

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5699377号

(P5699377)

(45) 発行日 平成27年4月8日(2015.4.8)

(24) 登録日 平成27年2月27日(2015.2.27)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/00 Z N A

C 1 2 N 7/04 (2006.01)

C 1 2 N 7/04

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 39/145 (2006.01)

A 6 1 K 39/145

A 6 1 K 39/285 (2006.01)

A 6 1 K 39/285

請求項の数 9 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-534305 (P2011-534305)

(86) (22) 出願日 平成22年9月30日(2010.9.30)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2010/067082

(87) 国際公開番号 W02011/040526

(87) 国際公開日 平成23年4月7日(2011.4.7)

審査請求日 平成25年9月13日(2013.9.13)

(31) 優先権主張番号 特願2009-227753 (P2009-227753)

(32) 優先日 平成21年9月30日(2009.9.30)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(出願人による申告)平成20年度、農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発」委託事業、産業技術強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 504300088

国立大学法人帯広畜産大学

北海道帯広市稲田町西2線11番地

(73) 特許権者 501203344

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

茨城県つくば市観音台3-1-1

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス

(72) 発明者 小川 晴子

北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品衛生研究センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α-ガラクトースエピトープ発現ウイルス及びワクチンの作製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) α-ガラクトースエピトープ (Gal α 1-3 Gal β 1-4 GlcNAc-R: 以下α-Gal) を発現しない細胞系に、α 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で導入して、α-Gal を発現し得る細胞系を得る工程、

但し、α 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の導入は、α 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で含む発現ベクターを細胞系に導入することで行い、かつ発現ベクターはCAGプロモーターを有するものである、

(2) 前記α-Gal を発現し得る細胞系にウイルスを接種して、ウイルス感染した細胞系を得る工程、および

(3) 前記ウイルス感染した細胞系を培養して、培養液からα-Gal を発現するウイルスを得る工程

を含むα-Gal 発現ウイルスの作製方法。

【請求項2】

前記α-Gal を発現しない細胞系が、鳥類または霊長類に属する生物に由来する細胞系である請求項1に記載のα-Gal 発現ウイルスの作製方法。

【請求項5】

α 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子がマウス、ブタまたはウシ由来である請求項1～2のいずれかに記載のα-Gal 発現ウイルスの作製方法。

【請求項6】

前記ウイルスがインフルエンザウイルス、天然痘ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、エイズウイルス、ニューカッスル病ウイルス、またはマレック病ウイルスである請求項 1～2 及び 5 のいずれかに記載の α -Gal 発現ウイルスの作製方法。

【請求項 7】

請求項 1～2 及び 5～6 のいずれかに記載の方法で、 α -Gal を発現するウイルスを作製し、得られたウイルスからワクチンを作製する、ワクチンの作製方法。

【請求項 8】

ワクチンの作製は、ウイルスを不活性化する工程を含む請求項 7 に記載のワクチンの作製方法。

10

【請求項 9】

ウイルスの作製は、ウイルスをサブユニットとする工程を含む請求項 7 に記載のワクチンの作製方法。

【請求項 10】

ウイルスの作製は、ウイルスを弱毒化ウイルスとする工程を含む請求項 7 に記載のワクチンの作製方法。

【請求項 11】

ワクチンの作製は、ウイルスにアジュバントを含有させる工程をさらに含む請求項 7～10 のいずれかに記載のワクチンの作製方法。

【発明の詳細な説明】

20

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2009 年 9 月 30 日出願の日本特願 2009-227753 号の優先権を主張し、その全記載は、ここに特に開示として援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、遺伝子導入により α -ガラクトースエピトープ (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R : 以下 α -Gal と略記することがある) を発現させた細胞系にウイルスを接種して α -Gal を発現するウイルスを作製する方法、及びこのウイルスを用いてワクチンを作製する方法に関する。

30

【背景技術】

【0003】

高病原性鳥インフルエンザおよび新型インフルエンザの世界的な発生拡大が続く中、今後、家禽のみならず人における流行の危険性も指摘されている。そのため、これまで以上にインフルエンザの予防と制御への取り組みが求められている。インフルエンザ予防には発育鶏卵で作製されるワクチンが有効とされる。現在のヒト用のインフルエンザワクチンには副作用のおそれのある免疫増強剤が含まれていないが、今後、新型インフルエンザが発生した場合は、ワクチンが緊急的に用いられる事が想定されているため、安全にワクチン効果を増強する手法の開発は重要な課題である。さらに、少量でも効果の高いワクチンを提供することで、より多くの人にワクチンを接種できる技術の確保が必要とされる。

40

【0004】

インフルエンザウイルスに対するワクチンを、培養細胞系を用いて作製する方法は、例えば、特許文献 1 に記載されている。この方法では、鳥類胚性幹細胞が用いられているが、安全にワクチン効果を増強する手法についての開示はない。

【0005】

α -ガラクトースエピトープ (α -Gal) は ABO 式血液型抗原に構造が類似した糖抗原であり、 α 1,3-ガラクトース転移酵素 (以下、 α 1,3GT と略記することがある) が作用して細胞表面に発現する。 α -Gal は大部分の哺乳動物に発現するが、人や鳥類では α 1,3GT 遺伝子が機能していないために α -Gal の発現が無い。そのため、人や鳥類では α -Gal を外来抗原として認識し、 α -Gal に対する自然抗体 (抗 α -Gal 抗体) を保有する (非特許文献 1)。 α -Gal

50

と抗 α -Gal抗体の反応は、豚から人等の異種間の臓器移植等における超急性拒絶反応の原因である。本発明者のひとりである小川は、異種移植における α -Galと抗 α -Gal抗体の制御技術に取り組むとともに、この反応を利用したガンワクチンの抗原性増強に関する研究に携わり、その有効性を確認した(非特許文献2)。

【0006】

上記 α -Galを用いた抗原性増強方法をインフルエンザに応用し、 α -Galを発現させたインフルエンザウイルスを作製することが出来れば、人や鳥類ではウイルスに抗 α -Gal抗体が結合し、これが抗原提示細胞のFc γ 受容体に結合する結果、抗原提示が効果的に行われ、ウイルスに対する免疫応答が増強される(オプソニン作用)可能性がある事は、Galiliらが報告している(非特許文献3)。エイズウイルスについての実験についてもGaliliらは報告している(非特許文献4)。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特表2008-537681号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Galili U and Avila JL. α -Gal and Anti-Gal. 1999. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, N.Y.

【非特許文献2】Deriy L, Ogawa H, Gao GP, Galili U. In vivo targeting of vaccinating tumor cells to antigen-presenting cells by a gene therapy method with adenovirus containing the α 1,3galactosyltransferase gene. Cancer Gene Ther. 2005; 12: 528-539.

20

【非特許文献3】Abdel-Motal UM, Guay HM, Wigglesworth K, Welsh RM, Galili U. Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells. J. Virol. 2007; 81: 9131-9141.

【非特許文献4】Abdel-Motal U, Wang S, Lu S, Wigglesworth K, Galili U. Increased immunogenicity of human immunodeficiency virus gp120 engineered to express Gala1-3Galb1-4GlcNAc-R epitopes. J. Virol. 2006; 80: 6943-6951.

【非特許文献5】Eto M, Mase M. Isolation of the Newcastle disease virus and the H9N2 influenza A virus from chicken imported from China. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 2003; 56: 333-339.

30

【非特許文献6】WHO. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. 2002. WHO, Geneva, Switzerland.

【非特許文献7】Killington RA, Stokes A, Hierholzer JC. Virus purification. pp: 71-89. In: Virology Methods Manual. Mahy BWJ, Kangro HO (Ed). 1996. Academic Press Limited, London.

