

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 迅速な製造が可能な新型インフルエンザワクチンの開発技術に関する研究

(英語) Research on the development in the rapid production technology of pandemic influenza vaccine

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所・室長・信澤枝里

所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases・Laboratory chief・
Eri Nobusawa

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

- ・ 分担研究課題名： (日本語) 研究統括、および培養系に適したワクチン株作製系の技術開発

(英語) Research supervision and development of vaccine strains suitable for the culture system

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所・室長・信澤枝里

所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases・Laboratory chief・
Eri Nobusawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文)

細胞培養ワクチン製造用種株開発のため、ワクチン製造用に品質管理された細胞 (NIID-MDCK 細胞) で高増殖を示す高増殖母体ウイルス (hg-PR8 株, ウイルス力価=10^{8.6} PFU/mL.) の開発とその有用性の検討を行った。開発した hg-PR8 株の母体ウイルスとしての有用性を検討するため、H7N9 亜型の 6:2 リアソータントウイルス (NIIDRG-10.1C、NIIDRG-10C) (HA, NAA/Anhui/1/2013 由来、それ以外の遺伝子 hg-PR8 由来) をリバースジェネティクス法 (RG 法) により作製した。両ウイルスとも NIID-MDCK 細胞で良好な増殖性及び抗原的安定性を示した。両ウイルスと HA, NA が同じ配列を持つ鶏卵用のワクチン株候補 (NIIDRG-10.1 および NIIDRG-10) と、NIID-MDCK 細胞でのウイルス

蛋白収量を比較した結果、NIIDRG-10.1C、NIIDRG-10C は鶏卵用のワクチン株候補より 1.5~2 倍高いウイルス蛋白収量を示した。以上の結果から、hg-PR8 は細胞培養用ワクチン株母体ウイルスとして有用であることが示唆された。(鈴木康司)

H5N1 鶏卵ワクチン株候補 21 株の HA タンパク収量を測定した結果、株により収量に違いがあった。HA 収量の違いが生じる原因を明らかにするため、まずクレード 2.2 に属する高収量株、低収量株を用いて母体ウイルスを統一させたリアソータントを作製した。作製したリアソータントの HA 収量を測定した結果、低収量株の収量が改善された。この結果は、母体ウイルスの違いが HA 収量に影響を及ぼすことを示唆している。一方、HA, NA 分節両末端の非翻訳領域の違いが HA 収量に及ぼす影響を調べるため、クレード 1 に属する高 HA 収量株および低収量株で、非翻訳領域(NCR)を入れ替えたウイルスを作製した。その結果、低収量株の HA 収量は改善され、高収量株の HA 収量は低下した。この結果は、ウイルスの HA3' NCR も HA 収量に影響を及ぼすことを示唆している。(有田知子)

高タンパク(HA)収量種株の効率的回収系の開発のため A/H1N1pdm09 ウイルスを対象に分節間適合性を検討した。その結果、A/California7/2009 (CA) 株 NA 分節を持ち他 7 分節はワクチン親株 (PR8) である組換えウイルスは容易に回収できたが、CA 株 HA 分節を持つウイルスの回収にはヒト α 2,6 シアル酸転移酵素の強発現細胞が必要であった。これらを同時交換したウイルスは回収できなかったが、分節末端領域の一部を PR8 株配列に置換すると可能になった。CA 株 HA および NA の膜貫通~細胞質尾部領域を PR8 株由来にキメラ化すると発現量が増加した。これらを共発現させると CA 株 HA の膜輸送と膜集積効率が向上した。共沈降試験では CA 株 HA または NA 分節と PR8 株他分節の親和性測定が困難であったため、感染細胞内で HA/NA 分節と近接する特定分節の検出を試みている。(百瀬文隆)

抗原変異株に有効な免疫応答では、複数のインフルエンザ HA に交差結合する B 細胞と抗体が重要な役割を果たす。この交差防御性に優れた抗体誘導能をもつワクチンと免疫法を確立するため、交差結合性 B 細胞を高感度・特異性で同定する技術を開発した。この技術を駆使したマウスモデルの解析から、交差防御性に優れたインフルエンザワクチン開発に必要なワクチン抗原剤型、免疫増強剤、投与方法を絞り込むことに成功した。(高橋宜聖)

(英文)

