子導入インフルエンザウイルス

外来遺伝子	挿入遺伝子分節	参考文献
GFP	NA	26)
GFP	HA	32)
vesicular stomatitis virus G	HA	32)
Influenza B virus HA, NA	HA, NA	59)
GFP	NS	27)
GFP	PA, PB1, PB2	28)
GFP	PA, PB1, PB2	30)
Newcastle disease virus HN	NA	60)
GFP	HA	29)
GFP	NP	31)
Influenza C virus HEF	NA	61)

① NS 分節はインフルエンザウイルスのゲノム分節のなかで一番小さい(890 kb)ため、大きいサイズの蛋白質配列を挿入できる可能性が高いこと²²⁾

② I 型インターフェロンのアンタゴニスト機能を担う NS1 上のドメインが同定されていること²³⁾

③ NS2 発現に必須な mRNA のスプライシングに影響を与えることなく組換えインフルエンザウイルスを構築できること²⁴⁾

④ NS1 欠損ウイルスが弱毒化された表現型を示すこと
などによる²⁵⁾

具体的な戦略としては、NS1 の C 末端に外来性配列を挿入する方法、カスパーゼ認識配列や NA の場合と同様に FMD 2A を NS1 と外来性蛋白質の間に挿入し、宿主細胞内で外来性蛋白質を切断させる方法、そして B 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子分節にみられる Stop-start コドンを挿入し、bisctrionic に外来性遺伝子を発現させる方法が報告されている。

追加の遺伝子分節を持った組換えインフルエンザウイルス

外来性蛋白質遺伝子を組み込んだ分節を 9 本目の RNA 分節をウイルスに持たせることにより、外来性遺伝子を発現する組換えインフルエンザウイルスの作製も報告されている¹⁷⁾。

Zhou らはブタコレラウイルスの E2 蛋白質の細胞外領域を HA の膜貫通領域および細胞内領域と融合させたキメラ蛋白質をコードする分節を 9 本目とした 9 本鎖ウイルスを作製した¹⁸⁾。Strobel らは 9 本目の分節として緑色蛍光蛋白質(GFP)あるいはメラノーマ由来の腫瘍関連抗原をコードしたウイルスを作製した¹⁹⁾。

ゲノムパッケージング配列を用いた外来遺伝子挿入組換えインフルエンザウイルス

筆者らは、インフルエンザウイルスの分節が効率よくウイルス粒子に取り込まれるのには、vRNA の 5' と 3' 末端の非翻訳領域配列と翻訳領域の両端の配列(ゲノムパッケージング配列)が重要であること

を明らかにした^{26,30,32)}。この配列を用いて GFP などの外来性遺伝子を導入した各ゲノム分節を取り込ませることが可能になっただけでなく、水疱性口内炎ウイルスの G 蛋白質、B 型インフルエンザウイルスの HA や NA、ニューキャッスル病ウイルスの HN 蛋白質、あるいは C 型インフルエンザウイルスの hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) 蛋白質を安定的に発現する組換えインフルエンザウイルスが作製された(表 5)。

そして、挿入されたこれらの遺伝子は、継代を繰り返しても安定的に発現することが確認されており、今後はパッケージングシグナル配列を利用することにより遺伝子発現が安定なウイルスベクターが主流となる可能性が高い。

組換えインフルエンザウイルスを用いた不活化ワクチン作製

現行のインフルエンザワクチンは、HA 亜型の異なるウイルス感染に対する効果はない。つまり、HA 亜型の異なる新型ウイルスが世界的大流行(パンデミック)を引き起こした場合には、現行ワクチンでウイルスの拡がりを抑えることは不可能である。

また、たとえ HA 亜型が同じウイルスでも、ヒトのウイルスと抗原性が大きく異なればパンデミックウイルスになりうる。2009 年春に突然出現したブタ由来の新型 H1N1 ウイルスの蔓延により証明された。いずれにせよ新型ウイルスが出現した場合、パンデミックの進行、規模を抑えるために予防ワクチンの作製が急務である³³⁾。

パンデミックが危惧される H5N1 鳥ウイルスは高病原性であり、ワクチンの製造基材である発育鶏卵に接種すると胎児を殺すため高価で品質のよいウイルス液が回収できない。また、ワクチン製造者に対する安全面からも、高病原性ウイルスをそのままワクチン製造株として用いることはできない。

しかし、現在流行中の H5N1 高病原性ウイルスと抗原性が合致する低病原性ウイルスは存在しない。つまり、いずれの自然分離株もワクチン製造株として用いることができない。この問題は、リバー