【0009】

非特許文献1～7の全記載は、ここに特に開示として援用される。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

ウイルスに α -Galを発現させる方法としては、in vitroにおける酵素反応が用いられてきている(非特許文献3、4)。しかし、この方法は、反応に用いる酵素を必要とする事、酵素反応時間を必要とする事、酵素反応液の除去を必要とする事などの点から、同方法によってワクチン用の大量の α -Gal発現ウイルスを準備する事は困難であると考えられる。

【0011】

そこで、本発明の目的は、酵素を用いることなく、ウイルスに対する免疫応答が増強された α -Gal発現ウイルスを作製できる方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、この方法で作製した α -Gal発現ウイルスを用いた、効果(抗原性)の高いワクチン、特

50

にインフルエンザウイルスワクチンを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、天然には α -Galを発現しない細胞系に α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で導入し、得られた細胞系にウイルスを感染させることで、 α -Gal(α -ガラクトースエピトープ)を発現するウイルスを作製できること、さらには、この α -Galを発現するウイルスを用いることで、従来の α -Galを発現しないウイルスを用いたワクチンに比べて、ウイルスに対する免疫応答が増強されたワクチンが得られることを見出して、本発明を完成させた。

【0013】

本発明は以下のとおりである。

[1]

(1) α -ガラクトースエピトープ(Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R：以下 α -Gal)を発現しない細胞系に、 α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で導入して、 α -Galを発現し得る細胞系を得る工程、

(2)前記 α -Galを発現し得る細胞系にウイルスを接種して、ウイルス感染した細胞系を得る工程、および

(3)前記ウイルス感染した細胞系を培養して、培養液から α -Galを発現するウイルスを得る工程

を含む α -Gal発現ウイルスの作製方法。

[2]

前記 α -Galを発現しない細胞系が、鳥類または霊長類に属する生物に由来する細胞系である[1]に記載の α -Gal発現ウイルスの作製方法。

[3]

α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の導入は、 α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で含むベクターを導入することで行う、[1]または[2]に記載の α -Gal発現ウイルスの作製方法。

[4]

α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で含むベクターは、発現ベクターに α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を含み、発現ベクターはCAGプロモーターまたはCMVプロモーターを有するものである[3]に記載の α -Gal発現ウイルスの作製方法。

[5]

α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子がマウス、ブタまたはウシ由来である[1]～[4]のいずれかに記載の α -Gal発現ウイルスの作製方法。

[6]

前記ウイルスがインフルエンザウイルス、天然痘ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、エイズウイルス、ニューカッスル病ウイルス、またはマレック病ウイルスである[1]～[5]のいずれかに記載の α -Gal発現ウイルスの作製方法。

[7]

[1]～[6]のいずれかに記載の方法で、 α -Galを発現するウイルスを作製し、得られたウイルスからワクチンを作製する、ワクチンの作製方法。

[8]

ワクチンの作製は、ウイルスを不活性化する工程を含む[7]に記載のワクチンの作製方法。

[9]

ウイルスの作製は、ウイルスをサブユニットとする工程を含む[7]に記載のワクチンの作製方法。

[10]

ウイルスの作製は、ウイルスを弱毒化ウイルスとする工程を含む[7]に記載のワクチンの作製方法。

10

20

30

40

50

[11]

ワクチンの作製は、ウイルスにアジュバントを含有させる工程をさらに含む[7]～[10]のいずれかに記載のワクチンの作製方法。

【0014】

元来は α -Galを発現しない細胞に遺伝子導入によって α -Galを発現させ、その細胞を用いてウイルスを増殖させる事によって α -Galを発現するウイルスを得る手段については、これまで知られていなかった。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、ウイルスを増殖させる細胞を、 α -Galを発現しない細胞から α -Galを発現する細胞に変えるだけで、特別な酵素も反応時間も必要とせずに、大量の α -Gal発現ウイルス生産が可能である。

【0016】

α -Gal発現細胞で増殖したウイルスに α -Galが発現し得る事は既知である(非特許文献1)。しかし、本発明では、インフルエンザウイルス等の多くのワクチンウイルスを増殖させるために用いられている鳥類または霊長類に由来する α -Gal非発現細胞に α -Galを発現させ、この細胞を用いて、 α -Galを発現するワクチンウイルスを得ることができる点が優れた点である。

【0017】

本発明によれば、 α -Galに対する自然抗体を保有する人や鳥類においては外来抗原として認識される α -Galを発現するウイルスを提供することができる。

【0018】

加えて本発明によれば、 α -Galを発現するウイルスを用いることで、従来の α -Galを発現しないウイルスを用いたワクチンに比べて、 α -Galに対する自然抗体を保有する人と鳥類においては、ウイルスに対する免疫応答が増強されたワクチンを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明のウイルスの作製方法およびこのウイルスから作製したワクチンの利用についての概略説明図である。 α -Galを発現させた細胞系を用いてインフルエンザワクチンを作製し、それを利用する様子の説明図である。

【図2】ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルスを、 α -ガラクトース転移酵素を保有し、 α -Galを発現させた細胞系に接種すると、細胞内においてインフルエンザウイルスの複製と α -Galの付加が行われ、 α -Gal発現ウイルスを増殖させる事ができることの概略説明図である。

【図3】実施例1における、 α -gal発現細胞である鶏胚線維芽細胞系(CEF-DF1)でのフローサイトメトリーによる α -Gal発現の解析結果を示す。(A)元の細胞ではGS-IB₄が結合する細胞は認められない(破線円)。(B)a1,3GT遺伝子導入細胞では全ての細胞にGS-IB₄が結合し(実線円)、 α -Galを発現する事が確認された。

【図4】実施例1における、鶏胚線維芽細胞系(CEF-DF1)でのシアル酸発現量のフローサイトメトリーによる解析(MALIIの結合)結果を示す。(A)元の細胞と(B)a1,3GT遺伝子導入細胞において、MALIIの結合(a2,3シアル酸発現)に差は認められなかった。

【図5】実施例1において得られた α -Gal発現細胞である鶏胚線維芽細胞系(CEF-DF1)でのインフルエンザウイルスの増殖性に関する結果を示す。元の細胞(CEF)で増殖させたウイルスの力価に比較して、 α -Galを発現させた細胞(CEF-gal)で増殖させたウイルスの力価は1-log低い、高いウイルス力価を維持した。

【図6】実施例2において目的とおり、 α -Galを発現させた鶏胚線維芽細胞からH9N2(H9N2-gal)ウイルスが得られた事をELISAで解析して(ELISAにおけるGS-IB₄の結合を)確認した結果を示す。GS-IB₄の結合は、 α -Galを発現しない元の細胞で増殖したH9N2ウイルス(H9N2)には全く認められないが、 α -Galを発現させた細胞で増殖したH9N2-galウイルス(H9N2-

10

20

30

40

50

gal)には明らかに認められ、高い α -Gal発現が確認された。

【図7】実施例3における、 α -Galを発現させたインフルエンザワクチンの投与による α 1,3GT-KOマウス(雄)における抗インフルエンザ抗体産生の確認(HI試験)結果を示す。H9N2ワクチン投与マウスでは抗体産生が確認されなかったが、H9N2-galワクチン投与マウスではいずれも抗体産生が確認されたことを示す。

【図8】GS-IB₄を用いたフローサイトメトリーによる、実施例5で得られた細胞CEF-galとCEF-gal2における α -Gal発現の解析結果(GS-IB₄染色)を示す。 α -Galの発現程度はCEF-galよりもCEF-gal2が若干低い事が明らかとなった。MFI: mean fluorescence intensity (蛍光強度の中間値)

【図9】実施例5においてCEF-gal2から得られたH9N2ウイルスにおける α -Gal発現をGS-IB₄を用いたWestern blotting(右図)及びELISA(左図)により確認した結果を示す。ELISA(左図)において、CEF-galで増殖したウイルスH9N2-galとCEF-gal2で増殖したウイルスH9N2-gal2に同程度の α -Galが発現している事が確認された。Western blotting(右図)によっても、H9N2-gal(レーン2)とH9N2-gal2(レーン4)には同程度の α -Galが発現している事が確認された。一方、いずれにおいても、元細胞CEFで増殖したH9N2ウイルスには α -Galの発現が認められなかった(左図:H9N2, 右図:レーン1)。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明は、主に、 α -Gal発現ウイルスの作製方法とこのウイルスを用いたワクチンの作製方法に関する。図1に、インフルエンザウイルスを例に概略説明図を示す。 α -Gal発現ウイルスの作製方法では、 α -Galを発現しない細胞に、 α -Galの合成酵素である α 1,3-ガラクトース転移酵素(α 1,3GT)の遺伝子を導入する事によって α -Galを発現する細胞に変化させる。次いで、得られた細胞に、 α -Galを発現しないインフルエンザウイルスを接種して増殖させ、 α -Galを発現するインフルエンザウイルスを得る。ワクチンの作製方法では、このウイルスをワクチン化する。得られたワクチンは、抗 α -Gal抗体を保有する人や鶏のインフルエンザ予防に用いる。