High-growth master virus (hg-PR8) adapted to qualified NIID-MDCK cells, which shows an infectivity titer of $10^{8.6}$ PFU/mL, was developed and assessed the suitability as a master virus for generating vaccine viruses. To assess the suitability of hg-PR8 as a master virus, we generated two 6:2 reassortant viruses, NIIDRG-10C and -10.1C, possessing the HA and NA from A/Anhui/1/2013 (H7N9) and the remaining segments from hg-PR8. Both viruses showed a good growth capacity and antigenic stability in NIID-MDCK cell. Virus protein yields of NIIDRG-10C and -10.1C were 1.5- to 2-fold higher than those of NIIDRG-10 and -10.1, whose HA and NA are identical with those of NIIDRG-10C and -10.1C, respectively, and the remaining genes from egg adapted PR8 virus. These result suggested that the hg-PR8 is suitable as a master virus for generating cell based vaccine viruses. (鈴木康司)

We have compared HA protein yields of twenty one egg-grown-H5N1 candidate vaccine viruses and found that there were differences in their yields. To find out the reason for the differences in the HA yields, we have developed two reassortants whose HA and NA were derived from high yield

and low yield strains of clade 2.2. by using a common backbone virus. As a result, the HA yield of low yield strain was improved, suggesting the influence of backbone virus on the HA yield. On the other hand, to examine the effect of non-coding regions of HA and NA segments on the HA yields, we have exchanged the non coding regions (NCR) of HA and NA segments of high yield and low yield strains of clade 1 viruses. As a result, the HA yield of low yield strain was improved and that of high yield strain was decreased, suggesting the NCR is related to the HA yield of the vaccine viruses. (有田知子)

To develop the strategy for the isolation of high HA yield viruses, we have examined the inter-segment affinity of A/H1N1pdm09 viruses. The recombinant virus with A/California/7/09 (CA) NA and remaining segments from the parent vaccine strain (PR8) was easily recovered but the virus with the CA-HA required to be propagate in cells strongly expressing human α -2,6-sialyltransferase (SIAT1). The virus having both CA-HA and -NA segments was not recovered unless the terminal regions of these CA segments were replaced with PR8 strain sequences. When the transmembrane (TM) to cytoplasmic tail (CT) region in CA-HA and NA was replaced with that of PR8, the expression levels of CA-PR8 chimeric HA and NA increased. Co-expression of PR8-CA chimeric NA facilitated membrane trafficking and accumulation of CA-HA. Since it was difficult to measure the affinity of the CA-HA or -NA segment for the other PR8 strain segment using a coprecipitation assay, we are attempting to detect specific segments neighboring to the HA/NA segment in infected cells.(百瀬文隆)

Broadly reactive B cells and antibodies against hemagglutinin of influenza viruses play important roles during the protective immunity to variant viruses. To construct the vaccine platforms for providing broad protection, we have developed a novel detection technology for broadly reactive B cells with high specificity and sensitivity. In this study, we have successfully identified vaccine formulations that potentiate the ability of influenza vaccines to provide broad protection. (高橋宜聖)

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3 件、国際誌 4 件)

1. Suzuki Y, Odagiri T, Tashiro M, Nobusawa E. Development of an Influenza A Master Virus for Generating High-Growth Reassortants for A/Anhui/1/2013(H7N9) Vaccine Production in Qualified MDCK Cells. PLoS One. 2016.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160040>
2. WADA Y, NITHICHANON A, NOBUSAWA E, MOUISE L, MARTIN WD, TERAHARA T, HAGIWARA H, TAKEYAMA H, DE GROOT AS, ATO M, TAKAHASHI Y. A humanized mouse model identifies key amino acids in H7 hemagglutinin that lower the immunogenicity of H7N9 influenza vaccines. Scientific Rep. in press
3. ONODERA, T., HOSONO, A., ODAGIRI, T., TASHIRO, M., KAMINOGAWA, S., KUROSAKI, T., ATO, M., KOBAYASHI, K., TAKAHASHI, Y. Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through Toll-like receptor signalings. J. Immunol. 196:4172-4184, 2016
4. 高橋宜聖 インフルエンザウイルスの免疫回避術と B 細胞免疫の適応戦略 感染炎症免疫

2016, 46, 2-9.

