

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) ロタウイルス人工合成法による新規予防戦略
(英語) Development of new rotavirus vaccines using reverse genetics system

研究開発実施期間：2017年10月2日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 小林 剛
(英語) Takeshi Kobayashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 大阪大学・微生物病研究所・准教授
(英語) Osaka University・Research Institute for Microbial Diseases・Associate Professor

II 研究開発の概要

1) ワクチン産生細胞における増殖効率が高いロタウイルスの作製

リバースジェネティクス系が確立されているサルロタウイルス SA11 株をワクチン産生細胞で連続継代することで、ワクチン産生細胞において増殖性の高い SA11 株変異体の作製を試みた。また、SA11 株以外の増殖能が高いロタウイルス株候補として、サルロタウイルス RRV 株とヒトロタウイルス Odelia 株の全遺伝子の単離と配列決定を行った。得られたワクチン産生細胞馴化 SA11 株の全分節ゲノムの塩基配列決定を行い、馴化に関わる分節遺伝子内のアミノ酸領域の同定を行った。さらに、野生型の SA11 株の馴化に関わると予想される遺伝子内にアミノ酸変異を加えた組換えウイルスを作製、解析した結果、これらの組換えウイルスのワクチン産生細胞における増殖能は野生型ウイルスと比較して増加した。得られた結果を基に、ワクチン産生細胞での馴化に関わる分節遺伝子領域にランダムなアミノ酸変異を導入し、得られた組換えウイルスライブラリーをワクチン産生細胞で継代し、さらに効率よく増殖する馴化ウイルスの作製を試みた。本研究成果は安価なワクチンを効率的に作製する上で有用な成果である。

2) 病原性の低下した弱毒化ロタウイルスの作製

病原性に関与すると予想される NSP4 遺伝子 (エンテロトキシン) に変異を導入したサル由来ロタウイルスの作製・解析を行った。培養細胞で作製した NSP4 アミノ酸変異体の増殖能について解析を行った結果、一部の変異株において培養細胞で増殖能が大幅に低下していたが、多くの変異体は親株と同程度の複製能を示した。様々な増殖性を持つ NSP4 変異体をマウスに経口感染させ、下痢発症能について解析を行った。その結果、下痢発症能が低下していた幾つかの NSP4 変異体を得られた。また、ヒトロタウイルス Odelia 株のリバースジェネティクス系を開発し、NSP1 遺伝子の変異体についても作製した。これらの成果は病原性の

低下したワクチン開発を行う上で有用と考えられる。

3) 多様な抗原性 (VP4、VP7 遺伝子) を持つハイブリッドロタウイルスの作製および解析

リバースジェネティクス系により作製されたロタウイルスの抗原性決定基である VP4 および VP7 遺伝子のみを置換した任意の抗原性を持つハイブリッドウイルスの作製ならびに免疫学的解析を行った。SA11 株をバックボーンに、VP4 遺伝子の 2 遺伝子型 (P[4], P[8]) もしくは VP7 遺伝子の 7 遺伝子型 (G1, G2, G3, G4, G8, G9, G16) をそれぞれ持つハイブリッドウイルスを作製した。作製した異なる遺伝子型由来の VP4 遺伝子を持つハイブリッドウイルス (SA11-hVP4) では増殖能が低下していた。VP7 遺伝子ハイブリッドウイルスについては、親株と同程度の増殖性を示した。SA11 株 VP4 P[2]型特異的モノクローナル抗体を用いて、得られたハイブリッドウイルスの中和抗体反応性を解析した結果、P[2]型でないハイブリッドウイルスグループ (SA11-hVP4) では中和されなかった。一方、P[2]型を有する親株 SA11、SA11-hVP7 ウイルスグループでは中和活性が認められた。次に全ての遺伝子型由来の VP4 を認識するユニバーサル抗体を用いて同様の解析を行った。その結果、予想通り親株 SA11 を含む全ての VP4 遺伝子型 (P[2], P[4], P[8]) を持つウイルスに対して中和活性を示した。SA11 株に対するマウス感染血清を用いて、得られたハイブリッドウイルスの中和抗体反応性を解析した結果、全てのハイブリッドウイルスで中和活性が認められたものの、中和活性は各 VP4、VP7 遺伝子の抗原性に依存することが示唆された。G9P[2]型ハイブリッドウイルスをマウスに免疫し、得られた感染血清を用いて中和活性を測定した。その結果、異なる遺伝子型のハイブリッドウイルス (SA11-hVP4 ウイルス群) に対して中和活性は認められなかったが、同じ P あるいは G 遺伝子型を含むハイブリッドウイルスでは中和活性が認められた。また、同じ G9P[2]型のハイブリッドウイルスを用いた場合、株間で異なる抗原性を持つことが示唆された。これらの結果は、多様な遺伝子型に対する中和抗体反応性を理解する上で有用な情報である。より多くの異なる遺伝子型および同じ遺伝子型でも異なる株から得た VP4、VP7 遺伝子を持つハイブリッドウイルスの作製は今後も継続して行うことが必要と考えられる。

