

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17948

研究課題名（和文）SFTSに対する安全性を高めた非増殖型CTL誘導ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of a CTL-based replication-deficient vaccinia virus strain LC16m8-based vaccine for severe fever with thrombocytopenia syndrome

研究代表者

加藤 博史（Kato, Hirofumi）

国立感染症研究所・実地疫学研究センター・研究員

研究者番号：80827890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：現時点で重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）に対するワクチンや治療薬はない。N、GPC、N+GPC遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスLC16m8株（m8-SFTS）がワクチンとしての効果を示した。本研究では細胞性と液性免疫の影響を検討した。結果としてCD8陽性細胞がワクチン効果に影響がなく、細胞性免疫の影響は証明できなかった。一方、ワクチン接種後血清がマウスでのSFTSVの増殖を抑制した可能性が示唆され、一定程度液性免疫は影響していた可能性があった。並行して、抗ウイルス薬の効果を検証した。ファビピラビルは、in vitroでSFTSV全遺伝子型に対して阻害する効果があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SFTSの報告数は年々増加傾向にあり、致死的な病気でもあることから、ワクチンや治療薬の開発は喫緊の課題である。本研究ではワクチンや治療薬の開発を行ったということで社会的意義が大きい研究であると考えている。

研究成果の概要（英文）：To date, no vaccine or therapeutic agent was approved against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV). In the previous study, the recombinant vaccinia virus LC16m8 strain (m8-SFTS) expressing the N, GPC, and N+GPC genes showed efficacy as a vaccine. In this study, the effects of cellular and humoral immunity were investigated. The results showed that the depletion of CD8-positive cells had no reduction on the fatality of mice, suggesting cellular immunity could not influence on vaccine efficacy. On the other hand, the passive serum may have inhibited the transition of body weight of mice after challenge, suggesting humoral immunity may have had an effect. Also, the effects of antiviral drugs were tested. Favipiravir was effective in inhibiting against all genotypes in vitro.

研究分野：ウイルス学

キーワード：重症熱性血小板減少症候群 ワクチン 抗ウイルス薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は日本を含む東アジアで流行している新興感染症であり SFTS ウイルス(SFTSV)の感染が原因である。発症者の致命率は20%程度となる重篤な疾患であるが、有効なワクチンや治療薬は存在しない。我々は、高度に弱毒化された痘そうワクチン株であるワクシニアウイルス LC16m8 (m8-SFTS) をベクターとして SFTSV の核タンパク質 (NP) 及び膜糖タンパク質 (GP) を発現する組換え m8 (それぞれ m8-NP、m8-GP、m8-NP+GP) を作製した。この組換え m8 をマウスにあらかじめ感染させ免疫を誘導させておけば、後に致死量の SFTSV を感染させてもマウスは100%生存する。興味深いことに、中和抗体等の液性免疫の誘導を期待した m8-GP で免疫した場合だけでなく、感染細胞質内で多く産生され、粒子表面にはみられない NP を発現する m8-NP で免疫した場合においても効果が認められた。m8-NP により誘導される防御効果の主体は、液性免疫による可能性はないため、CD8 陽性細胞 (CTL) が主である細胞性免疫が関与していることが考えられる。また、I 型インターフェロン受容体 1 (IFN α 1) 欠損マウスを用いた J1 型の SFTSV の感染実験において、ファビピラビルの有用性を示した報告がある。しかし、J1 型以外に対する効果は示されていないことから、今後ファビピラビルの臨床応用を考えるうえで、J1 型以外のウイルスも用いて治療効果を検討する必要がある。

2. 研究の目的

IFN α 1 欠損マウスにおける SFTSV の N、GPC、N + GPC 遺伝子を発現する m8-SFTS の効果に CTL が関与しているかどうか明らかにする。また、ワクチンと治療薬の併用も視野に入れて、in vitro でファビピラビルが J1 型以外の遺伝子型にも効果があるか明らかにする。

3. 研究の方法

1) 細胞性免疫の関与について

IFN α 1 欠損マウスに N 発現、GPC 発現、N+GPC 発現 m8-SFTS を 2 週間隔で 2 回接種し、最終接種から 2 週間後に SFTSV を接種した。その後、抗マウス CD8 抗体を 250 μ g 腹腔内接種することで CD8 陽性細胞を除去し、細胞性免疫の影響を排除した状態で、細胞性免疫の影響を検証した。予備実験として、IFN α 1 欠損マウスに抗 CD8 抗体を投与し、CD8 陽性細胞が抑制されるか調べた。1 群 3 匹の IFN α 1 欠損マウスに抗 CD8 抗体とコントロール抗体をそれぞれ投与し、投与後 1、3 日目に脾細胞を採取し、この細胞を FACS で解析した。次に、IFN α 1 欠損マウスに上記 3 種類のワクチンを 2 週間隔で 2 回接種し、最終接種から 2 週間後に SFTSV を接種した。この際、ウイルス接種日を day0 とすると、day-1、day2、day5、day8 に抗 CD8 抗体とコントロール抗体を投与した。

2) 液性免疫の関与について

上記の 3 種類のワクチンと空ベクターを IFN α 1 欠損マウスに 2 回接種し、4 週間後に血清を採取、群ごとにプールし非働動化した。その血清を SFTSV 接種日とその前後の計 3 回投与し、経時的に体重と転帰、血清と脾臓のウイルス量を観察した。