ジェネティクスによる組換えウイルス作製のアプローチによって解決された。流行株と抗原性が同じで、発育鶏卵でよく増殖する弱毒ウイルスがワクチン製造株として人工的に作製された。つまり、高病原性 H5N1 ウイルスからクローニングした HA 遺伝子の病原性に関与する開裂部位コード領域を低病原性タイプに改変(RERRRKRR から RETR に変更)した HA 遺伝子と H5N1 流行株からクローニングした NA 遺伝子を持つ組換えウイルスである。

HA、NA 以外の 6 本の遺伝子は鶏卵高増殖性である PR8 株(PR8 をドナーウイルスとよぶ)由来である。この組換えウイルスは、ワクチン製造株として WHO から推奨されている³⁴⁾。先進国ではこの組換えウイルスをもとにした H5N1 プレパネミックワクチンの備蓄が進行中である。わが国でもワクチン原液がこれまでに 3,000 万人分備蓄されている。

一方、実際に H5N1 ウイルスによるパンデミックが発生した場合には、パンデミックウイルスを元にパンデミックワクチンが作製される。しかしながら、通常の季節性ワクチンと比較して、H5N1 ワクチン製造株の鶏卵における増殖性の低さ、ならびにヒトに対する免疫原性の低さが臨床試験から露見しており、パンデミックの拡がりを抑えるためには、できる限りのドーズ数のパンデミックワクチンを用意する必要がある。しかし、製造会社のワクチン生産能力には限界があるため、国内必要ドーズ数に到達するのでさえかなりの期間を要することが予想される。つまり、いまの生産量ではワクチンがつかれない発展途上国に行き渡る見込みはない。

この状況を克服する一つの方策は、鶏卵当たりのウイルス回収量を増加させワクチンドーズ数を増やすことである。たとえば、WHO が推奨したプレパネミックワクチン製造株(NIBRG-14 株)は季節性ワクチン製造株と比較すると、鶏卵での増殖性が数段劣る。H5N1 ワクチン製造株のドナーウイルスは PR8(Cambridge) 株であるが、同じ PR8 株でも継代歴により増殖性状に随分違いがみられる。たとえば、筆者らの研究室で保有している PR8(UW) 株をドナーとして用いると同じ遺伝子組成の製造株の鶏卵増殖性は 4 倍も上がる³⁵⁾。さらに、NA 遺伝子を

図3 H5N1 ワクチン製造候補株の発育鶏卵増殖性

PR8(UW) 株をドナーウイルスとする PR8/H5N1 リアソータントの増殖性を WHO 推奨株(NIBRG-14)と比較した。それぞれ HA と NA 遺伝子が同一株由来の場合と PR8(UW) 由来の NA を持つ場合の増殖性を調べた。VN1194(A/Vietnam/1194/04) と 30259(A/Vietnam/30259/04) は、クレード 1、Indonesia3006(A/Indonesia/3006/05)はクレード 2.1、Mongolia4(A/whooper swan/Mongolia/4/05) は、クレード 2.2、Hanoi30850(A/Vietnam/30850/05)と Anhui2(A/Anhui/2/05)はクレード 2.3 に属する。33℃で 48 時間培養後のウイルス感染価をブラック力価で表示した。

流行株由来から PR8(UW) 株由来のものに置き換えると、さらに 3 倍上がる。他の分子系統グループ(クレード)に属する分離株での実験でも PR8(UW) の NA を用いたほうが、有意に増殖性が上がる(図 3)。

また、入手に困難を来す発育鶏卵の代替手段として培養細胞を用いたワクチンの開発が海外を中心に進展している。培養細胞での増殖にすぐれるドナーウイルスを用いれば、生産性の高い製造株が作製できる。たとえば、PR8(UW) 株は PR8(Cambridge) 株より Mardin-Darby canine kidney(MDCK) 細胞での増殖性が数段よく、ドナーウイルスとしての活用が充分考えられる。PR8(UW) 株をバックグラウンドに持つウイルスで、よりストック領域の長い NA に置き換えたり、NS 遺伝子を PR8(Cambridge) 株と置き換えたりすることで MDCK 細胞での増殖性を高めることができる(図 4)³⁶⁾。

図4 H5N1 ワクチン製造候補株の MDCK 細胞での増殖性 PR8(UW) 株をドナーウイルスとする組換えワクチン製造株の MDCK 細胞での増殖性を調べた。