英文：

Rotaviruses, members of the family *Reoviridae*, are a highly prevalent cause of severe diarrhea in infants and young children worldwide and are responsible for approximately 215,000 deaths annually, mostly in developing countries. Two licensed rotavirus vaccines, Rotarix (GSK) and RotaTeq (Merck), are currently available. Although these vaccines are effective against rotavirus-associated severe gastroenteritis, concerns about their efficacy, safety, and cost have inspired the development of new vaccines.

The absence of a reliable reverse genetics platform has been a major roadblock in the rotavirus field, precluding numerous studies of rotavirus replication and pathogenesis and hampering efforts to develop the next generation of rotavirus vaccines. Recently, we have developed a plasmid-based reverse genetics system for rotavirus. Using this technology and resource of clinical rotavirus isolates, we tried to develop next-generation vaccines as follows.

1) Development of high-yield rotavirus vaccine seed viruses in cell lines for vaccine production.

To obtain high-yield vaccine seed viruses in cell lines approved for vaccine production, we serially passaged simian rotavirus strain SA11 in a cell line for vaccine production. We found that strain SA11 could replicate efficiently in a cell line for vaccine production after serial passage. Sequence analysis of the adapted-SA11 virus identified several gene segments associated with highly replication in a cell line for vaccine production. To confirm the effect of gene segments of the adapted virus in viral replication, we generated recombinant rotaviruses containing the identified gene segments derived from the adapted virus.

Replication kinetics of the generated recombinant viruses showed efficient replication in a cell line for vaccine production. These results suggested that the adapted viruses may serve as a promising candidate for rotavirus vaccine seed viruses.

2) Development of highly attenuated vaccine seed viruses.

Rotavirus nonstructural protein 4 (NSP4) is responsible for the enterotoxin activity, which plays its role in the epithelial cells and causes diarrhea. To develop attenuated rotavirus vaccine candidates, we generated various NSP4 amino acid mutant viruses by reverse genetics system. Using a mouse model of gastrointestinal rotavirus infection, several NSP4 mutant viruses have shown to reduce rotavirus-induced diarrhea in the mouse model. Such NSP4 mutant viruses can be used to generate effective recombinant vaccines to inhibit rotavirus infection.

3) Development of clade-specific and broadly reactive rotavirus virus vaccines.

Rotavirus virion is packaged within VP7 and VP4 coat proteins, which define G and P serotypes, respectively. A significant number of rotavirus strains with diverse serotypes are prevalent worldwide. We propose to establish a platform for tailoring rotavirus vaccines to meet regional needs by modifying outer capsid proteins VP4 and VP7 using plasmid-based reverse genetics. We generated recombinant viruses using the simian rotavirus strain SA11 (G3P[2]) genome, and VP4 and VP7 coat proteins from human rotavirus strains. A neutralization assay using a monoclonal antibody against strain SA11 VP4 demonstrated clear alterations in the antigenicity of the recombinant VP4 variants. Mouse anti-SA11 antiserum neutralized VP4/VP7 variants to different degrees, indicating that both VP4 and VP7 individually affected viral antigenicity. This strategy of generating viruses with novel VP4 and VP7 combinations contributes to rapid production of tailor-made vaccine strains.

III 事後評価総合所見

総じて計画通りの進捗であり、開発したリバースジェネティクス系を用いてVero細胞株での高増殖株や弱毒化株ならびに多様な抗原性を持つハイブリッドウィルス株を取得できる事が示され、実用化への着実な一歩を踏み出せました。セットアップ企業との連携体制も良好であり、これらは高く評価できます。

今後は、明確となった課題を克服し開発を更に進めるとともに、PMDAとの早期からの対話を通じしっかりした開発戦略を構築し、研究開発を進められることを期待します。