【0021】

[α -Gal発現ウイルスの作製方法]

本発明の α -Gal発現ウイルスの作製方法は、以下の(1)～(3)の工程を含む。

- (1) α -Galを発現しない細胞系に、 α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で導入して、 α -Galを発現し得る細胞系を得る工程、
- (2)前記 α -Galを発現し得る細胞系にウイルスを接種して、ウイルス感染した細胞系を得る工程、および
- (3)前記ウイルス感染した細胞系を培養して、培養液から α -Galを発現するウイルスを得る工程

【0022】

α -ガラクトースエピトープ(α -Gal)は、Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-Rで示される糖鎖であり、N-アセチルラクトサミンを発現する糖タンパク(Gal β 1-4GlcNAc-R、Rはタンパクを表す)に α 1,3-ガラクトース転移酵素を作用させて、基質としてのガラクトースをN-アセチルラクトサミンのガラクトース基に α 1-3結合させることで、生成される糖鎖である。

【0023】

工程(1)

工程(1)は、 α -Galを発現し得る細胞系を得る工程である。工程(1)で用いる細胞系は、 α -Galを発現しない細胞系である。 α -Galを発現しない細胞系は、例えば、鳥類、並びに人、類人猿、及び旧世界サル類等の霊長類等に由来する細胞系を挙げることができる。但し、これらの種以外の種に由来する細胞系も、 α -Galを発現しない細胞系を有するものであれば、特に制限なく、本発明では使用できる。

【0024】

細胞系の由来となる鳥類とは、分類学的分類「Aves」の生物のいずれもの種、亜種または品種を指すことを意図する(限定されるものではないが、ニワトリ、シチメンチョウ、

10

20

30

40

50

アヒル、ガチョウ、ウズラ、キジ、オウム、フィンチ、タカ、カラス、ダチョウ、エミュー、およびヒクイドリのような生物など)。前記用語は、セキショクヤケイ(*Gallus gallus*)またはニワトリ(例えば、ホワイトレグホン(White Leghorn)、ブラウンレグホン(Brown Leghorn)、パールロック(Barred-Rock)、サセックス(Sussex)、ニューハンプシャー(New Hampshire)、ロードアイランド(Rhode Island)、オーストラロップ(Australorp)、ミノルカ(Minorca)、アムロックス(Amrox)、カリフォルニアグレイ(California Gray)、イタリアンパーティッジカラード(Italian Partidge-colored))の様々な系統、ならびに一般に繁殖されるシチメンチョウ、キジ、ウズラ、アヒル、ダチョウ、および他の家禽の系統を包含する。本発明の作製方法で使用される鳥類に由来する細胞は、好ましくはニワトリ細胞である。

10

【0025】

細胞系の由来となる人及び類人猿とは、霊長類の真猿亜目、狭鼻下目、ヒト上科に属する動物であり、人以外では例えば、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、テナガザルなどを挙げることができる。但し、これらに制限される意図ではない。

【0026】

細胞系の由来となる旧世界サル類とは、霊長類の真猿亜目、狭鼻下目、オナガザル上科に属する動物であり、例えば、ニホンザル、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒなどを挙げることができる。但し、これらに制限される意図ではない。

【0027】

細胞系の種類は、特に制限はないが、ウイルス増殖に用いられるという観点からは、例えば、線維芽細胞系、上皮細胞系、胚性幹細胞系等を挙げることができる。

20

【0028】

鳥類由来細胞系の具体例としては、鶏胚由来線維芽細胞系、鶏胚由来幹細胞系、旧世界サル類由来細胞系の具体例としては、アフリカミドリザル由来腎臓上皮細胞系、霊長類由来細胞系の具体例としては、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞系等を挙げることができる。但し、これらに制限される意図ではない。

【0029】

α -Galを発現しない細胞系への α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の導入は、外来遺伝子を、発現ベクターへ組み込んだ後、宿主細胞系に導入する公知のいずれの方法を用いても実施することができる。宿主細胞系への遺伝子導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、遺伝子銃による方法等の物理化学的方法と、ウイルスベクター等を用いた生物学的方法を挙げることができる。

30

【0030】

発現ベクターを用いた導入法において用いられる発現ベクターは、例えば、1) 挿入配列を導入するためのマルチクローニングサイト(MCS)、2) 挿入配列を発現するためのプロモーター及びポリA付加配列、3) 遺伝子が導入された細胞を選択するための薬剤耐性マーカー遺伝子とこれを発現するためのプロモーター及びポリA付加配列、4) 原核細胞内で複製されるためのori配列、5) 原核細胞での薬剤選択用の抗生物質耐性遺伝子、等から構成されるものである。そのような発現ベクターとしては種々のものが知られており、適宜選択して使用できる。遺伝子導入に用いる発現ベクターとしては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子を有するpcDNA3.1、pcDNA3.1と同一のMCSを有したベクターでありながら、ハイグロマイシン耐性遺伝子を有するpcDNA3.1/Hygroやゼオシン耐性遺伝子を有するpcDNA3.1/Zeoがある。pcDNAシリーズの他、pEFシリーズ、pTriExシリーズ、pLPシリーズなど、多くのベクターがあり、これらの発現ベクターは市販品として入手可能である。

40

【0031】

さらに遺伝子導入に用いる発現ベクターとしては、挿入配列を発現するためのプロモーターとしてCAGプロモーターを有するものを用いることが好ましい。CAGプロモーターは、プロモーターおよびポリA配列が、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリ β -アクチンプロモーター、ウサギ β グロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーターである(特開平3-168087号公報、特開2006-121号

50

公報参照)。CAGプロモーターは高発現プロモーターとして知られるプロモーターの1種であり、CAGプロモーターの代りに、CMVプロモーターやEF1 α プロモーター等の高発現プロモーターも使用できる。上記高発現プロモーター、特に、CAGプロモーターを有する発現ベクターを用いることで、 α -Galの発現程度を若干抑えた細胞系を得ることができる。 α -Galの発現程度を若干抑えた細胞系では、元の細胞と同程度にインフルエンザウイルスが増殖し、さらに、この細胞で増殖したウイルスには、 α -Gal高発現細胞で増殖したウイルスと同程度に α -Gal量を付加することができる。

【0032】

実施例1に示すように、 α -Gal発現鶏胚線維芽細胞 (CEF-gal) では、元の細胞 (CEF) に比べてインフルエンザウイルスの増殖性が若干劣るため、得られたウイルスの力価が約1-log低かった (図5)。この現象には、 α -Galの高発現によってインフルエンザウイルスの受容体であるシアル酸の発現がやや低下する事が関与するものと推測された。それに対して、実施例5では、GT遺伝子を発現させるプロモーターをCAGプロモーターに変換し、 α -Galの発現程度を若干抑えた細胞系を得た。その結果、得られたウイルスの力価は、元の細胞 (CEF) で得られたウイルスの力価と同等であった (表1)。

【0033】

α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子は、マウス由来、ブタ由来、ウシ由来のもの等が知られており、GenBankから遺伝子配列情報を入手することができる [マウス: GenBank accession number M85153; J. Biol. Chem. 267, 5534-5541, 1992 (配列番号1), ブタ: GenBank accession number L36535; Xenotransplantation 1, 81-88, 1994 (配列番号2), ウシ: GenBank accession number J04989; J. Biol. Chem. 264, 14290-14297, 1989 (配列番号3)]。