それぞれ HA と NA 遺伝子が同一株由来の場合と長い NA を持つ場合、そして NS 遺伝子を PR8(Cambridge) 株の由来と置き換えた場合のウイルスの増殖性を調べた。VN1203(A/Vietnam/1194/04) と VN30259(A/Vietnam/30259/04)、VN3030(A/Vietnam/30259/04) はクレード 1、Indonesia3006(A/Indonesia/3006/05) はクレード 2.1、Anhui2(A/Anhui/2/05) はクレード 2.3 に属する。33℃で 48 時間培養後のウイルス感染価をブラック力価で表示した。

このように、ワクチン製造株の遺伝子組成を工夫、変更することにより、抗原性を維持したままワクチン製造株の発育鶏卵や培養細胞での増殖性を上昇させることは可能である。

組換えインフルエンザウイルスを用いた弱毒生ワクチン作製

リバースジェネティクスにより、いくつかの弱毒変異ウイルスが作製されている。たとえば、NS1 の C 末欠損ウイルス⁶²⁾、M2 欠損ウイルス⁶³⁾、NA 欠損ウイルス⁶⁴⁾ などである。野生株とくらべいずれも弱毒化していること、また生ワクチンとしての免疫原性も充分であることが動物モデルで示されている。

また最近では、microRNA(miRNA) 認識配列をウイルス RNA に導入することで、弱毒化されたウ

ウイルスが作製できることが、レンチウイルス、ピコルナウイルスやラブドウイルス同様にインフルエンザウイルスでも報告された⁶⁵⁾。PR8 株の NP 遺伝子に miRNA-93 の応答因子を導入したウイルスを作製し、ヒト細胞株やマウスに接種したところ、野生型のウイルスよりも増殖が抑えられた。また miRNA-93 の認識配列を持つ組換えウイルスで免疫されたマウスは、野生型の PR8 株や H5N1 ウイルス株の攻撃を防御することがわかり、今後の応用が期待されている。

おわりに

インフルエンザウイルスのこれまでの基礎研究の積み重ねが、リバーシジェネティクスの確立につながり、その結果、任意の変異ウイルスを作製することが可能になった。また、この技術は H5N1 ワクチン株の作製にも貢献した。近い将来、インフルエンザワクチン株はすべてリバーシジェネティクスによって作製されるようになると推測される。これからも偶発的に出現しつづけるであろう新型インフルエンザをすべからず制圧できるようなユニバーサルワクチンの開発を期待したい。

一方、リバーシジェネティクスによるウイルス改変技術は、今後インフルエンザウイルスをベクター化する試みにも向けられている。インフルエンザウイルスの持つ効率のよい感染性をウイルスベクターに応用することにより、これまでにはないユニークなベクターウイルスの開発が期待される。特に、ほかのウイルスベクターではカバーできない難治性呼吸器疾患などに焦点を絞ったインフルエンザベクター開発は有用であろう。

文 献

- 1) Verma I, Weitzman M : Gene therapy : twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74 : 711-738, 2005.
- 2) Luytjes W, Krystal M, Enami M, Parvin J, Palese P : Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 59 : 1107-1113, 1989.
- 3) Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H et al. : Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 9345-9350, 1999.
- 4) Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG et al. : Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* 73 : 9679-9682, 1999.

