

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450421

研究課題名(和文)CDV二価ワクチンとサイトカインアジュバントを用いたリーシュマニアワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of vaccines against leishmaniasis using polyvalent CDV vaccine and cytokine adjuvant.

研究代表者

佐藤 宏樹 (SATO, HIROKI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50418654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：リーシュマニア症は、WHOが定める6大疾患の一つであり、イヌを保虫宿主とするリーシュマニア原虫によって引き起こされる。しかしこれまで有効なワクチンは現在までに開発されていない。申請者らは、イヌジステンパーウイルス(CDV)をベースに、リーシュマニア抗原およびTh1誘導型サイトカインを発現する組換えCDVを作出し、これをイヌに免疫後にリーシュマニア原虫のチャレンジ試験を行った。その結果、リーシュマニア抗原発現CDV三種の混合接種によって著しいワクチン効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Leishmaniasis is one of the six major tropical diseases documented by WHO. Leishmaniasis is caused by infection with parasite protozoa Leishmania, and dogs harboring Leishmania act as reservoirs. There is presently no vaccine against leishmaniasis. We generated recombinant canine distemper viruses (rCDVs) that express Leishmania antigens or Th1 cytokine, and evaluated their protective efficacy against Leishmania challenge. As a result, the cocktail of three rCDVs expressing different antigens showed significant vaccine efficiency.

研究分野：ウイルス学

キーワード：イヌジステンパーウイルス リーシュマニア 二価ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

リーシュマニア症は、WHO が定める 6 大疾患の一つであり、リーシュマニア原虫によって引き起こされる。リーシュマニア症は、典型的な人獣共通感染症であり、流行地ではヒト以外に人家周辺の家畜や野生動物が保虫宿主（感染源）となって伝播サイクルが回っている。特に、都市型伝播様式のリーシュマニア症のケースでは保虫宿主は主にイヌであることから、イヌに対してリーシュマニア感染を予防することが非常に重要であると考えられている。しかし現在利用可能なワクチンがない為、サシチョウバエのイヌへの暴露を減らすことや、殺虫剤の使用による感染の防止などの対処療法で予防を図っているのが現状である。

これまでに、様々なリーシュマニア抗原がワクチンの候補として研究されており、それら抗原を用いた DNA ワクチンや経口ワクチン、経鼻ワクチンなどが数多く試験されているが、単体での使用による効果は限定的で実用的ではない。一方、複数の抗原を、融合蛋白の形で、またカクテルとして免疫することでワクチン能を増強することが知られている。

イヌジステンパーウイルス（CDV）は感染個体に終生免疫を賦与することが古くから知られており、弱毒生ワクチンによって非常によく抑制されてきた。しかし近年ワクチン接種を受けているにも関わらず発症し死亡するケースが多く報告され、新型強毒株の出現が示唆されている。申請者らは弱毒株である CDV-Yanaka 株を新たに分離し、この株をイヌに免疫することで近年流行強毒 CDV 株に対して完全防御を誘導することをこれまで示してきた（Takenaka et al., 2014）。さらに、Yanaka 株の全ゲノム配列を同定し、これを元に合成 DNA から組換えウイルスを作出する技術（リバースジェネティクス）を確立することに成功した（Fujita et al., 2007）。

この技術を元に、これまでに申請者らはリーシュマニア抗原の一つ LACK (*Leishmania* homologue for receptors of activated C kinase receptor) を発現する組換え CDV (rCDV-LACK) を作出し、これをイヌに免疫することによって皮膚型リーシュマニア原虫のチャレンジに対して効果を示すことを明らかにした。この LACK 免疫誘導は、これまでのリーシュマニアワクチン試験の中でも非常に高い有効性を示すものである。しかしながら、わずかながら原虫の増殖と結節の形成も確認され、rCDV-LACK によるリーシュマニア防御は完全ではなく、さらなる免疫効果の増強が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