【0034】

上記発現ベクターのMCSに、常法により、外来遺伝子として α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を組み込んだベクターを構築することができる。構築されたベクターを、常法により、 α -Galを発現しない細胞系に導入し、抗生物質により選択を経て、 α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子が発現し得る状態で導入された細胞において、 α -Galを発現し得る細胞系を得ることができる。

【0035】

工程(2)

工程(2)は、 α -Galを発現し得る細胞系にウイルスを接種して、ウイルス感染した細胞系を得る工程である。

【0036】

接種に用いるウイルスは、ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルスであれば、特に制限はない。機構の説明は図2を用いて後述するが、ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルスを、 α 1,3-ガラクトース転移酵素を保有する細胞系に接種すると、 α -Gal発現ウイルスを増殖させる事ができる。

【0037】

ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルスとしては、例えば、インフルエンザウイルス、天然痘ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、マレック病ウイルス 等であることができる。尚、エイズウイルス (レトロウイルス) については、エンベロープ上に糖タンパクがあり、手法は本発明と異なるが、 α -Galを発現する方法をGaliliが報告している (非特許文献4)。さらに、インフルエンザウイルスとしては、例えば、ヒトインフルエンザウイルスのAソ連型 (H1N1亜型) ウイルスやA香港型 (H3N2亜型) ウイルス、高病原性トリインフルエンザウイルスのH5N1亜型ウイルス、低病原性トリインフルエンザウイルスのH9N2亜型ウイルス等を挙げることができる。尚、H1N1亜型インフルエンザウイルスについては、手法は本発明と異なるが、 α -Galを発現する方法をGaliliが報告している (非特許文献3)。

【0038】

細胞系へのウイルス接種は常法に従うが、例えば鶏胚由来線維芽細胞系へのインフルエ

10

20

30

40

50

ンザウイルスの接種は、WHOの方法(非特許文献6参照)に準じて行うことができる。具体的には、細胞増殖培地を用いて単層に増殖させた細胞の培養液を除いた後、 α -Galを発現していない元のウイルス液を接種して30分間程吸着させ、その後にウイルス増殖培地を添加して細胞の培養を続けることで、細胞系へのウイルス接種を行うことができる。

【0039】

工程(3)

工程(3)は、工程(2)で得られたウイルス感染した細胞系を培養して、培養液から α -Galを発現するウイルスを得る工程である。 α -Galを発現するウイルスとは、ウイルスの表面に α -Galを有するものであり、ウイルスの表面に存在する α -Galは、 α -Galに対する自然抗体を保有する人や鳥類では外来抗原として認識される。

10

【0040】

ウイルスに感染した細胞系を用いての α -Gal発現ウイルスの作製は、例えば、以下のようを実施することができる。 α -Gal発現細胞に接種したウイルスは、細胞内で複製される過程で α -Galを発現するウイルスとなって細胞外へ放出されるため、 α -Gal発現ウイルスは細胞培養液中に含まれる。細胞へウイルスを接種した数日後には顕微鏡下でウイルスによる細胞変性効果(CPE)が観察されるが、十分なCPEが認められる段階まで細胞を培養し、その後、 α -Gal発現ウイルスが豊富に含まれる細胞培養上清を回収する。

【0041】

上記 α -Galを発現し得る細胞系にウイルスを感染させることによって、ウイルスの表面に α -Galを有する α -Gal発現ウイルスを作製できることを、図2を用いて具体的に説明する。一般に、ウイルス(図中の左上)が接種された細胞内では、ウイルス粒子の構成タンパクが合成されるが、それが「糖タンパク」である場合には、細胞が保有する糖転移酵素によって合成された「糖」がタンパクに付加される。そのため、 α -ガラクトース転移酵素が機能する細胞内で合成された糖タンパクには α -Galが付加され得る事になる。従って、本発明のように、ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルス(インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、エイズウイルス等)を α -Gal発現細胞(α -ガラクトース転移酵素を保有)に接種すると、 α -Gal発現ウイルスを増殖させる事ができる。

20

【0042】

本発明の作製方法で得た α -Gal発現ウイルスは、 α -Galを発現しない同タイプのウイルスと比較して、 α -Galに対する自然抗体を保有する人や鳥類においては、ウイルスに対する免疫応答が増強され得る。所謂、オプソニン作用を示す。これは、 α -Gal発現ウイルスの場合、人や鳥類ではウイルスに抗 α -Gal抗体が結合し、これが抗原提示細胞のFc γ 受容体に結合する結果、抗原提示が効果的に行われるためと考えられる。

30

【0043】

[ワクチンの作製方法]

本発明は、上記本発明の作製方法で得た α -Gal発現ウイルスを用いて、ワクチンを作製する方法を包含する。

【0044】

上述のように、 α -Gal発現ウイルスは、 α -Gal発現ウイルスが豊富に含まれる細胞培養上清として回収される。この細胞培養上清は、そのままワクチンの作製に用いることもできるが、常法により精製することもできる。精製方法としては、例えば、非特許文献7に記載の方法に従いスクロース液を用いた超遠心により行う方法を挙げることができる。

40

【0045】

本発明の作製方法で得られるウイルスは、例えば、不活性化されたウイルスであることができる。また、ワクチンに含有されるウイルスは、ウイルスのサブユニットであることもできる。さらに、ワクチンに含有されるウイルスは、弱毒化ウイルスであることもできる。

【0046】

ウイルスの不活性化は、ウイルスの不活性化処理方法として公知の方法を用いて適宜行うことができる。不活性化処理としては、例えば、精製ウイルスをホルマリン、紫外線ま

50

たは β -プロピオラクトンにより不活化する方法を挙げることができる。

【0047】

ウイルスのサブユニット(成分)は、公知の方法を用いて適宜作製することができる。例えば、ウイルス液と1% Tween 20を9:1の割合で混和して30分間放置した後、等量のエーテルを加えて激しく混和し、それを遠心して得られた水相画分を上述と同様の方法で不活化することで、サブユニットワクチンを得ることができる。

【0048】

弱毒化ウイルスは、遺伝子変異などの公知の方法によって病原性を低減させることで得ることができる。但し、インフルエンザウイルスのような変異を起こしやすいウイルスについては、弱毒化ワクチンの使用は懸念が多いため、一般には、弱毒化ウイルスではなく、不活性化ウイルスを用いたワクチンやサブユニットワクチンが用いられる。

10

【0049】

本発明の作製方法で得られるワクチンは、上記ウイルスを単独で含む場合と、アジュバントをさらに含有する場合がある。アジュバントとしては、例えば、ゴマ油、菜種油等の植物油、軽質流動パラフィン等の鉱物オイル、水酸化アルミニウムゲル、リン酸アルミニウムゲル等を挙げることができる。

【0050】

本発明の作製方法で得られるワクチンの投与経路としては、点眼、点鼻、筋肉内、又は皮下が挙げられる。また、不活化ワクチンとして投与する場合には筋肉内、腹腔内又は皮下への投与が好ましい。

20

【0051】

本発明の作製方法で得られるワクチンは、前記ウイルスに感染するヒトや鳥類の予防および／または治療のための処置に用いられる。

【実施例】

【0052】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0053】

試験方法

以下の実施例で用いた試験方法について記載する。

(1a) Griffonia Simplicifolia lectin I-Isolectin B₄(GS-IB₄)を用いたフローサイトメトリー

30

細胞上に発現する α -Galをfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識GS-IB₄ (Vector Laboratories Inc.) を用いて4℃で30分間染色した後に洗浄し、FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) にて解析した。

【0054】

(1b) Maackia Amurensis lectin II (MALII) 及び Sambucus Nigra lectin (SNA) を用いたフローサイトメトリー

細胞に発現する α 2,3シアル酸または α 2,6シアル酸を、それぞれbiotin標識MAL II (Vector) もしくはbiotin標識SNA (Vector) と4℃で30分間反応させた後に洗浄し、Phycoerythrin (PE) 標識streptavidin (Vector) を用いて染色した。染色後の細胞をFACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) にて解析した。