- 5) Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster R : A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 6108-6113, 2000.
- 6) Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y : An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 : 16825-16829, 2005.
- 7) de Wit E, Spronken MI, Vervaeke G, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD et al. : A reverse-genetics system for Influenza A virus using T7 RNA polymerase. *J Gen Virol* 88 : 1281-1287, 2007.
- 8) Li Z, Mueller SN, Ye L, Bu Z, Yang C et al. : Chimeric influenza virus hemagglutinin proteins containing large domains of the Bacillus anthracis protective antigen : protein characterization, incorporation into infectious influenza viruses, and antigenicity. *J Virol* 79 : 10003-10012, 2005.
- 9) Machado A, Naffakh N, van der Werf S, Escriviou N : Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter. *Virology* 313 : 235-249, 2003.
- 10) Vieira Machado A, Naffakh N, Gerbaud S, van der Werf S, Escriviou N : Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence : induction of heterospecific B and T cell responses in mice. *Virology* 345 : 73-87, 2006.
- 11) García-Sastre A, Muster T, Barclay W, Percy N, Palese P : Use of a mammalian internal ribosomal entry site element for expression of a foreign protein by a transfectant influenza virus. *J Virol* 68 : 6254-6261, 1994.
- 12) Restifo N, Surman DR, Zheng H, Palese P, Rosenberg SA et al. : Transfectant influenza A viruses are effective recombinant immunogens in the treatment of experimental cancer. *Virology* 249 : 89-97, 1998.
- 13) Miyahira Y, García-Sastre A, Rodriguez D, Rodriguez JR, Murata K et al. : Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8⁺ responses in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 3954-3959, 1998.
- 14) Nakaya Y, Nakaya T, Park MS, Cros J, Imanishi J et al. : Induction of cellular immune responses to simian immunodeficiency virus gag by two recombinant negative-strand RNA virus vectors. *J Virol* 78 : 9366-9375, 2004.
- 15) Nakaya Y, Zheng H, García-Sastre A : Enhanced cellular immune responses to SIV Gag by immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. *Vaccine* 21 : 2097-2106, 2003.
- 16) Percy N, Barclay W, García-Sastre A, Palese P : Expression of a foreign protein by influenza A virus. *J Virol* 68 : 4486-4492, 1994.
- 17) Enami M, Sharma G, Benham C, Palese P : An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185 : 291-298, 1991.
- 18) Zhou Y, König M, Hobom G, Neumeier E : Membrane-anchored incorporation of a foreign protein in recombinant influenza virions. *Virology* 246 : 83-94, 1998.
- 19) Strobel I, Krumbholz M, Menke A, Hoffmann E, Dunbar PR et al. : Efficient expression of the tumor-associated antigen MAGE-3 in human dendritic cells, using an avian influenza virus vector. *Hum Gene Ther* 11 : 2207-2218, 2000.
- 20) Kittel C, Sereinig S, Ferko B, Stasakova J, Romanova J et al. : Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *Virology* 324 : 67-73, 2004.
- 21) Takasuka N, Enami M, Itamura S, Takemori T : Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in

- mice. *Vaccine* 20 : 1579-1585, 2002.
- 22) Kittel C, Ferko B, Kurz M, Voglauer R, Sereinig S et al. : Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol* 79 : 10672-10677, 2005.
- 23) Lin D, Lan J, Zhang Z : Structure and function of the NS1 protein of influenza A virus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39 : 155-162, 2007.
- 24) García-Sastre A, Egorov A, Matasov D, Brandt S, Levy DE et al. : Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252 : 324-330, 1998.
- 25) Talon J, Salvatore M, O'Neill RE, Nakaya Y, Zheng H et al. : Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins : A vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 4309-4314, 2000.
- 26) Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y : Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 2002-2007, 2003.
- 27) Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T et al. : Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* 79 : 3766-3774, 2005.
- 28) Liang Y, Hong Y, Parslow T : cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* 79 : 10348-10355, 2005.
- 29) Marsh G, Hatami R, Palese P : Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. *J Virol* 81 : 9727-9736, 2007.
- 30) Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K et al. : Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* 80 : 2318-2325, 2006.
- 31) Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S et al. : Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol* 81 : 30-41, 2007.
- 32) Watanabe T, Watanabe S, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y : Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* 77 : 10575-10583, 2003.
- 33) Horimoto T, Kawaoka Y : Influenza : lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3 : 591-600, 2005.
- 34) Wood J, Robertson J : From lethal virus to life-saving vaccine : developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat Rev Microbiol* 2 : 842-847, 2004.
- 35) Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, Yamada S, Fujii K et al. : Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology* 366 : 23-27, 2007.
- 36) Murakami S, Horimoto T, Yamada S, Kakugawa S, Goto H et al. : Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *J Virol* 82 : 10502-10509, 2008.
- 37) Rodrigues M, Li S, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR et al. : Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J Immunol* 153 : 4636-4648, 1994.
- 38) Li S, Polonis V, Isobe H, Zaghoulani H, Guinea R et al. : Chimeric influenza virus induces neutralizing antibodies and cytotoxic T cells against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67 : 6659-6666, 1993.
- 39) Gonzalo R, Rodríguez D, García-Sastr A, Rodríguez JR, Palese P et al. : Enhanced CD8+ T cell response to HIV-1 env by combined immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. *Vaccine* 17 : 887-892, 1999.
- 40) Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A et al. : Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J Virol* 68 : 4031-4034, 1994.
- 41) Muster T, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Trkola A et al. : Mucosal model of immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a chimeric influenza virus. *J Virol* 69 : 6678-6686, 1995.
- 42) Gherardi M, Nájera JL, Pérez-Jiménez E, Guerra S, García-Sastre A et al. : Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes. *J Virol* 77 : 7048-7057, 2003.
- 43) Staczek J, Gilleland HE Jr, Gilleland LB, Hartly RN, García-Sastre A et al. : A chimeric influenza virus expressing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* affords protection against challenge with *P. aeruginosa* in a murine model of chronic pulmonary infection. *Infect Immun* 66 : 3990-3994, 1998.
- 44) Thomas P, Brown SA, Yue W, So J, Webby RJ et al. : An unexpected antibody response to an engineered influenza virus modifies CD8+ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 2764-2769, 2006.
- 45) Isobe H, Moran T, Li S, Young A, Nathenson S et al. : Presentation by a major histocompatibility complex class I molecule of nucleoprotein peptide expressed in two different genes of an influenza virus transfectant. *J Exp Med* 181 : 203-213, 1995.
- 46) Murata K, García-Sastre A, Tsuji M, Rodrigues M, Rodriguez D et al. : Characterization of in vivo primary and secondary CD8+ T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses. *Cell Immunol* 173 : 96-107, 1996.
- 47) Castrucci M, Bilsel P, Kawaoka Y : Attenuation of influenza A virus by insertion of a foreign epitope into the neuraminidase. *J Virol* 66 : 4647-4653, 1992.
- 48) González-Aseguinolaza G, Nakaya Y, Molano A, Dy E, Esteban M et al. : Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8+-T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*. *J Virol* 77 : 11859-11866, 2003.
- 49) Castrucci M, Hou S, Doherty P, Kawaoka Y : Protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection by immunization of mice with an influenza virus containing an LCMV epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 68 : 3486-3490, 1994.
- 50) Mueller S, Renard A, Boato F, Vogel, D, Naegeli M et al. : The early expression of glycoprotein B from herpes simplex virus can be detected by antigen-specific CD8+ T cells. *J Virol* 77 : 2445-2451, 2003.
- 51) Efferson C, Schickli J, Ko BK, Kawano K, Mouzi S et al. : Activation of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by human dendritic cells infected with an attenuated influenza A virus expressing a CTL epitope derived from the HER-2/neu proto-oncogene. *J Virol* 77 : 7411-7424, 2003.
- 52) He Q, Martinez-Sobrido L, Eko FO, Palese P, Garcia-Sastre A et al. : Live-attenuated influenza viruses as delivery vectors for Chlamydia vaccines. *Immunology* 122 : 28-37, 2007.
- 53) Blaney JJ, Nobusawa E, Brehm MA, Bonneau RH, Mylin LM et al. : Immunization with a single major histocompati-