近年、免疫効果を増進するためのサイトカインアジュバントの研究が大きく進展し、誘

導したい免疫応答の種類に応じて適切なサイトカインを用いることで、免疫反応を選択的に賦与できることが明らかになってきた。リーシュマニア感染症においては Th1 反応と IFN- $\gamma$  や TNF によって活性化されたマクロファージ細胞の微生物殺傷能力が重要であるが、反対に Th2 免疫反応が誘導されるとリーシュマニアの感染に寛容になることが判明している。

そこで本研究課題では、rCDV-LACK のリーシュマニアに対する防御能を増強するために、Th1 誘導サイトカインを発現する組換え CDV を作出し、rCDV-LACK 免疫時に併用することで、そのアジュバント効果を評価することを目的の一つとした。

また、これまでの報告から、リーシュマニアワクチンとして有用な抗原として LACK 蛋白以外のいくつかの候補蛋白が報告されている。特に、複数の抗原をカクテルで免疫することで効果の増強が見られることが報告されていることから、LACK 以外の抗原を発現する組換え CDV も新たに作出し、それらの使用も併せて検討し、最終的にこれまで不可能であった有効性の高いリーシュマニアワクチンの開発を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究を大きく 2 つに分け、以下のように遂行した。

(1) Th1 誘導能をもつイヌおよびマウスサイトカインをクローニングし、培養細胞で最適な生理活性を持つよう構築した蛋白発現系を確立した。さらに、これら遺伝子を CDV フルゲノム cDNA に挿入し、リバースジェネティクスを用いて組換え CDV を作出した。一方で、他のリーシュマニア抗原をクローニングし、同様の手法で組換え CDV を作出した。これら組換え CDV のサイトカイン発現能や抗原蛋白発現を含む in vitro での組換えウイルスの基本的性状解析を行なった。

(2) 組換えウイルスを用いた動物実験を行なった。マウス感受性リーシュマニアを用いてマウスによるワクチン試験を行ない、基礎的な免疫応答の解析を行なった。次にイヌに対するワクチン試験を行ない、皮膚型リーシュマニア原虫のチャレンジにより、最終的な抗リーシュマニア活性の評価をした。

## 4. 研究成果

(1) まずはじめに Th1 誘導能をもつ interleukin (IL)-12 および IL-18 の発現系の構築を試みた。ConA 刺激したイヌ抹消血の total RNA を用いて IL-18 および IL-12 p40 サブユニットのクローニングを行ったが、単量体で機能する優位性を考慮し IL-18 に焦点を絞り研究を進めた。IL-18 は前駆体の全長蛋白を発現しても細胞外へ分泌されず、成熟

型 IL-18 に他の分泌シグナル配列を付加することで細胞外へ分泌されることが知られており、イヌ IL-18 は IL12 p40 シグナル配列の付加によって分泌効率が上昇することが報告されている。そこで、哺乳類発現プラスミドに、全長 IL-18, IL-12 p40 シグナル配列付加 IL-18, および一般的に汎用されているヒト IL-2 シグナル配列付加 IL-18 (hIL2ss-cIL18) をそれぞれ挿入し、分泌効率を測定した。その結果、ヒト IL-2 シグナル配列が最も分泌効率が高いことが判明した。そこで、この組換え遺伝子を用いてイヌ IL18 を産生する組換え CDV の作出を試みた。hIL2ss-cIL18 遺伝子に CDV 転写ユニット配列を連結し、CDV ウイルスゲノム全長 cDNA の N 遺伝子と P 遺伝子の間に挿入した (図 1)。

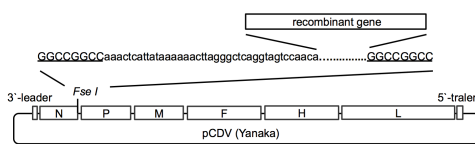


図 1 : 組換え CDV 作出のための CDV フルゲノムプラスミド模式図

この組換えウイルスゲノム cDNA をコードするプラスミドを用いて、常法に従ってリバーシジェネティクスを行った。その結果、組換え CDV (rCDV-hIL2ss-cIL18) の作出に成功した。このウイルス感染細胞からの IL-18 の分泌を同様に測定したところ、親 CDV および全長 IL-18 発現 CDV に比べて著しく IL-18 が分泌されることが確認された。そこで、マウス感受性リーシュマニアを用いたマウスモデル系での適用を考え、rCDV-hIL2ss-cIL18 と同様の構築を用いてマウス IL-18 を産生する組換え CDV (rCDV-hIL2ss-mIL18) も作出した。さらにこのウイルスの感染細胞から活性型マウス IL-18 が産生されることも確認した (図 2) (Liu et al., 2014)。