40

【0055】

(2) ELISA法

ウイルスに発現する α -Galを調べるためのELISA法は以下のように行った。精製したウイルスと2% Triton X-100及び1 M KClを含む溶液を9:1の割合で混合した後に4℃に30分間静置した。その溶液をcarbonate buffer (pH 9.6) で希釈して5 mg/mlのウイルス液を作製し、96穴ELISAプレートに50 ml/wellずつコーティングした。その後、1% 牛血清アルブミンを含むPBS (BSA/PBS) によりブロッキングし、HRP標識GS-IB₄ (Sigma-Aldrich) と室温で1時間反応させ、Tetramethyl benzidine (TMB: BD Bioscience) で発色させて吸光度 (O.D. 450 nm) を測定した。

50

【0056】

(3) Western blotting法

ウイルスに発現する α -Galを調べるためのWestern blottingは以下のように行った。ウイルスのタンパクを2-mercaptoethanolの存在下でSodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離した後、polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad) に転写し、1% Alkali-soluble Casein (Novagen) を用いてブロッキングを行った。その後、HRP標識GS-IB₄ (Sigma-Aldrich)と室温で1時間反応させ、反応後のPVDF membraneをECL Western blotting analysis system (Amersham Biosciences)によって発光させ、LAS-3000 (FujiFilm)を用いて解析した。

【0057】

(4) HI試験法

マウス血漿中の抗H9N2抗体価についてHI試験により評価した。具体的には、以下のとおりである。

マウス血漿をRDE (デンカ生研) で処理して非特異的な血球凝集抑制物質を除去した後、鶏赤血球 1容量に対して血漿5容量の体積比で混和して血漿中の自然凝集素を除いた。これを遠心して得られた上清を処理済みの血漿サンプルとしてHI試験に使用した。試験では、血漿サンプルをV字底96穴マイクロプレートにおいて2倍階段希釈した後、4単位の赤血球凝集素 (HA) を含むウイルス液を各ウェルに血漿サンプルと等量(25 ml)加え、室温で1時間反応させた。その後に0.5%鶏赤血球液(50 ml)を添加して赤血球凝集性を観察した。

【0058】

実施例1

遺伝子導入により α -Galを発現させた細胞系

マウスの α 1,3-ガラクトース転移酵素(α 1,3GT)遺伝子を組み込んだpcDNA3.1(+)(Invitrogen)を用いて、FuGENE HD(Roche)により鶏胚線維芽細胞系CEF-DF1(ATCC CRL-12203:以下CEF)へ α 1,3GT遺伝子を導入した。CEFの培養には牛胎子血清、L-グルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地を使用した。遺伝子導入の翌日に細胞を継代し、更にその翌日から100 μ g/mlのG418を用いてセクションを行い、その2週間後にクローニングを行った。セクション以降の細胞培養は、培地にG418を加えて行った。

【0059】

得られた各細胞クローンにおける α -Galの発現については、Griffonia Simplicifolia lectin I-Isolectin B₄(GS-IB₄, Vector Laboratories Inc.)の結合をフローサイトメトリー、ELISA、またはWestern blottingにより解析して評価した。フローサイトメトリーの結果を図3に示す。

【0060】

また、シアル酸の発現については、Maackia Amurensis lectin II (MALII, Vector)及びSambucus Nigra lectin(SNA, Vector)の結合をフローサイトメトリーにより解析して評価した。

【0061】

シアル酸の発現量についてはフローサイトメトリーによる解析で変化は認められなかった。結果を図4に示す。

【0062】

α -Galとシアル酸はいずれも糖鎖の末端構造であり基質を同じくするため、 α -Gal発現によってシアル酸発現が低下する可能性がある事は予測された。細胞に発現するシアル酸はインフルエンザウイルスが感染する際の受容体であるため、インフルエンザウイルスを増殖させようとする細胞におけるシアル酸発現は必要であり、即ち、 α -Gal発現によってシアル酸発現が大きく低下する事は望ましくない。本発明においては、 α -Galを発現させた事によるシアル酸発現の低下はフローサイトメトリーによる解析においては観察されなかった。しかしながら、 α -Gal発現鶏胚線維芽細胞 (CEF-gal) では、元の細胞(CEF)に比

10

20

30

40

50

べてインフルエンザウイルスの増殖性が若干劣っていたことから、 α -Galの高発現によってシアル酸の発現が若干なりとも低下している可能性が考えられた。この事より、インフルエンザウイルスの十分な増殖が得られる細胞系の確立が課題となった。得られている α -Gal発現細胞では、元の細胞よりは若干劣るものの、インフルエンザウイルスの十分な増殖が得られている。結果を図5に示す。

【0063】

α -Galを発現しかつ増殖の良い細胞クローンを、 α -Gal発現CEF細胞系(CEF-gal)とした。

【0064】

実施例2

10

α -Galを発現させた細胞系で増殖した α -Galを発現するウイルス

実施例1で作製したCEF-galに、H9N2亜型鳥インフルエンザウイルス (A/chicken/Yokohama/aq55/01:H9N2ウイルス)(非特許文献5参照)を感染させ、その数日後、細胞変性効果がみられた細胞の培養上清を回収してウイルス液とした。WHOの方法(非特許文献6)に従い、ウイルスを接種する細胞の培養液はウイルス増殖培地に交換した。

【0065】

目的とおりの α -Galを発現するH9N2ウイルスが得られた事は、GS-IB₄の結合をフローサイトメトリー、ELISA、またはWestern blottingにより解析して確認した。 α -Galを発現させた鶏胚線維芽細胞から得られたインフルエンザウイルスにおける α -Gal発現の確認(ELISAにおけるGS-IB₄の結合)の結果を図6に示す。GS-IB₄の結合は、 α -Galを発現しない元の細胞で増殖したH9N2ウイルスには全く認められないが、 α -Galを発現させた細胞で増殖したH9N2-galウイルスには明らかに認められ、高い α -Gal発現が確認された。

20

【0066】

尚、実施例2では、H9N2ウイルスの例を示したが、これ以外のインフルエンザウイルスについても同様の方法により、 α -Galを発現するウイルスを得ることができる。

【0067】

実施例3

α -Gal発現ウイルスワクチンの作製

上記実施例2で作製したウイルス液を、常法(非特許文献7)に従いスクロース液を用いた超遠心により精製した。得られた精製ウイルスをホルマリン、紫外線または β -プロピオラクトンにより不活化し、不活化ワクチンを作製した。

30

【0068】

また、サブユニットワクチンとしては、ウイルス液と1% Tween 20を9:1の割合で混和して30分間放置した後、等量のエーテルを加えて激しく混和し、それを遠心して得られた水相画分を上述と同様の方法で不活化して用いた。これらのワクチンを単独、あるいはアジュバンド(Ribi adjuvant system, Corixa: Abisco, Isconova)と混合してワクチンとして用いた。

【0069】

実施例4

α -Gal発現ウイルスワクチンの評価

40

実験には、人や鳥類と同じく α -Galを発現せず抗 α -Gal抗体を保有する α 1,3GT遺伝子ノックアウトマウス(α 1,3GT-K0マウス)を用いた。 α -Galを発現しないH9N2ワクチンまたは α -Galを発現するH9N2-galワクチン各1.0 μ gをRibi adjuvant systemと混和してマウスに皮下投与した。ワクチンは、ホルマリン不活化サブユニットワクチンを用いた。ワクチン投与は2週間隔で2回行い、その後、マウス血漿中の抗H9N2抗体価についてHI試験により評価した。その結果、H9N2ワクチン投与マウスでは抗体産生が確認されなかったが、H9N2-galワクチン投与マウスではいずれも抗体産生が確認された。結果を図7に示す。

【0070】

実施例5

マウスの α 1,3GT遺伝子を組み込んだ発現ベクターpCAGGSを、pcDNA3.1(+)とともにFuGE

50

NE HDによりCEF-DF1へトランスフェクションし、実施例1と同様の方法により、 $\alpha 1,3GT$ 遺伝子が染色体に組み込まれた細胞クローン(CEF-gal2)を選択した。得られた細胞における α -Gal発現の程度は、GS-IB₄を用いたフローサイトメトリー解析で確認した。結果を図8に示す。また、CEF-gal2にH9N2ウイルスを感染させる事によって得られたウイルス液の力価を測定し、同細胞におけるウイルスの増殖性を評価した。結果を表1に示す。更に、CEF-gal2から得られたH9N2ウイルスにおける α -Gal発現をGS-IB₄を用いたELISA及びWestern blottingにより確認した。結果を図9に示す。

