

2018 (平成30) 年度 北陸大学特別研究助成金【 奨励・若手・女性・**挑戦的**】 成果報告書

北 陸 大 学  
学 長 殿

代表者	所属	医療保健	職位	准教授	氏名	小宮 智義
-----	----	------	----	-----	----	-------

研究課題名	麻疹ウイルスベクターを用いたデングワクチンの開発と免疫原性に関する研究
-------	-------------------------------------

交付額	1,200,000 円
-----	-------------

**研究成果の概要**

未だ有効な予防手段がないデングウイルス (DENV) 感染症に、麻疹ウイルスをベクターに用いた組換えワクチンの開発を進めている。生ワクチン株である麻疹ウイルスA1C株にDENV2型の構造タンパク質PreM/E、非構造タンパク質NS1領域をそれぞれ挿入した組換えウイルス (MVA1C/DEN) を作製し、それぞれの蛋白の発現を確認した。作製したMVA1C/DENをVero細胞またはB95a細胞で培養し、コトンラットに接種し免疫原性を確認したところ、高い中和抗体は認められなかったが、CTL活性の上昇が認められた。そのため、組換えウイルスの挿入遺伝子領域と免疫方法の再検討を進めている。

**研究目的** 研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

デングウイルス (DENV) が分離されてから70年以上が経過したが、市場化された開発途上国向けワクチンの有効性は低く、未だ有効なワクチンもなく開発が進められている。その理由の一つとして、デングウイルスには4つの血清型があり、初感染後に産生される抗体が再感染時に別の血清型に感染した場合、抗体増強作用 (ADE) を誘発し、デング出血熱等重篤な疾患になるため、液性免疫としての中和抗体だけを誘導するワクチン開発では感染防御できないのではないかと考えられている。我々は、現在弱毒生ワクチンとして使用されている麻疹ウイルスA1C株をベクターとして、デングウイルスの感染防御抗原を担う構造タンパク質及び非構造タンパク質遺伝子の一部を挿入し、生ワクチンとして細胞性免疫誘導とADEを誘発しない中和抗体誘導を主とした有効性および安全性の高い組換えワクチンの研究を目的としている。また、動物モデルのないDENVに対し、麻疹ワクチンを利用することで動物モデルの利用が可能となり、DENVの生体内感染機序およびデング出血熱の病態形成機序を明らかにしていく可能性も検討できる。

DENVには4つの血清型があり、同型のDENVに対する防御免疫は終生持続するが、他の型に対する防御免疫は短期間で、その後他の型のDENVには感染する。1つの血清型のDENV初感染により誘導される免疫応答は、液性免疫、細胞性免疫とも型特異性の応答と型交叉性応答が混在したものである。防御免疫の本質は完全に明らかになってはいないが、中和抗体が主体であると考えられている。そのため、中和抗体誘導がワクチン研究の主な目的になるが、ワクチン免疫によって産生される中和抗体での再感染時ADEによる重症化の問題もあり妨げになっている。一方、細胞性免疫でのT細胞応答は、型特異性と型交叉性応答が型特異性優位に混在するが、他の血清型再感染後は型交叉性T細胞が優位となっていることが報告されている。

我々は、JEVのPreM-E、NS1遺伝子を挿入させた組換え麻疹ウイルス (MVA1C/JEV) の作製を行い、その際挿入する遺伝子についてもその機能について詳細に検討を行い、EタンパクのみならずNS1遺伝子が細胞性免疫に関与していることから、同じフラビウイルスであるDENVでも同様にNS1遺伝子に注目し、挿入遺伝子について他で研究開発されているキメラワクチンなどと違う遺伝子挿入着想に基づき研究を進めてきている。また、MVA1C/JEVの動物実験による抗体誘導の解析結果より、細胞性免疫誘導が優位になることが明らかになり、T細胞応答も含めた優位性が働き、他の型に対するDENVにも交叉性があることが期待される。

以上、我々が他のウイルスでの組換え麻疹ウイルスから得られてきた研究結果より、未だDENVワクチン開発が困難である理由を克服するため、また有効性と安全性の両側面を持つ新たなDENVワクチンの候補としての可能性を目的にしている。

**研究の方法**

本研究の目的は第一に有効なDENVワクチン候補の研究である。現在、研究されているDENVワクチンは、キメラワクチン、不活化ワクチンなどであり、既に臨床試験が行われているものもあるが、4つの血清型全てに有効なワクチン開発の成功に至っていない。我々は、DENVのエンベロープタンパク質と膜タンパク質 (PreM-E) と非構造タンパク質で感染防御タンパク質候補であるNS1遺伝子に注目し、それぞれの遺伝子を麻疹ウイルスA1C株のPMジャンクションに挿入した後、リバーシジェネチック (RG) 法を用い、293T細胞、その後Vero細胞に感染させ組換えウイルスの回収を行う。回収した組換えウイルス (MVA1C/DEN) については、モノクローナル抗体および免疫沈降法などにより目的遺伝子の同定を行い、さらにベクターとして利用している麻疹ウイルスの弱度マーカーである温度感受性 (ts) について、遺伝子および生物学的同定を行う。