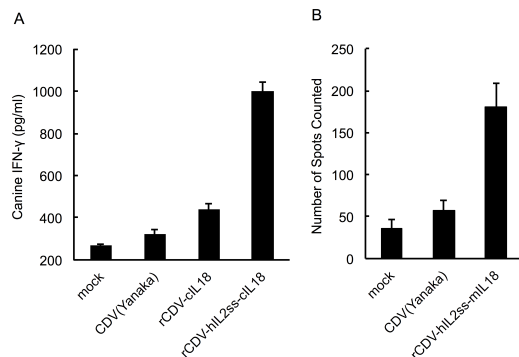


図 2 : 組換え CDV 感染細胞からの IL-18 産生の測定

一方、LACK 以外のリーシュマニア抗原として、TSA (*L. major* homologue of eukaryotic thiol-specific antioxidant) と LmSTI1 (*L. major* homologue of eukaryotic stress-inducible protein 1) を選択した。共にマウスモデル系において、IL-12 の共投与または DNA ワクチンによって防御免疫を示すことが報告されており、特に抗原のカクテル投与や、融合蛋白の形での免疫によって、単体投与に比べて効果が増強することが明らかになっている。皮膚型リーシュマニア原虫 (*L. major*) の total RNA から各遺伝子をクローニングし、上記と同様に CDV 転写ユニット配列を連結し、CDV ウイルスゲノム全長 cDNA の N 遺伝子と P 遺伝子の間に挿入し、常法に従ってリバーシジェネティクスを行った。その結果、組換え CDV (rCDV-TSA, rCDV-LmSTI1) の作出に成功した。これら組換えウイルス感染細胞で、組み込んだ抗原遺伝子から蛋白が産生されることを確認した (図 3)。

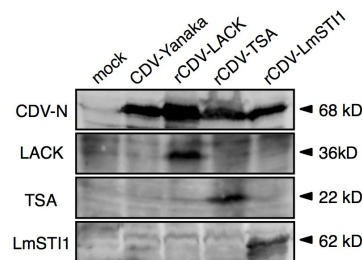


図 3 : 各リーシュマニア抗原組換え CDV からの抗原蛋白発現

(2) 得られた組換え CDV の中から、予備試験として、マウスを用いたリーシュマニア攻撃試験を行った。免疫としては PBS のみ、親 CDV、rCDV-LACK、rCDV-hIL2ss-mIL18、rCDV-LACK と rCDV-hIL2ss-mIL18 の共投与、の 5 群に分け、各群 8 匹ずつのマウスに 2 週間おきに計 3 回免疫した。PBS を除く全ての群で抗 CDV 抗体価の上昇を確認したため、初回免疫から 7 週後に *L. major* を尾上部に皮内接種し、結節サイズを 1 週ごとに測定した。その結果、当初の予想に反し、rCDV-LACK と rCDV-hIL2ss-mIL18 の共投与群において PBS 接種群と比較して明らかな結節サイズの拡大が見られ、症状が増悪することが判明した。そのため、rCDV-hIL2ss-cIL18 を用いたイヌでのチャレンジ試験の予定は変更し、すでにマウスで免疫効果が報告されている TSA, LmSTI1 の効果をイヌで評価することにした。免疫としては、PBS のみ、親 CDV、各リーシュマニア抗原発現組換え CDV 単体、および組換え CDV 3 種混合、の計 6 群に分け、各群 2 頭ずつの 5 週齢ビーグル犬に 2 週間おきに計 2 回免疫した。初回免疫から 6 週後に *L.*