【0071】

【表1】

細胞	TCID ₅₀ /ml
(実験1)	
CEF	3.5
CEF-gal	2.5
(実験2)	
CEF	4.25
CEF-gal2	4.25

【0072】

図8にフローサイトメトリーによるCEF-galとCEF-gal2における α -Gal発現の解析(GS-IB₄染色)結果を示す。細胞表面に発現する α -Galの発現程度はCEF-galよりもCEF-gal2が若干低い事が明らかとなった。MFI: mean fluorescence intensity (蛍光強度の中間値)(図8)。

【0073】

図9に、各種細胞で増殖させたH9N2ウイルスにおける α -Gal発現についてのELISA及びWestern blottingによる解析(GS-IB₄の結合)結果を示す。ELISA(左図)において、CEF-galで増殖したウイルスH9N2-galとCEF-gal2で増殖したウイルスH9N2-gal2に同程度の α -Galが発現している事が確認された。また、Western blotting(右図)によっても、H9N2-gal(レーン2)とH9N2-gal2(レーン4)には同程度の α -Galが発現している事が確認された。一方、いずれにおいても、元細胞CEFで増殖したH9N2ウイルスには α -Galの発現が認められなかった(左図:H9N2, 右図:レーン1)。

【0074】

更に、表1に、CEF-gal2で増殖させたウイルスの力価を示す。CEF-gal2で増殖させたウイルスの力価は、CEF(元細胞)で増殖させたウイルスの力価と同等であり(実験2)、同程度にウイルスが増殖した事が確認できた。一方、CEF-galで増殖させたウイルスの力価は1?log劣っていた(実験1)。CEF-gal2では、元細胞であるCEFと同程度にH9N2ウイルスが増殖する事も確認できた(表1)。尚、TCID₅₀は50%培養細胞感染量(ウイルス力価)を示す。

【0075】

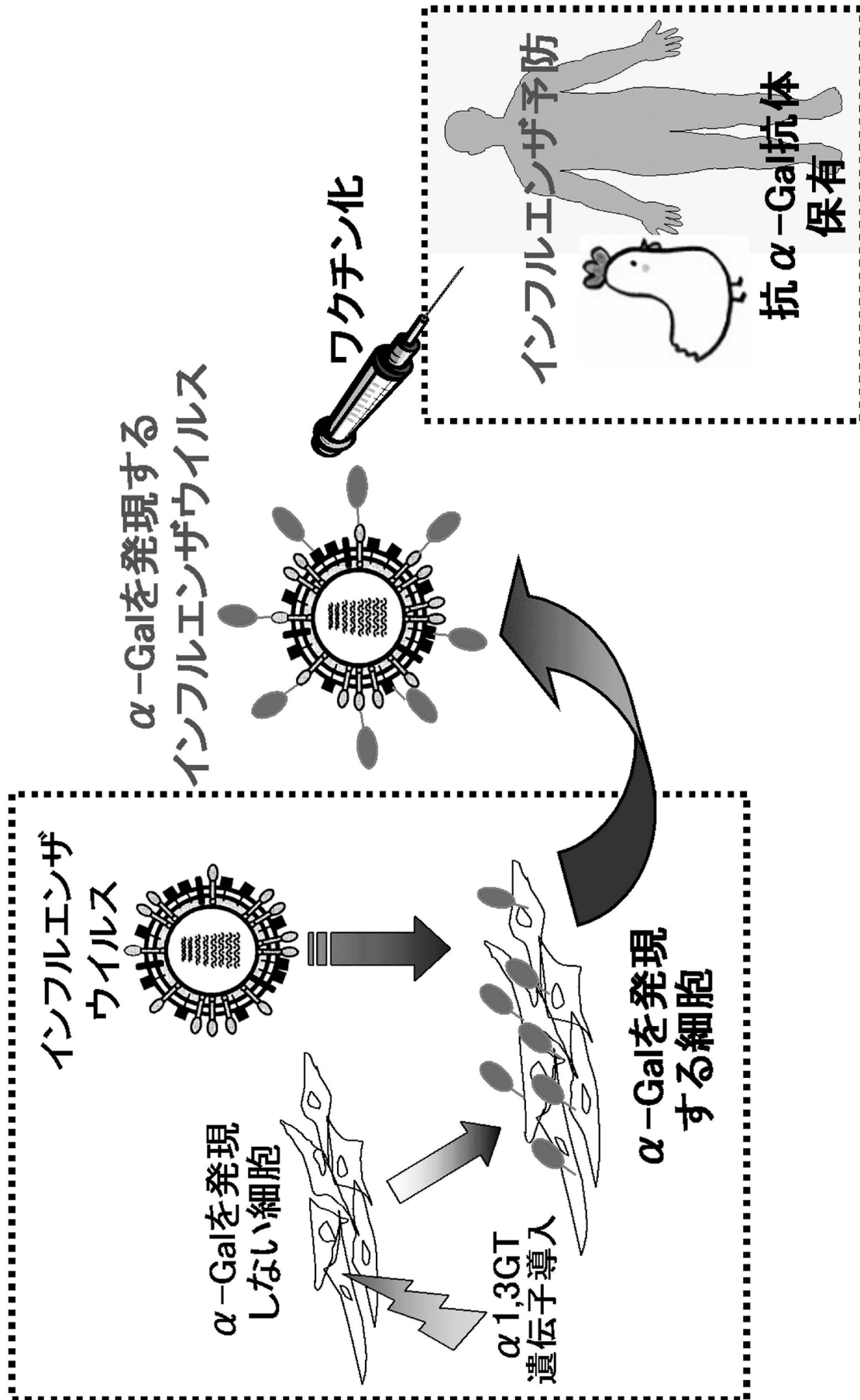
以上より、 α -Galを発現させたCEF-gal2を用いることにより、目的通りに α -Galを高度に発現させたインフルエンザウイルスを元細胞と同等量得られる事が確認できた。この結果は、 α -Gal発現細胞を用いてインフルエンザワクチンを大量生産できる可能性を示すものである。

