



Title	全てのウイルスに対応できる汎用的な組換えウイルス作製技術の開発とその応用
Author(s)	山本, 紘嵩
Description	配架番号 : 3007
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16914号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16914
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99759
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Hirotaka_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 山本 紘嵩

学 位 論 文 題 名

全てのウイルスに対応できる汎用的な組換えウイルス作製技術の開発とその応用
(Applied research on the rapid reverse genetics for RNA viruses and DNA viruses)

【背景と目的】今もなお流行している新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に代表される新興・再興ウイルス感染症は、時に多くの人命を奪い、世界経済に多大な被害をもたらす。このような事態を今後避けるためにも感染症が発生した際にウイルスの性状を解析し、更なる流行への先回り対策及び治療薬の開発に向けた基盤研究を行うことは極めて重要である。ウイルスのリバースジェネティクス法は、ウイルスゲノムを細胞に導入することで、感染性ウイルスを人工合成する技術である。この方法を用いることで、任意の変異をもつ組換えウイルスあるいは蛍光及び発光レポーターを搭載したウイルスを作製することが可能である。しかし、一般的に使用されているリバースジェネティクス法は、複雑な遺伝子操作技術と膨大な時間を要するため、新興・再興ウイルス感染症に迅速に対応できない。従って、汎用性が高く、かつ迅速に組換えウイルスを作製することができるリバースジェネティクス法を新たに開発することができれば、ウイルス感染症に迅速な対策を講じることができると考えられる。

私が所属する教室では、Circular Polymerase Extension Reaction (CPER) 法 (Edmonds et al., J Virol., 2013; Setoh et al., J Gen Virol. 2015; Setoh et al., mSphere. 2017; Amarilla AA, et al., Nat Commun., 2021) を駆使し、プラス鎖一本鎖 RNA ウイルスの組換えウイルスを迅速に人工合成することに成功している (Tamura et al., J. Virol., 2018; Torii et al., Cell Rep., 2021; Tamura et al., J Virol., 2024)。また、Nakashima らによりマイナス鎖 RNA ウイルスへ CPER 法を適用し、組換えウイルスの作出に成功したことが報告された (Nakashima et al., Biochem Biophys Res Commun., 2025)。CPER 法とは、末端領域が重なるように設計した遺伝子断片を RNA ポリメラーゼ I または II を含むリンカー断片と共に PCR で連結して環状 DNA を構築する手法である。この手法を用いて SARS-CoV-2 の様々な変異株の性状を迅速に明らかにし、本邦での流行を前に成績を公表することができたことで、CPER 法の極めて高い有用性が実証された (Motozono et al., Cell Host Microbe 2021, Saito et al., Nature 2021, Yamasoba et al., Cell 2022, Kimura et al., Cell 2022, Saito et al., Cell Host Microbe; Tsujino et al., Microbiol Immunol., 2024; Tamura et al., Nat Commun., 2024; Tsujino et al., J. Virol 2025)。従って、さまざまなウイルスにおいて組換えウイルスを自在に且つ迅速に作製することができれば、基礎ウイルス学研究の発展に資すると考えられる。

CPER 法が適用されている SARS-CoV-2 をはじめとする RNA ウイルスは、自身のゲノムの校正機能が低く変異が入り易いため変異株が次々と出現する (Duffy, PLoS Biok., 2018)。そのためウイルスの迅速な性状評価が必要となるが、臨床検体から分離されたウイルスは他の微生物による汚染、または採取・保存の過程で感染性が低下することで細胞培養で増幅できない場合がある。そこで私は第 1 章として、COVID-19 診断の過程で採取された患者唾液検体を利用しウイルス分離を行うことなく、検体由来のゲノムをテンプレートにした CPER 法を用いて組換えウイルスの作製を試みた。さらに、唾液から作製した組換えウイルスを用いて承認済み抗 SARS-CoV-2 中和抗体医薬の中和試験を行うことで、その有用性を評価することを目的とした。

これまで、RNA ウイルスには迅速リバースジェネティクスである CPER 法にて作出に成功しその性状を解析してきた一方で、DNA ウイルスで CPER 法によるウイルス作出の報告はない。そこで、第 2 章として

アデノウイルス（AdV）を対象として DNA ウイルスへの CPER 法の適用を試みた。2 種の AdV に迅速リバー
ースジェネティクス技術である CPER 法を適用し、組換えウイルスの作出を目的とした。

