

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08454

研究課題名(和文) 粘膜免疫誘導型新規感染性ウイルス腸炎ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a novel membrane immune-induced infectious virus enteritis vaccine

研究代表者

伊奈田 宏康 (Inada, Hiroyasu)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：90283522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：感染症には、予防および有効な治療薬が重要であり、特にワクチンは予防の要である。感染症は、グローバル化した世界やワクチン供給などの観点からも、より有効な予防法・ワクチンの開発が望まれている。多くの感染性腸炎は粘膜を介して感染する。ノロウイルスは感染性胃腸炎を引き起こす主なウイルスである。粘膜免疫を誘導する新たなノロウイルスワクチンの開発を行った。また、感染性腸炎に対する粘膜誘導型ワクチンの効果について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染性腸炎はじめ多くの感染症対策には治療薬とともにワクチンの開発が重要である。ワクチンの開発は、安全性と効果が重要である。病原微生物は感染力や毒性は多岐にわたり、様々なタイプのワクチンの開発が望まれ、また準備が必要である。今回我々が開発したパラインフルエンザ2型ウイルスを用いたワクチンは、粘膜免疫を誘導する従来にはないワクチンであり、様々な感染症に対する新たなワクチンの開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Preventive and effective therapeutic drugs are important for infectious diseases, and vaccines in particular are the key of prevention. For infectious diseases, the development of more effective vaccines is desired from the globalized world and vaccine supply. Many infectious disease, such as infectious enteritis, is infected through the mucosa. Norovirus is the main virus that causes infectious gastroenteritis. We have developed a new norovirus vaccine that induces mucosal immunity. We also investigated the effect of mucosal-induced vaccines on infectious enteritis.

研究分野：分子生物学・病理学

キーワード：感染性胃腸炎 ワクチン 粘膜免疫 ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

現代の医療において、新興・再興感染症、日和見感染などを含めた感染症は最も多く直面する疾患である。感染症による不幸な死の転帰を免れたとしても、医療経済的、社会医学的側面からも影響は甚大である。感染症への対策は、薬剤耐性の広がりや問題視されている中で、予防の中心となるワクチン開発への要望は高まっている。一方で、ワクチンは十分な予防効果が求められると同時に高い安全性も要求され、開発状況は未だ十分とはいえない。

現行のワクチン接種は、一部を除いてほとんどが不活化ワクチンの皮下接種で行われている。微生物にもよるが、一般的に弱毒生ワクチンの方が長期間の免疫を獲得できる可能性が高い。またほとんどの病原微生物は粘膜細胞からの感染のため、粘膜免疫に基づいた視点が注目されている。本研究は、感染性腸炎において、弱毒生ワクチンに近い効果や特性が期待でき、さらに粘膜免疫を誘導するウイルスベクターを用いた新たなワクチンの開発を行うもので、粘膜免疫の誘導能とワクチン効果、ウイルスベクターのワクチン効果を検証し、次世代のワクチン開発の基盤を目指すものである。

近年我々は、気道粘膜に感染し、導入遺伝子を高発現し、強力な粘膜免疫誘導をもつパラインフルエンザ 2 型 (PIV2) ベクターを開発し、この PIV2 ベクターを用いて、免疫環境を細胞性免疫 (細胞傷害性 T 細胞 (CTL)/Th1) あるいは液性免疫 (Th2) へ誘導可能となり、結核菌の増殖抑制、喘息の緩和、アトピー性皮膚炎の病態抑制などを示す結果を得ている。粘膜免疫を誘導すること、導入遺伝子による CTL/Th1 への誘導を確立していること、ウイルスベクター自体がアジュバント効果 (Th2 誘導性) を有すること、さらに、複数の遺伝子を同時に導入可能なベクターの特徴を有することが挙げられ、次世代のワクチンあるいは遺伝子治療の有効なツールとなり得ると考えられる。

新型コロナウイルス (COVID-19) 感染症のパンデミックにより、有効な治療法が確立していない感染症に対して、様々な方法による、より安全で効果的なワクチンの開発が改めて重要視されている。