第二に、ADEでない中和抗体誘導を測定する方法として、ADEをおこす抗体がFcγレセプターに吸着することから、Fcγレセプターを発現するBHK-21細胞と、発現しないBHK-21細胞で、それぞれで中和抗体を測定し、その比からどちらに優位な抗体を誘導しているかを明らかにし、ワクチンの有効性評価に利用することとした。培養回収しMVA1C/DENを、麻疹ウイルスに感受性のあるコトンラットに接種し、得られた血清より中和抗体の測定を行う。また、免疫終了後脾臓細胞を採取し、DENVを刺激することにより、サイトカイン産生能等を測定し、細胞性免疫誘導についても解析する。

第三に、DENV生体内感染機序について、今年度はMVA1C/DEN免疫後の動物内臓器からDENVウイルス遺伝子の回収を行い、生体内臓器の感染実態を明らかにしていく予定である。

## 研究成果

引用文献は文末に〈引用文献〉として記入して下さい。

麻疹ウイルスベクターを用いた組換えウイルスの作製は、RSV、インフルエンザ、Mumpsウイルス等で行い報告している<sup>1)</sup>。また、DENVと同じフラビウイルス科に属する組換え日本脳炎ウイルス (MVAIK/JEV) での動物実験の結果から、現行不活化ワクチンより早い中和抗体誘導と細胞性免疫誘導が得られ、新規ワクチン候補となり得ることを報告している<sup>2)</sup>。MVAIK/JEVの結果から得られた知見より、同じフラビウイルスであるDENVに有効な感染防御抗体誘導が出来る可能性を考え本研究に着手し、ADEと中和抗体の区別が可能な測定系も可能になり本研究を進めている。さらに、麻疹ウイルスAIK-C株は有効性並びに安全性も世界的に認められている弱毒生ワクチン株であり、弱毒関連遺伝子も明らかになっているため、優れたベクターとしての利用ができる<sup>3)</sup>。

麻疹ウイルスAIK-C株のPタンパクおよびMタンパク領域間の非翻訳領域に、DENV2型のPreM/E領域またはNS1領域を挿入した組換えウイルスを作製した。それぞれのタンパク発現を確認するため、感染細胞にモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行ったところ、細胞変性部位にそれぞれのタンパク発現を確認した。さらに、Vero細胞に感染させたMVAIK/DENを電子顕微鏡で確認したところ、挿入遺伝子の各タンパクの発現を確認した。

親株であるAIK-C株の生ワクチンの特性としての温度感受性について検討するため、温度感受性支配遺伝子であるP439に変異は認められず、さらにVero細胞に接種し33℃、35℃、37℃、39℃での増殖性を検討したところ39℃での増殖は認められなかった。このことより、作製した組換えウイルスは現在使用されている生ワクチン株として使用出来る可能性が示唆された。

次に作製した組換えウイルスMVAIK/DENをコットンラットに接種し免疫原性について検討した。接種14週後の血清をBHK-21細胞を用いて中和抗体価の測定を行ったところ顕著な中和抗体の上昇は認められなかった。しかし、脾臓細胞を用いたCD8-IFN $\gamma$ 陽性細胞の検出を行ったところ、PreM/E、NS1で有意な陽性細胞が認められ、細胞性免疫の上昇は確認された。なぜ中和抗体の上昇が認められなかったのか原因は不明であるが、現在免疫方法の検討および組換え領域の再検討を行っている。

将来的には1~4型全ての血清型に対する組換えウイルスを作製し、4価のデングワクチンとして評価する必要があるが、免疫原性が一番弱いとされているDENV2型に関して次年度も最初に継続していく予定である。

<sup>1)</sup>Nakayama, T., Sawada, a., Yamaji, Y., Ito, T. Recombinant measles AIK-C vaccine strain expressing heterologous virus antigens. *Vaccine*. 2016. 34:292-295.

<sup>2)</sup>Higuchi, A., Toriniwa, H., Komiya, T., Nakayama, T. Recombinant Measles AIK-C Vaccine Strain Expressing the prM-E Antigen of Japanese Encephalitis Virus. *Plos One* 2016 Mar 1;11(3).

<sup>3)</sup>komase, K., Nakayama, T., Iijima, M., Miki, K., Kawanishi, R., Uejima, H. The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype. *Vaccine*. 2006 Feb 6;24(6):826-34.

## 主な発表論文等 論文・学会・HP等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい

1. 伊藤尚志、山路祥晃、澤田成史、小宮智義、中山哲夫. コットンラット脾臓細胞を用いたムンプス 細胞性免疫の検討. 第22回日本ワクチン学会, 2018. 12 (神戸市)
2. Komiya T, Matsumura T, Toriniwa H. Takegami T: Seroepidemiological survey against Japanese encephalitis virus from wild boars in Ishikawa prefecture. 第66回日本ウイルス学会, 2018. 10 (京都市)