

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16224

研究課題名(和文) デング熱に対するRNAワクチン開発の基礎研究

研究課題名(英文) Development of RNA vaccine against dengue virus infection

研究代表者

小瀧 将裕 (KOTAKI, Tomohiro)

神戸大学・保健学研究科・助教

研究者番号：10758816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：デング熱に対する有効かつ安価なワクチン開発は喫緊の課題である。RNAワクチンは安価かつ効果の高い新規ワクチン候補となり得るが、報告例はない。本研究ではRNA複製領域を含む、自己複製可能なデングRNAワクチンの構築・評価を行った。また、日本脳炎、黄熱ウイルスとのキメラ化により、さらに抗体誘導能の高いワクチン開発を試みた。結果、わずか2.5 μ gの投与でマウス中に抗デング抗体を誘導するワクチンの作製に成功した。また、キメラワクチンは通常のデングワクチンより4倍程度高い抗体誘導能を示した。有望なワクチン候補として今後も解析・評価が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デング熱は世界で年間1億人が発症し、日本でも輸入症例や国内感染例が増加傾向にある。そのワクチンの開発は極めて重要な課題である。本研究では自己複製可能なデングRNAワクチンを初めて作製した。また、RNA複製領域を他のウイルスと置換することで、より効力が高まることを明らかにした。本研究により、デングワクチン開発の新たな方向性を打ち出したと考える。

研究成果の概要(英文)：Development of an effective and inexpensive vaccine against dengue is an urgent task. A self-replicable RNA vaccine could be a cheap and highly effective novel vaccine candidate. In this study, dengue RNA vaccine candidates were constructed and evaluated. In addition, chimeric vaccines that the RNA replication complex region of the vaccine is replaced with that of Japanese encephalitis virus or yellow fever viruses were constructed in order to achieve higher antibody-induction. As a result, we successfully generated vaccines that induced anti-dengue antibody in mice with a dose of only 2.5 μ g. In addition, the chimeric vaccine showed about 4-fold higher antibody-inducing ability than the original dengue vaccine. As a promising vaccine candidate, further analysis and evaluation is needed.

研究分野：ウイルス学

キーワード：デング熱 ワクチン RNA

1. 研究開始当初の背景

(1) デングウイルス(DENV)はフラビウイルス科に属する RNA ウイルスである。DENV 感染症であるデング熱、重症型のデング出血熱は熱帯・亜熱帯地域の途上国を中心に年間 1 億人以上が発症する最も重要な蚊媒介性感染症の一つである。ワクチンが効果的で有望な対策となり得る。

(2) 現在唯一認可されている生ワクチンはコストが高く、コールドチェーンも必要なため途上国での使用には向いていない。当教室ではその欠点を補う有望な候補としてデング DNA ワクチンの評価を行ってきたしかし、DNA ワクチンは DNA の染色体への組込み、持続的抗原発現による自己免疫疾患発症の恐れがあり、安全性に問題がある。現在までにヒトへの使用が認可された DNA ワクチンはない。

(3) そこで、DNA の染色体組込みが起こらない RNA ワクチンに着目した。従来 RNA は不安定で精製・運搬時、あるいは体内ですぐ分解されるためワクチンには向いていないと考えられてきた。しかし、RNA 安定化技術や投与方法の改良により注目されている。安価でコールドチェーンは不要であり、安全性が高い。RNA ワクチンは既存のワクチンの問題点を解決しており、最適なデングワクチンとなり得る。

2. 研究の目的

インフルエンザやエボラ出血熱などに対する RNA ワクチンの報告例はあるが、デング熱に対する報告例はない。そこで、本研究ではデング熱に対する RNA ワクチン開発の基礎研究として、そのデザインの最適化と免疫誘導の解析を行い、デング RNA ワクチンの実現可能性を評価する。

3. 研究の方法

(1) RNA ワクチンの構築：構造タンパク C 領域を欠損したほぼ全長の DENV ゲノムを含むプラスミドベクターを構築した。また、そのゲノムの 5'末端には T7 プロモーター 配列を、3'末端には D 型肝炎ウイルスリボザイム(HDVr)を導入した(図 1)。