### 2. 研究の目的

現代の医療において、新興・再興感染症、日和見感染などを含めた感染症は最も多く直面する疾患である。感染症による不幸な死の転帰を免れたとしても、医療経済的、社会医学的側面からも影響は甚大である。感染症への対策は、薬剤耐性の広がりや問題視されている中で、予防の中心となるワクチン開発への要望は高まっている。一方で、ワクチンは十分な予防効果が求められると同時に高い安全性も要求され、開発状況は未だ十分とはいえない。

現行のワクチン接種は、一部を除いてほとんどが不活化ワクチンの皮下接種で行われている。微生物にもよるが、一般的に弱毒生ワクチンの方が長期間の免疫を獲得できる可能性が高い。またほとんどの病原微生物は粘膜細胞からの感染のため、粘膜免疫に基づいた視点が注目されている。本研究は、感染性腸炎において、弱毒生ワクチンに近い効果や特性が期待でき、さらに粘膜免疫を誘導するウイルスベクターを用いた新たなワクチンの開発を行うもので、粘膜免疫の誘導能とワクチン効果、ウイルスベクターのワクチン効果を検証し、次世代のワクチン開発の基盤を目指すものである。

近年我々は、気道粘膜に感染し、導入遺伝子を高発現し、強力な粘膜免疫誘導をもつパラインフルエンザ 2 型 (PIV2) ベクターを開発し、この PIV2 ベクターを用いて、免疫環境を細胞性免疫 (細胞傷害性 T 細胞 (CTL)/Th1) あるいは液性免疫 (Th2) へ誘導可能となり、結核菌の増殖抑制、喘息の緩和、アトピー性皮膚炎の病態抑制などを示す結果を得ている。粘膜免疫を誘導すること、導入遺伝子による CTL/Th1 への誘導を確立していること、ウイルスベクター自体がアジュバント効果 (Th2 誘導性) を有すること、さらに、複数の遺伝子を同時に導入可能なベクターの特徴を有することが挙げられ、次世代のワクチンあるいは遺伝子治療の有効なツールとなり得ると考えられる。

新型コロナウイルス (COVID-19) 感染症のパンデミックにより、有効な治療法が確立していない感染症に対して、様々な方法による、より安全で効果的なワクチンの開発が改めて重要視されている。

### 3. 研究の方法

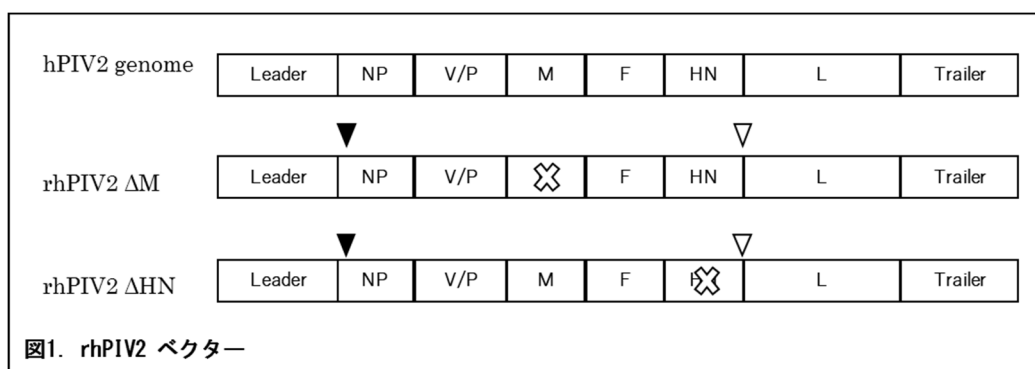
本研究で使用する hPIV2 ゲノムと、ワクチン開発用の非増殖型アンチセンス rhPIV2 ベクター (rhPIV2 M および rhPIV2 HN) の概略を図 1 に示す。気道粘膜に感染させ、液性免疫および細胞性免疫の両面から相乗的な効果を期待できるヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (rhPIV2) ベクターを開発し、安全性、抗原発現能、高い粘膜誘導能をもつ非増殖型経鼻ウイルスワクチンベクターならびに高効率産生系を確立した。このウイルスベクターの特徴は、非増殖型ベクターで安全性が高いこと、鼻・気道感染から腸管粘膜に粘膜免疫を誘導できること、強力な細胞性免疫を誘導可能なウイルスベクターを既に開発していること、ウイルスベクター自身が強力な液性免疫を誘導すること、複数の蛋白を同時に発現可能なこと、などがあげられる。