【対象と方法】第 1 章では、市立札幌病院の COVID-19 患者由来の唾液 10 検体を本研究に供した。唾液
からウイルス RNA を抽出し、cDNA を得た。スパイクタンパク質の全領域を増幅することができるプライ
マーを新たに設計し、遺伝子断片を PCR によって増幅した後、塩基配列を決定した。次に臨床検体から
得たスパイクタンパク質をコードする遺伝子断片に加えて従来株の SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質
以外の領域をコードする遺伝子断片とサイトメガロウイルスプロモーターと D 型肝炎リボザイム配列を
含むリンカー断片を用いて CPER 反応を行った。得られた CPER 産物を HEK293-3P6C33 細胞にトランスフェ
クション法にて導入した。培養上清を回収し Vero E6/TMPRSS2 発現細胞に感染させ、組換えウイルスが
作出されたか否かを、細胞変性効果（CPE）及びウイルス RNA を検出する定量 PCR 法にて評価した。さ
らに、GFP 搭載のキメラウイルスを作製し中和抗体カクテル AZD7442 を用いて唾液由来キメラウイルス
の有用性を評価した。

第 2 章では、AdV のウイルスゲノム全長約 35,000 塩基を 10 個の領域に分け、それぞれをプラスミドに
クローニングした。アデノウイルスは先端と末端の配列が同一であるため、F10 と CMV プロモーターを
含む Linker を PCR にて連結し一つの断片にしてから CPER を行った。CPER 産物を 293 細胞と A549 細胞
にトランスフェクションした。培養上清を A549 細胞に感染させ、免疫蛍光染色と増殖性を解析した。

【結果】第 1 章で、本研究に供した 34 検体のうち Ct 値が 23 以下であった 28 検体でスパイクタンパク
質遺伝子の増幅に成功し、28 検体全てでウイルスの作出が確認された。28 検体のうち BA. 1, BA. 2, XBB. 1
がそれぞれ 5 検体、BA. 5 が 13 検体であった。増幅したスパイクタンパク質を CPER に用いたところ全て
の検体で組換えウイルスの作出を確認した。また、GFP 搭載キメラウイルスは臨床分離株と同様の中和
抗体価を示した。

第 2 章において AdV の組換えウイルスを作出するための CPER 反応物を接種した細胞においてカプシド
タンパク質のヘキソンに対する抗体を用いて細胞を免疫染色したところ抗原陽性であり、AdV において
も CPER 法によって組換えウイルスの作製に成功した。組換え AdV の増殖能は野生株と同等であった。

【考察】第 1 章の研究から、ウイルスを単離することなく、臨床検体から CPER 法にて組換え SARS-CoV-2
を迅速に作出することに成功した。また、GFP 搭載キメラウイルスは臨床分離株と同様の中和抗体価を
示したことからこの技術の有用性が示された。本研究の技術を用いることで、次々と出現する
SARS-CoV-2 変異株等、流行株のウイルスの性状を迅速に解析可能である。

第 2 章において、DNA ウイルスである AdV を対象に CPER 法を適用し、本研究にて新たな高速リバー
ースジェネティクス法の確立に成功した。今後は蛍光及び発光レポーターを導入した組換えウイルスを作出
し、スクリーニング及び感染イメージング等の応用研究への展開が期待できる。また、他種の AdV にお
いて CPER 法を用いて従来よりも迅速に AdV を作出することで、今後、AdV の引き起こす多種多様な疾病
についてその規定する因子を同定するなどの基礎研究を推進したい。

本研究にて臨床検体からの組換えウイルスの作出及び DNA ウイルスへの CPER 法の適用が可能となった
ため、これらを応用し新興・再興ウイルス感染症が流行した際には迅速にウイルスを作出し対応するこ
とができると考えられる。

【結論】本研究では CPER 法を改良することで、臨床検体からの SARS-CoV-2 の作出及び DNA ウイルスで
ある AdV の組換えウイルスの作出に成功した。本研究の成果には、従来のリバーースジェネティクス技術
に比べ、迅速に組換えウイルスを作出することができるという意義がある。さらに、SARS-CoV-2 だけで
なく新たなウイルス感染症が発生した際の対策に貢献できると考えられる。また、アデノウイルス以外
の DNA ウイルスにも CPER 法が適用できる可能性が示唆される。すなわち、この技術を用いることによ
って、未だ見ぬ新興・再興ウイルス感染症が流行した際に迅速に対応策を講じることが可能である。