5. 高橋宜聖 感染免疫における胚中心依存的な B 細胞記憶応答 臨床免疫・アレルギー科 2016, 66, 283-288.
6. ADACHI, Y., ONODERA, T., YAMADA, Y., DAIO, R., TSUJI, M., INOUE, T., KOBAYASHI, K., KUROSAKI, T., ATO, M., TAKAHASHI, Y. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. J. Exp. Med., 212, 1709-1723, 2015
7. 高橋宜聖、安達悠 細胞工学 ウイルス抗原変異に対抗する新しい防御抗体 516-520、第 34 巻・第 5 号、2015

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Yasushi Suzuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Eri Nobusawa : Development of a high-growth PR8 master virus for influenza vaccine production in cell culture systems. (口頭) 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015 年 11 月 国内
2. Development of a high-growth PR8 master virus for influenza vaccine production in cell culture systems、ポスター、Yasushi Suzuki、Takato Odagiri、Masato Tashiro、Eri Nobusawa、Sheraton Grand Chicago Hotel、2016 年 8 月 27 日、Options IX for The Control of Influenza、国外
3. Different accessibility of strain-specific versus cross-reactive BCRs to virus particles regulates site-specific germinal center selection. 口頭、Yu Adachi, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi 第 45 回日本免疫学会総会 2016/12/7, 国内.
4. Follicular helper NKT cells induce protective effect of a protein-based pneumococcal vaccine through stimulation of IgG production by B cells. 口頭、Makiko Nakahara, Shogo Takatsuka, Keigo Ueno, Taishi Onodera, Yoshimasa Takahashi, Kazuyoshi Kawakami, Masato Kubo, Yuki Kinjo 第 45 回日本免疫学会総会 2016/12/7, 国内.
5. B 細胞の分化・活性化と液性免疫記憶, 口頭, 高橋宜聖, 第 44 回日本免疫学会総会シンポジウム, 2015/11/19, 国内
6. Low immunogenicity of influenza H7N9 vaccines as revealed by hu-SCID mouse system. 口頭, Yamato Wada, Seiji Okada, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi. 第 44 回日本免疫学会総会 2015/11/20, 国内
7. Germinal centers and follicular helper T cells are dispensable for a protective antibody response to acute influenza A virus infection. 口頭, Kosuke Miyauchi, Akiko Sugimoto-Ishige, Yoshimasa Takahashi, Hideki Hasegawa, Toshitada Takemori, Masato Kubo. 第 44 回日本免疫学会総会 2015/11/20, 国内
8. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. 口頭, Yu Adachi, Taishi Onodera, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi. 第 44 回日本免疫学会総会 2015/11/18, 国内
9. CD273+ memory B cells replenish bone marrow plasma cells in the steady state after influenza vaccination. 口頭, Taishi Onodera, Takahiro Adachi, Takeshi Tsubata, Tomohiro Kurosaki, Yu Adachi, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi. 第 43 回日本免疫学会総会 2014/12/11, 国内
10. Influenza A virus (IAV) vaccination effectively induces germinal center independent protective immunity. 口頭, Kosuke Miyauchi, Akiko Sugimoto-Ishige, Yoshimasa Takahashi, Hideki Hasegawa, Toshitada Takemori, Masato Kubo. 第 43 回日本免疫学会総会 2014/12/11, 国内
11. Persistent local germinal centers select cross-reactive antibody into immunological memory following

- influenza virus infection. 口頭, Yu Adachi, Takeshi Inoue, Tomohiro Kurosaki, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi. 第 43 回日本免疫学会総会 2014/12/10, 国内
12. B 細胞を介する免疫抑制, 口頭, 黒崎知博, 松本真典, 大海雄介, 高橋宜聖, 古川鋼一, 馬場義裕, 第 42 回日本臨床免疫学会総会シンポジウム, 2014/9/25, 国内
 13. B cell pathways for protective memory responses against influenza virus infection. 口頭, Yoshimasa Takahashi, Manabu Ato, Yu Adachi. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2014/9/25, 国内
 14. Assessment of the potential interaction between the genome segments of influenza A virus by using reconstituted vRNP complexes, 口頭, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa, 第 64 回 日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
 15. Co-transport mechanisms of influenza virus HA and NA for the apical plasma membrane, 口頭, Takafumi Kamei, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa, 第 64 回 日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
 16. Identification of the apical transport pathways of influenza virus HA and NA by using the Rab proteins, ポスター, Ryota Sato, Fumitaka Momose, Naoki Takizawa, Yuko Morikawa, 第 64 回 日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
 17. 再構成 vRNP 複合体を用いた A 型インフルエンザウイルスゲノム分節間相互作用の評価, ポスター, 百瀬 文隆, 森川 裕子, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内.
 18. 再構成 vRNP 複合体を用いた A 型インフルエンザウイルスゲノム分節間相互作用の評価, 口頭, 百瀬 文隆, 森川 裕子, 6th Negative Strand Virus-Japan, 2017/1/17, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
発表なし。