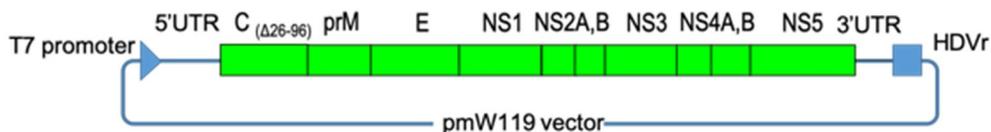


図 1. 基本の RNA ワクチン作製用プラスミド

構築したプラスミドは制限酵素処理により直鎖化した後、in vitro 転写により mRNA を合成した。作製した RNA は Vero 細胞あるいは BHK-21 細胞にトランスフェクトし、感染性ウイルス粒子の産生が無いことを確認した。

同様に、同じフラビウイルス属ウイルスである日本脳炎ウイルス(JEV)、あるいは黄熱ウイルス(YFV)の RNA ワクチンも作製した。そして、デング防御免疫に関わる prM-E 領域、あるいは E 領域のみを JEV/YFV RNA ワクチンのそれと置き換えることで、より効率よく免疫を誘導するワクチンの開発を目指した。さらに、ウイルスタンパクのシグナラーゼ認識部位(C タンパク質 C 末端)に変異(PAQAQ)を導入し、よりウイルス様粒子(VLP)産生量の高いワクチン構築を試みた(図 2)。

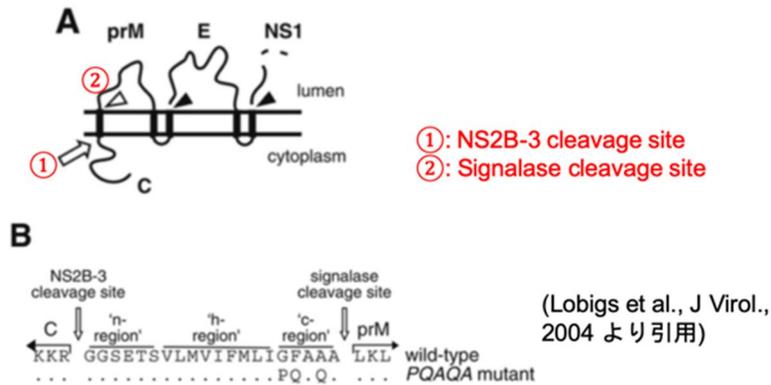


図 2. ウイルス構造タンパクのシグナラーゼ認識部位
PQAQA 変異の導入により VLP の産生量が上昇することが報告されている

(2) RNA ワクチンの評価： RNA 5 μ g を電気穿孔法により 1×10^6 の BHK 細胞に導入した。24 時間ごとに培養上清を回収し、ウイルスタンパク産生量を ELISA により測定した。6 週齢の BALB/c マウスに RNA ワクチン 2.5 μ g を 3 週間隔で 3 回、電気穿孔法により投与した。各免疫の 1 週間後に採血を行い、血中抗体価の測定を ELISA にて行った。

4. 研究成果

(1) 本研究では通常のデング RNA ワクチン、JEV/YFV とのキメラ RNA ワクチン、さらにプロテアーゼ切断領域に PQAQA 変異を導入したワクチンの合計 9 種類を構築した。それらを Vero 細胞に導入したところ、ウイルス構造タンパクの発現が確認された(図3)。また、培養上清中に感染性ウイルス粒子は検出されなかった。以上からデング RNA ワクチンの構築に成功したと考えられる。

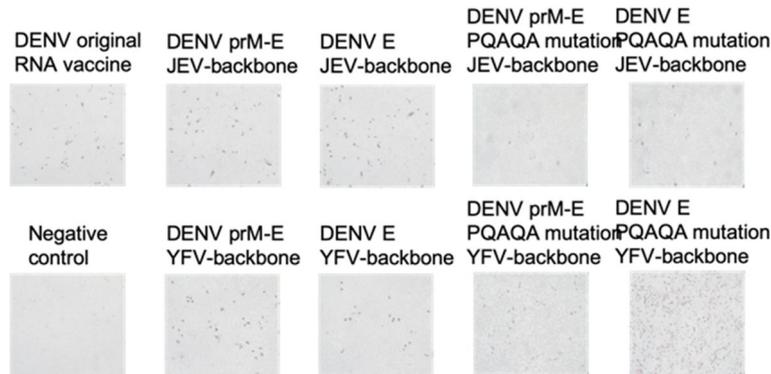


図3. RNA 導入細胞の免疫染色像

(2) しかし、培養上清中の VLP 産生量は DNA ワクチンと比較して高くなかった。そこで、PQAQA 変異導入により VLP 産生量の高いワクチン開発を試みたが、VLP 産生量は増加しなかった。