【産業上の利用可能性】

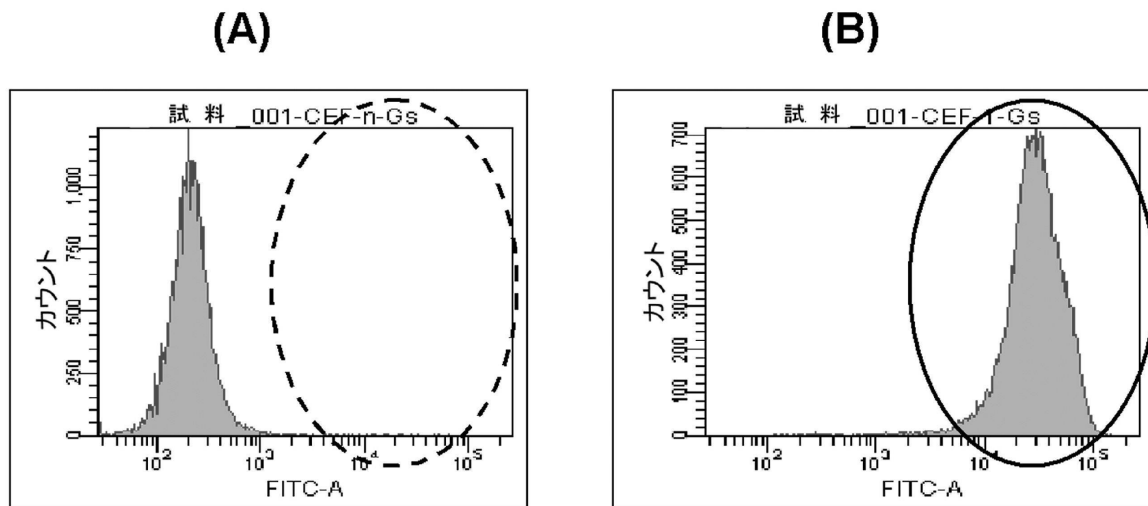
【0076】

本発明は、インフルエンザウイルス等のワクチン製造分野に有用である。

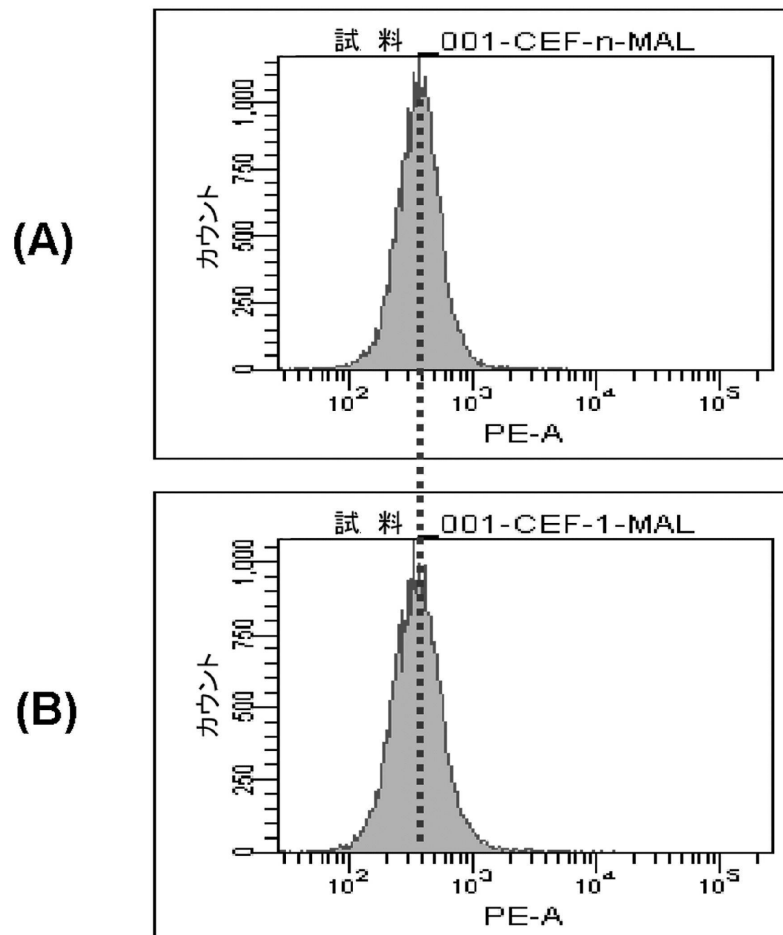
【図 1】



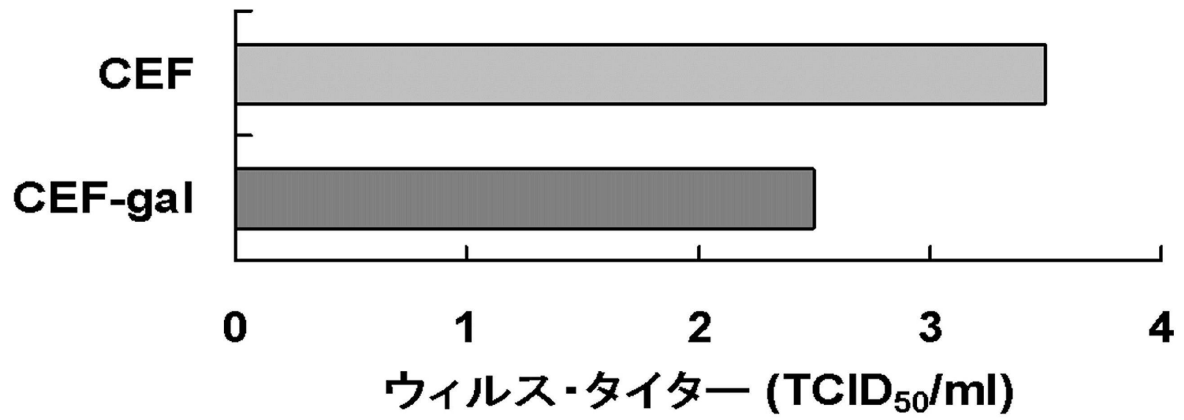
【図 3】



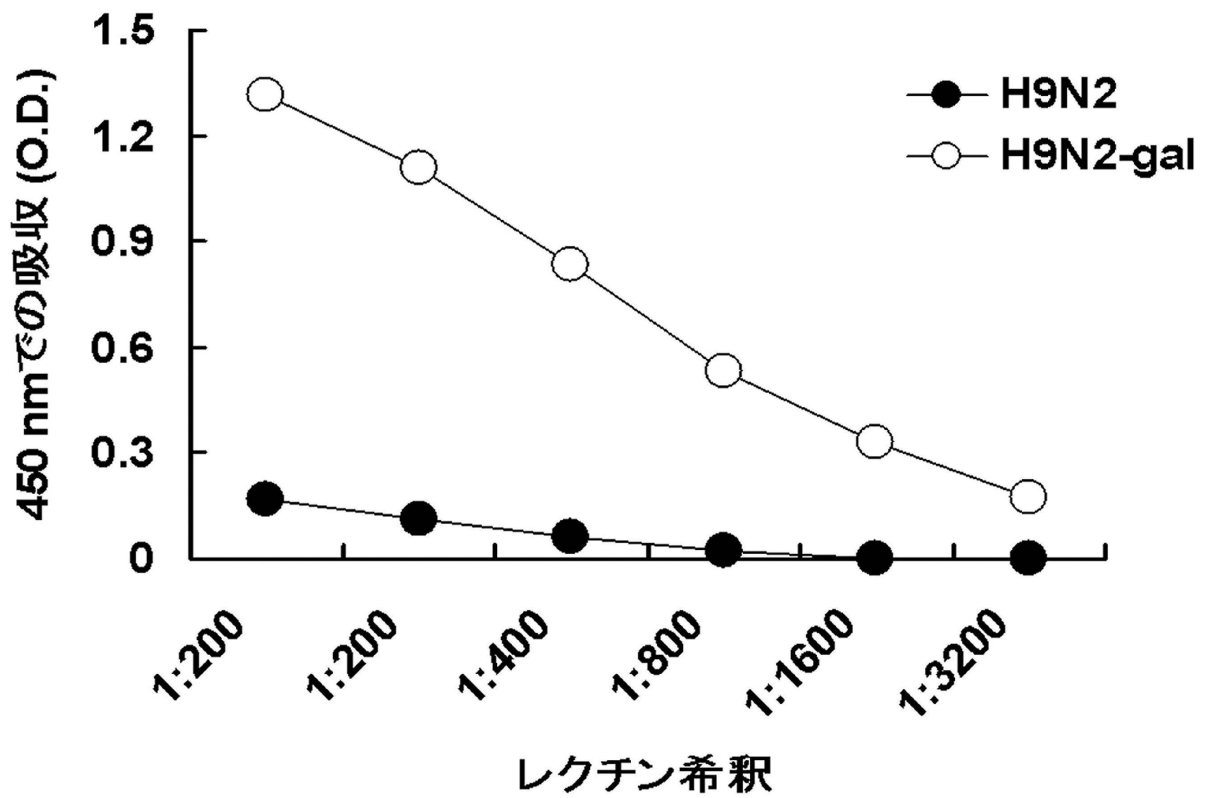
【図 4】



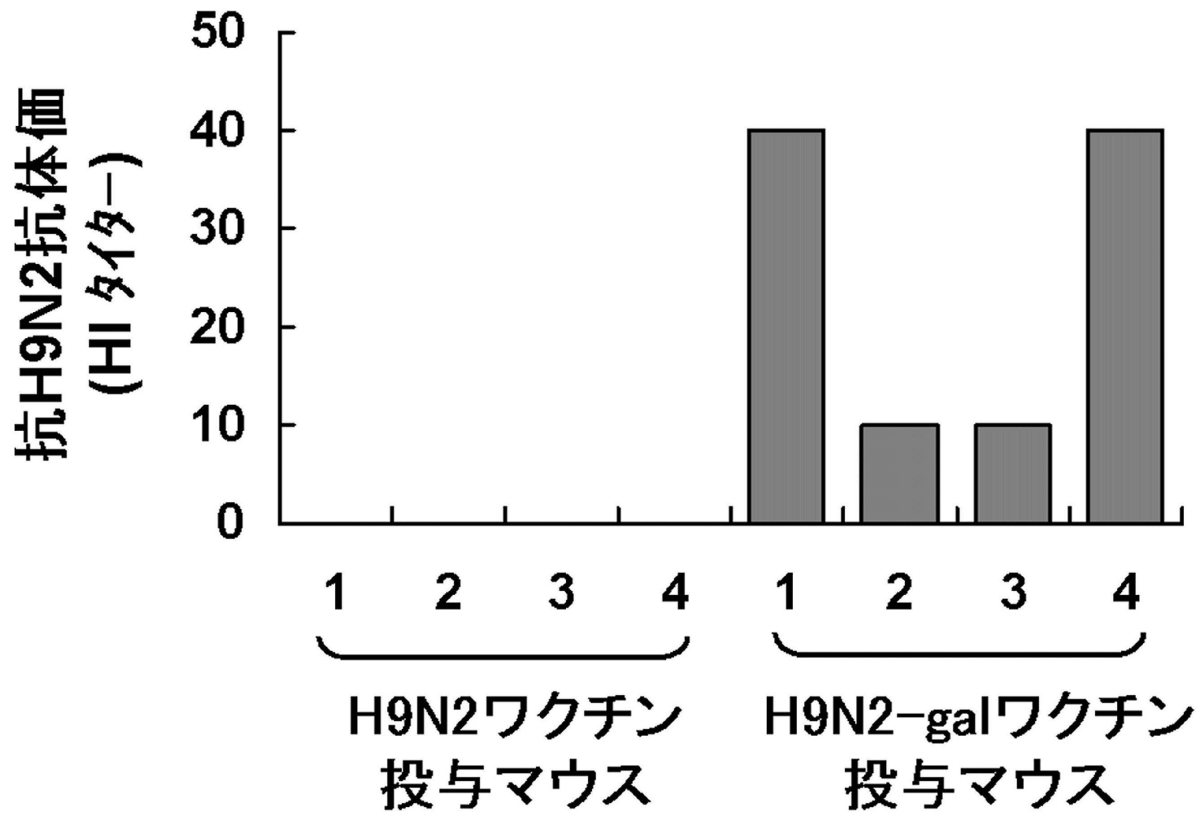
【図 5】



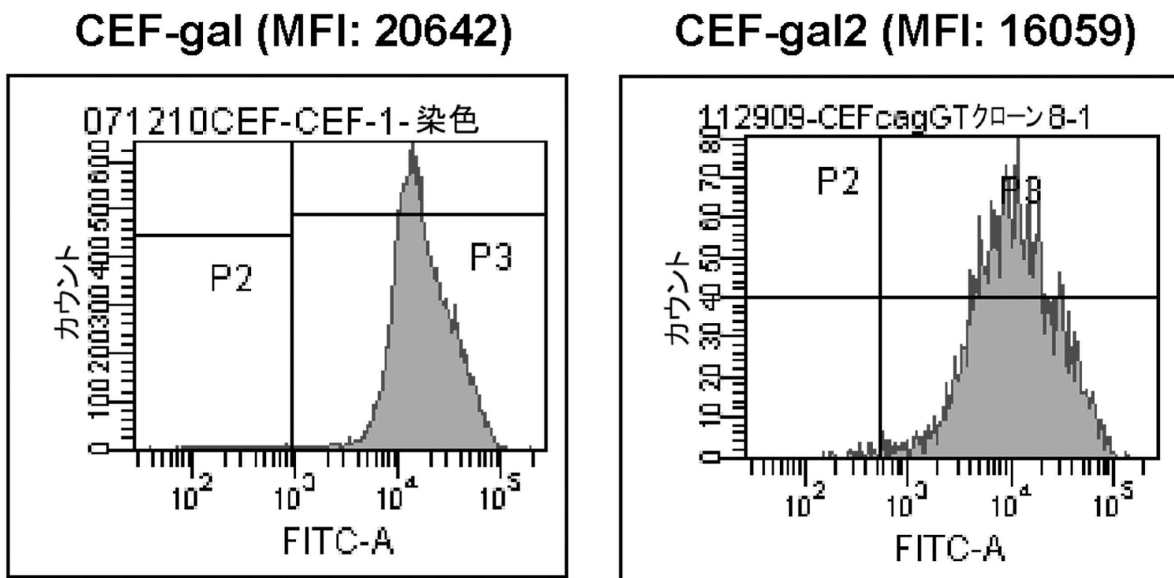
【図 6】



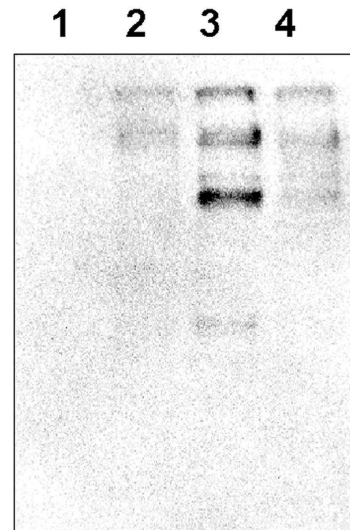
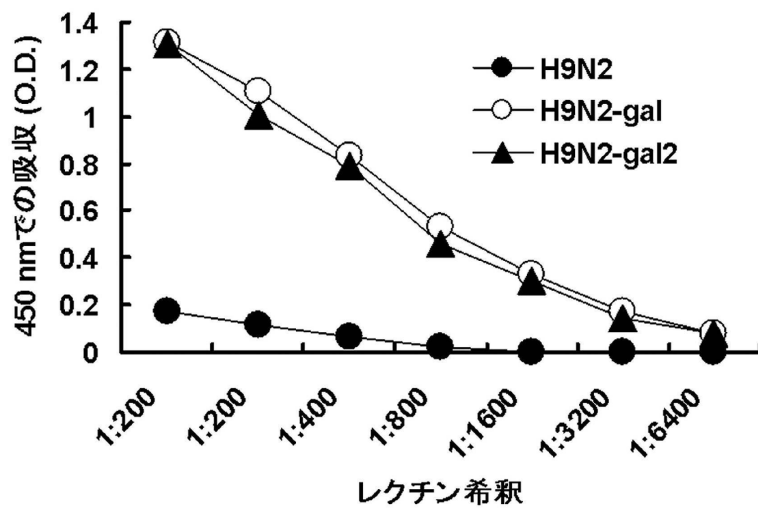
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

[0005699377000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	39/165 (2006.01)	A 6 1 K 39/165
A 6 1 K	39/20 (2006.01)	A 6 1 K 39/20
A 6 1 K	39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21
A 6 1 K	39/17 (2006.01)	A 6 1 K 39/17
A 6 1 K	39/255 (2006.01)	A 6 1 K 39/255
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04

- (72)発明者 今井 邦俊
 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品衛生研究センター内
- (72)発明者 田上 貴寛
 茨城県つくば市池の台2 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所内

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0123494 (US, A1)
 国際公開第2008/118487 (WO, A2)
 Blood, 2002年, Vol.99, p.2477-2482
 J. Virol., 2007年, Vol.81, p.9131-9141
 Nature, 1996年, Vol.379, p.85-88
 Gene, 1991年, Vol.108, p.193-200
 Glycobiology, 1993年, Vol.3, p.575-580

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|------|--------|
| C12N | 7/00 |
| A61K | 39/145 |
| A61K | 39/165 |
| A61K | 39/17 |
| A61K | 39/20 |
| A61K | 39/21 |
| A61K | 39/255 |
| A61K | 39/285 |
| A61P | 31/12 |
| A61P | 37/04 |
| C12N | 7/04 |
| C12N | 15/09 |
- C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)