## 1) ノロウイルスの骨格蛋白に対するワクチンの作製および効果の検討

最近のノロウイルス感染症は、ノロウイルス G .4 型あるいはその変異株が流行の中心である。本研究では、粘膜免疫の誘導可能な非増殖型ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型 ( rhPIV2 ) ベクターを用いて、ノロウイルス ( ノロウイルス G .4.2012 シドニー株 ) の外殻タンパクを発現させたワクチンを作製した。今回は、より安全性が高くより安定した改良型のベクター ( rhPIV2 HN ) にノロウイルス外殻タンパク ( VP1(ORF2) ) を組み込み、新たにワクチンを作製した。そして、ワクチンとして動物実験に使用可能な大量のワクチンの作製・精製後、マウスにワクチンを 4 週間隔で経鼻投与し、そのワクチン効果の解析を行った。

## 2) コレラ毒素 ( CtxB ) に対する新規ワクチンの作製および効果の検討

水様性下痢を呈するコレラは、発症者のほとんどが海外渡航者のため、輸入感染症と言われている。水様性下痢を生じるコレラ毒素は、コレラ毒素は、2 つのサブユニットからなる。毒素活性本体である ADP リボシルトランスフェラーゼ活性を持つ A サブユニットと細胞との結合活性を持つ B サブユニット ( CTB ) からなる。CBT を PIV2 ベクターに搭載したワクチンを作製した。そして、ノロウイルスワクチンと同様に、ワクチンとして動物実験に使用可能な大量のワクチンの作製・精製後、マウスにワクチンを経鼻噴霧し、ワクチン効果の解析を行った。ノロウイルスワクチンの解析と同様に行った。



## 4. 研究成果

### 1) ノロウイルスの骨格蛋白に対するワクチン作製およびその効果の検討

約  $8.0 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> /ml の力価をもつノロウイルスのワクチンの大量の作製・精製に成功した。また、ノロウイルス検査キットを用いてワクチンの抗原性を確認した。このワクチン 20 μl をマウスに 4 週間隔で合計 3 回経鼻投与し、投与前および各投与後の血清、最終投与 4 週間後の小腸・大腸内容物 ( 解剖後の各内容物 ) および小腸・大腸粘膜 ( 解剖後の各ホモジネート ) について解析を行った。抗体価の測定は 2 種類のペプチド ( 418-LAPAVAPTFPGEQLLFFRST-437、515-FRFDSSWVNQFYTLAPMGNGT-534 ) を用いた ELISA 法で解析を行った。これらのペプチドはいずれもノロウイルスの検査キットに反応するとされるアミノ酸を含んだペプチドである。また、市販されているノロウイルス様中空粒子 ( VLP ) を用いてペプチドと同様に検討を行った。2 種類のペプチドおよび VLP に対して、ワクチン投与後の血清に反応の上昇はみられなかった。本ワクチンは市販の検査キットには抗原性を有しているため、適切なノロウイルス抗体価の測定法の確立が必要であると考えられた。

### 2) コレラ毒素 ( CtxB ) に対する新規ワクチンの作製および効果の検討

約  $4.2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> /ml の力価をもつコレラ毒素 ( CTB ) のワクチンの大量の作製・精製に成功した。ノロウイルスワクチンと同様に、このワクチン 20 μl をマウスに 4 週間隔で合計 3 回経鼻投与し、投与前および各投与後の血清、最終投与 4 週間後の小腸内容物および小腸粘膜などについて解析を行った。また同様に、抗体価の測定は ELISA 法をもちいて検討を行った。CTB 特異的血清抗体は、IgG 抗体では 1 回ワクチン投与後 ( 投与後 4 週間 ) から上昇を認め、2 回目は 1 回目の 2 倍以上の反応を認め、3 回目は 2 回目と同等の反応がみられた。CTB 特異的 IgA 抗体は、1 回目接種後では、抗体価の上昇がみられなかったが、2 回目、3 回目と接種する毎に抗体価の上昇が認められた ( 図 2、横軸：吸光度 450nm )。ワクチン接種後の小腸内容物および小腸粘膜 ( 小腸ホモジネート ) は CTB 特異的 IgA 抗体価の優位な上昇を認めた ( 図 3、横軸：吸光度 450nm )。大腸内容物及び大腸粘膜も小腸同様に CTB 特異的 IgA 抗体価の優位な上昇を認めたが、各小腸での測定値に比べその値は低かった。また、小腸の重量・長さの測定などからマウスの下痢抑制効果、培養細胞を用いた検討から毒性を中和する抗体を持つことが確認できた。