3) In vitro でのファビピラビルの効果

臨床研究において実際に Favipiravir 投与後の死亡患者 3 名より治療開始前後に分離された 2 株 (計 6 株) (以下、耐性化試験) と、当研究所で保有している異なる遺伝子型を持つ SFTSV 計 12 臨床分離株 [日本型 (J1, J2, J3) と中国型 (C3, C4, C5)] を使用し (以下、遺伝子型試験) Favipiravir と Ribavirin (コントロール) の増殖抑制効果をウイルス減少法によって測定、IC₅₀ を算出した。

4. 研究成果

1) 細胞性免疫の関与について

予備実験では、CD8 陰性細胞と陽性細胞の比は 96:3.9 (1 日目) 99.2:0.8 (3 日目) であった。一方、コントロール抗体では、36.1:63.9 (1 日目) であった。このことから、抗 CD8 抗体投与群で CD8 陽性細胞が完全ではないが抑制されていることが明らかとなった。本実験では、全ての種類のワクチン間で、抗 CD8 抗体投与群とコントロール抗体投与群に体重や症状に差がみられなかった。このことから、CD8 陽性細胞がワクチンの効果に影響を与えていないことが明らかとなった。

2) 液性免疫の関与について

コントロール群に比べて m8-N+GPC 免疫マウス血清投与群免疫群は有意に体重減少が抑制されていた。m8-N と m8-GPC においても体重減少が抑制される傾向にあったが、統計学的に有意ではなかった。最終的な転帰はコントロール群を含めて死亡例がなかったことから、差はなかった。ウイルス量は血清が 3.78 log₁₀ copies/mL (m8-NP+GP) 5.35 log₁₀ copies/mL (m8-GP) 6.93 log₁₀ copies/mL (m8-N) 7.40 log₁₀ copies/mL (m8-EGFP) 脾臓が 2.57 log₁₀ copies/10⁷ -actin copies (m8-NP+GP) 5.06 log₁₀ copies/10⁷ -actin copies (m8-GP) 5.50 log₁₀ copies/10⁷

-actin copies (m8-N) $5.94 \log_{10} \text{copies}/10^7$ -actin copies (m8-EGFP) であり、血清に関しては、コントロール群に比べて m8-N+GPC 免疫マウス血清投与群免疫群で有意に低下した。

3) In vitro でのファビピラビルの効果

耐性化試験では、治療前後で IC_{90} に変化はなく、遺伝子型試験では、J1 型とその他の遺伝子型に差はみられなかった ($p < 0.05$, 下表)。これらの結果は全てファビピラビル用量依存的であった。死亡例における SFTSV のファビピラビルに対する耐性化は認められず、J1 型以外においてもファビピラビルは増殖抑制効果を示したことから、ファビピラビルは実臨床においても有望な治療薬であることが示唆された。ファビピラビルの濃度を増加させると、治療薬/コントロール (%) はシグモイドカーブにそって減少し、全ての遺伝子型の SFTSV を用量依存的に阻害した。また In vitro では、ファビピラビルはリバビリンより有効であった。

耐性化試験						
	患者A治療前	患者A治療後	患者B治療前	患者B治療後	患者C治療前	患者C治療後
Favipiravir	26.6	25.8	64.5	29.3	41.2	34.0
Ribavirin	65.3	72.5	55.8	79.6	87.5	68.5

遺伝子型試験												
	J1-1	J1-2	J1-4	J1-5	J1-6	J2	J3-1	J3-2	C3-1	C3-2	C4	C5
Favipiravir	22.8	29.9	20.3	30.1	14.8	14.8	26.2	34.2	38.7	25.5	36.5	21.5
Ribavirin	58.9	83.4	79.1	80.1	76.6	61.8	57.2	100.6	64.1	62.6	80.1	68.0

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 Yoshikawa Tomoki, Taniguchi Satoshi, Kato Hirofumi, I	4. 巻 17
2. 論文標題 A highly attenuated vaccinia virus strain LC16m8-based vaccine for severe fever with thrombocytopenia syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1008859	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 Kobayashi Yusuke, Kato Hirofumi, Yamagishi Takuya, Sh	4. 巻 26
2. 論文標題 Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Japan, 2013?2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 692 ~ 699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2604.191011	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤博史, 伊藤(高山)睦代, 佐藤正明, 木下一美, 下島昌幸, 福士秀悦, 吉河智城, 黒須剛, 中嶋希, 米納孝, 古田要介, 西條政幸
2. 発表標題 SFTS患者から分離された、遺伝子型の異なる重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルスに対するファビピラビル増殖抑制効果
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤博史, 佐藤正明, 伊藤(高山)睦代, 木下一美, 下島昌幸, 福士秀悦, 吉河智城, 黒須剛, 中嶋希, 米納孝, 古田要介, 安川正貴, 西條政幸
2. 発表標題 SFTSウイルス臨床分離株に対するファビピラビルのin vitro増殖抑制効果
3. 学会等名 第2回SFTS研究会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hirofumi Kato, Masayuki Saijo	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 246
3. 書名 Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------