major を耳に皮内接種してリーシュマニア攻撃試験を行った。

その結果、rCDV-LACK は結節サイズの抑制が見られたが、新たに作出した rCDV-TSA, rCDV-LmST11 は PBS および親 CDV と同等の結節サイズを示し、単体では抗リーシュマニア効果を示さなかった。一方、三種混合接種群では著しい皮膚結節の抑制がみられ、rCDV-LACK 単体投与に比べても明らかな結節のサイズの減少が見られた。特に、rCDV-LACK 単体では結節の抑制効果の一方で結節が消失するまでの期間の遅延がみられたが、三種混合接種では明らかな治癒期間の短縮も見られた(図4)。チャレンジ10週後では rCDV-LACK 単体免疫群ではリーシュマニア原虫接種部位と耳下リンパ節で原虫が検出されたが、三種混合接種群では原虫は検出されなかった。

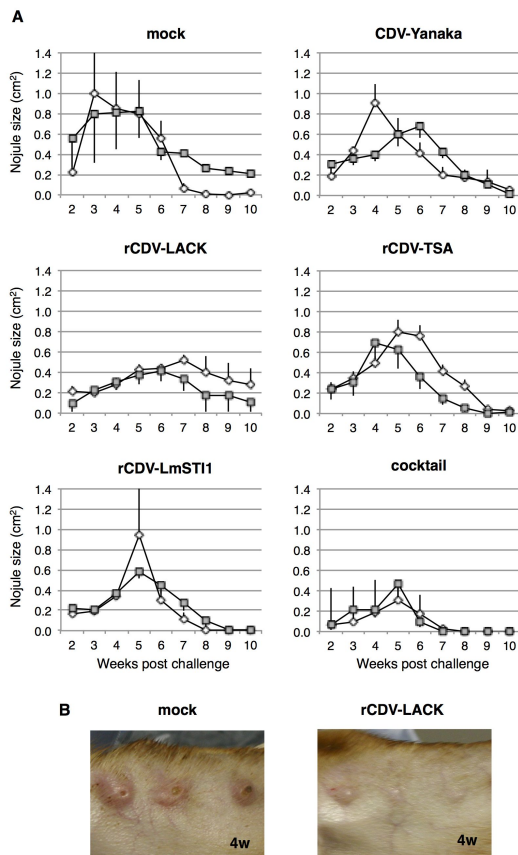


図4 A : 各組換え CDV 免疫後のリーシュマニアチャレンジ後の皮膚結節サイズ測定  
B : チャレンジ4週後の結節の写真

これらの結果から、イヌ皮膚型リーシュマニア症に対して、リーシュマニア抗原発現組換え CDV 三種の混合接種が最もワクチン効果を示すことが明らかになった (Miura et al., 2015)。

元来 CDV は、都市部において飼い犬へのワクチン接種が一般的であり、弱毒生ワクチンとして使用されている CDV を用いた二価ワクチンの開発は、特に都市伝播型リーシュマニアの抑制に最も適した方法であると考えられ、今回の結果は研究成果の社会還元観点からも極めて有用であると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Miura R, Kooriyama T, Yoneda M, Takenaka A, Doki M, Goto Y, Sanjoba C, Endo Y, Fujiyuki T, Sugai A, Tsukiyama-Kohara K, Matsumoto Y, Sato H, Kai C. Efficacy of recombinant distemper virus expressing Leishmania Antigen against Leishmania challenge in dogs. PLoS Negl Trop Dis 9(7): e003914, 2015. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pntd.0003914.

Liu Y, Sato H, Hamana M, Moonan NA, Yoneda M, Xia X, Kai C. Construction of an expression system for bioactive IL-18 and generation of recombinant canine distemper virus expressing IL-18. J Vet Med Sci. 76(9):1241-8, 2014. 査読有  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/76/9/76\\_14-0181/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/76/9/76_14-0181/_article)

Takenaka A, Yoneda M, Seki T, Uema M, Kooriyama T, Nishi T, Fujita K, Miura R, Tsukiyama-Kohara K, Sato H, Kai C. Characterization of two recent Japanese field isolates of canine distemper virus and examination of the avirulent strain utility as an attenuated vaccine. Vet Microbiol. 174(3-4):372-81, 2014. 査読有  
doi: 10.1016/j.vetmic.2014.10.024.

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 宏樹 (SATO HIROKI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 : 50418654