以上から、新規粘膜誘導型ワクチンは、経鼻投与により小腸粘膜免疫を特異的に誘導すること考えられ、感染性腸炎に対し有効なワクチンである可能性が示唆された。

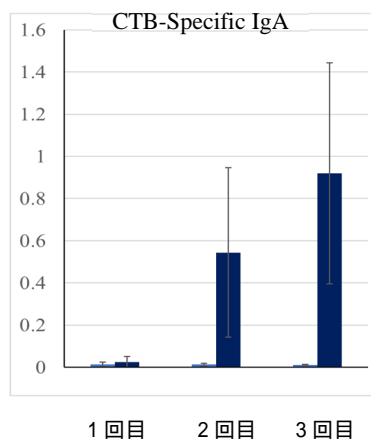
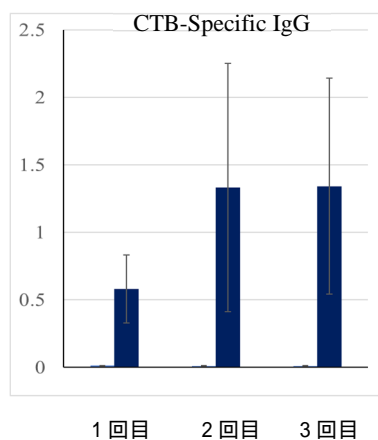


図2 . CTB 特異的血清抗体価

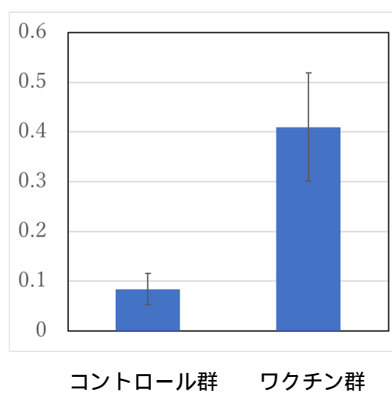
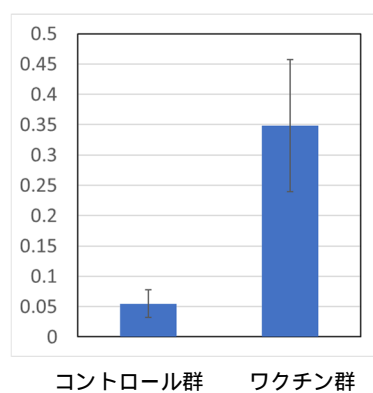


図3 . CTB 特異的 IgA 体価

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizuno S, Soma S, Inada H, Kanuma T, Matsuo K, Yasutomi Y.	4. 巻 203(1)
2. 論文標題 SOCS1 Antagonist-Expressing Recombinant Bacillus Calmette-Guerin Enhances Antituberculosis Protection in a Mouse Model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 188-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800694	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 -

1. 著者名 Soma S, Kawai S, Inada H, Watanabe K, Mizuno S, Kato S, Matsuo K, Yasutomi Y.	4. 巻 86(11)
2. 論文標題 Primary Role of Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Mycobacterium bovis BCG Infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infect Immun.	6. 最初と最後の頁 e00376-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00376-18	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平井一行、河野光雄、駒田洋、水谷健人、杉野香江、伊奈田宏康
2. 発表標題 ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとしたコレラワクチンの開発
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	河野 光雄  (Kawano Mitsuo)  (00234097)	三重大学・医学系研究科・講師    (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------