(3) 動物実験の結果、いくつかの候補ワクチンは DENV に対する抗体を誘導した(表1)。わずか 2.5 μ g の RNA 投与により、抗体価を陽転させており、有望なワクチンとなり得ることが示唆された。また、JEV とのキメラ化により、抗体誘導能のより高いワクチンの開発にも成功した。DENV の prM 領域は抗体依存性感染増強(ADE)活性の高い抗体を誘導すると報告されている。本研究で作製した DENV の E のみを免疫するワクチンはより安全な候補となりうる。今後、中和活性、ADE 活性の解析を行う予定である。

本研究では PQAQA 変異の導入は VLP 産生量、抗体誘導能を上昇させなかった。同じフラビウイ

ルス属ウイルスであるダニ媒介性脳炎のRNAワクチンにおいては、シグナラーゼ部位への変異導入による抗体誘導能の上昇が報告されている(Kofler et al., PNAS, 2004)。より防御誘導能の高いワクチンを目指して、シグナラーゼ部位への変異導入は依然有効であると考えられるため、他の変異導入を検討する必要がある。

表1. 誘導されたELISA抗体価*

	1 st immunized	2 nd immunized	3 rd immunized
1. D2 RNA vaccine Original	<1:100	1:800	1:1600
2. D2 prM-E + YFV backbone	<1:100	<1:100	<1:100
3. D2 E + YFV backbone	<1:100	1:800	1:1600
4. D2 prM-E + JEV backbone	<1:100	1:3200	1:3200
5. D2 E + JEV backbone	<1:100	1:3200	1:6400
6. D2 prM-E + YFV backbone + PQAQA	<1:100	<1:100	<1:100
7. D2 E + YFV backbone + PQAQA	<1:100	<1:100	1:400
8. D2 prM-E + JEV backbone + PQAQA	<1:100	<1:100	<1:100
9. D2 E + JEV backbone + PQAQA	<1:100	<1:100	1:1600

*陰性対象の二倍以上の値を示す血清の最大希釈度で表した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Teguh Hari Sucipto, Tomohiro Kotaki, Kris Cahyo Mulyatno, Siti Churrotin, Amaliah Labiqah, Soegeng Soegijanto, Masanori Kameoka	4. 巻 2018
2. 論文標題 Phylogenetic Analysis of Dengue Virus in Bangkalan, Madura Island, East Java Province, Indonesia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Trop Med	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1155/2018/8127093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mulyatno KC, Kotaki T, Yotopranoto S, Rohmah EA, Churrotin S, Sucipto TH, Amarullah IH, Wardhani P, Soegijanto S, Kameoka M	4. 巻 71
2. 論文標題 Detection and serotyping of dengue viruses from Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) collected in Surabaya, Indonesia 2008 - 2015	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 58-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小瀧将裕、黒須剛、亀岡正典
2. 発表標題 Development and evaluation of recombinant anti-dengue neutralizing antibodies that do not cause antibody-dependent enhancement of viral infection
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小瀧将裕、黒須剛、亀岡正典
2. 発表標題 抗体依存性感染増強を起こさない組換え抗 Dengue ウイルス抗体の作製および評価
3. 学会等名 第54回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小瀧将裕、山中敦史、小西英二、亀岡正典
2. 発表標題 デングウイルスに対する感染増強抗体を誘導しない日本脳炎ワクチンの開発
3. 学会等名 第53回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小瀧将裕、亀岡正典
2. 発表標題 prM領域を改変したデングウイルス2型DNAワクチンの評価
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小瀧将裕、山中敦史、小西英二、亀岡正典
2. 発表標題 デングウイルスの感染増強を起こさない日本脳炎ワクチンの開発
3. 学会等名 第22回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小瀧将裕、山中敦史、小西英二、亀岡正典
2. 発表標題 デングウイルス1型Eタンパクドメイン 上の糖鎖近傍エピトープの解析
3. 学会等名 第64回日本ウイルス学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----