- bility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte recognition epitope of herpes simplex virus type 2 confers protective immunity. *J Virol* 72 : 9567–9574, 1998.
- 54) Ferko B, Stasakova J, Sereinig S, Romanova J, Katinger D et al. : Hyperattenuated recombinant influenza A virus non-structural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol* 75 : 8899–8908, 2001.
  - 55) Ferko B, Stasakova J, Romanova J, Kittel C, Sereinig S et al. : Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol* 78 : 13037–13045, 2004.
  - 56) Stukova M, Sereinig S, Zabolotnyh NV, Ferko B, Kittel C et al. : Vaccine potential of influenza vectors expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein. *Tuberculosis (Edinb)* 86 : 236–246, 2006.
  - 57) Sereinig S, Stukova M, Zabolotnyh N, Ferko B, Kittel C et al. : Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol* 13 : 898–904, 2006.
  - 58) Wang X, Basler CF, Williams BR, Silverman RH, Palese P et al. : Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. *J Virol* 76 : 12951–12962, 2002.
  - 59) Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Goto H et al. : Generation of influenza A viruses with chimeric (type A/B) hemagglutinins. *J Virol* 77 : 8031–8038, 2003.
  - 60) Park M, Steel J, García-Sastre A, Swayne D, Palese P : Engineered viral vaccine constructs with dual specificity : avian influenza and Newcastle disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 8203–8208, 2006.
  - 61) Gao QS, Brydon EWA, Palese P : A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF. *J Virol* 82 : 6419–6426, 2008.
  - 62) Watanabe T, Watanabe S, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y : Novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines : use of M2 cytoplasmic tail mutants. *J Virol* 82 : 2486–2492, 2008.
  - 63) Falcón AM, Fernandez-Sesma A, Nakaya Y, Moran TM et al. : Attenuation and immunogenicity in mice of temperature-sensitive influenza viruses expressing truncated NS1 proteins. *J Gen Virol* 86 : 2817–2821, 2005.
  - 64) Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, Kawaoka Y : Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. *J Virol* 78 : 3083–3088, 2004.
  - 65) Perez JT, Pham AM, Lorini MH, Chua MA, Steel J et al. : MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus. *Nat Biotechnol* 27 : 572–576, 2009.