(4) 特許出願
該当なし。

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名：(日本語) 迅速な製造が可能な新型インフルエンザワクチンの開発技術に関する研究
(英語) Research on the development in the rapid production technology of pandemic influenza vaccine

補助事業担当者 (日本語) 信澤 枝里
所属 役職 氏名：(英語) Eri Nobusawa

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語) 抗原変異株に有効な免疫を賦与するワクチン株と免疫方法の同定
(英語) Development of vaccines that provide broad protection to mutant viruses

補助事業分担者 (日本語) 高橋 宜聖
所属 役職 氏名：(英語) Yoshimasa Takahashi

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・信澤枝里 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 2件）

- 1) WADA Y, NITHICHANON A, NOBUSAWA E, MOUISE L, MARTIN WD, TERAHARA T, HAGIWARA H, TAKEYAMA H, DE GROOT AS, ATO M, TAKAHASHI Y. A humanized mouse model identifies key amino acids in H7 hemagglutinin that lower the immunogenicity of H7N9 influenza vaccines. Scientific Rep. in press
- 2) 高橋宜聖 インフルエンザウイルスの免疫回避術と B 細胞免疫の適応戦略 感染炎症免疫 2016, 46, 2-9.
- 3) 高橋宜聖 感染免疫における胚中心依存的な B 細胞記憶応答 臨床免疫・アレルギー科 2016, 66, 283-288.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Different accessibility of strain-specific versus cross-reactive BCRs to virus particles regulates site-specific germinal center selection. 口頭 Yu Adachi, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi 第45回日本免疫学会総会 2016/12/7, 国内.
2. Follicular helper NKT cells induce protective effect of a protein-based pneumococcal vaccine through stimulation of IgG production by B cells. 口頭 Makiko Nakahara, Shogo Takatsuka, Keigo Ueno, Taishi Onodera, Yoshimasa Takahashi, Kazuyoshi Kawakami, Masato Kubo, Yuki Kinjo 第45回日本免疫学会総会 2016/12/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名： (日本語) 迅速な製造が可能な新型インフルエンザワクチンの開発技術に関する研究
(英語) Research on the development in the rapid production technology of pandemic influenza vaccine

研究開発担当者 (日本語) 国立感染症研究所・室長・信澤枝里

所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases・Laboratory chief・
Eri Nobusawa

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 高タンパク(HA)収量種株の効率的回収系の開発

開発課題名： (英語) Development of recovery systems of vaccine seed virus with high-yield of hemagglutinin proteins

研究開発分担者 (日本語) 北里大学 北里生命科学研究所・講師・百瀬文隆

所属 役職 氏名： (英語) Kitasato University, Kitasato Institute for Life Sciences, Lecturer,
Fumitaka Momose, Ph.D.

II. 成果の概要(総括研究報告)

研究開発代表者：国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター第4室・信澤枝里
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0 件、国際誌 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Assessment of the potential interaction between the genome segments of influenza A virus by using reconstituted vRNP complexes, 口頭, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
2. Co-transport mechanisms of influenza virus HA and NA for the apical plasma membrane, 口頭, Takafumi Kamei, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
3. Identification of the apical transport pathways of influenza virus HA and NA by using the

Rab proteins, ポスター, Ryota Sato, Fumitaka Momose, Naoki Takizawa, Yuko Morikawa, 第 64 回 日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.

4. 再構成 vRNP 複合体を用いた A 型インフルエンザウイルスゲノム分節間相互作用の評価, ポスター, 百瀬 文隆, 森川 裕子, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内.
5. 再構成 vRNP 複合体を用いた A 型インフルエンザウイルスゲノム分節間相互作用の評価, 口頭, 百瀬 文隆, 森川 裕子, 6th Negative Strand Virus-Japan, 2017/1/17, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願