

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450432

研究課題名(和文)ネオスポラ症における垂直感染阻止経口投与型ワクチンに関する研究

研究課題名(英文)Study of oral vaccine prevent from neosporosis

研究代表者

池 和憲 (Ike, Kazunori)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：50159597

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)：ネオスポラ症に対するワクチンの作出を、抗原を発現させた藻類クラミドモナスを経口投与することによって行った。クラミドモナスに腸管粘膜付着因子LT-BとNeospora caninumの表面抗原NcSAG1もしくはNcBAG1を共発現させた。蛋白発現クラミドモナスは加熱不活化後、約 5×10^6 /mLに調整した。ワクチンはマウスに0.5mLを週2回のペースで経口投与を行い、尾静脈からの採血を毎週行ない、血清抗体価を測定した。その結果、抗体は初回投与から3週目に認められ、継続して抗体産生を行った。このことから藻類クラミドモナスの経口は有用なワクチン候補であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The vaccine for neosporosis was developed using alga Chlamydomonas reinhardtii expressed with Neospora caninum surface antigens. *C. reinhardtii* cells were co-expressed with both Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit (LT-B) and *N. caninum* surface antigen, NcSAG1 or NcBAG1. The *C. reinhardtii* suspensions were inactivated with heating 56 °C for 15 min, and prepared on concentration 5×10^6 /mL as the vaccines. The vaccines were orally inoculated by needle with 0.5 mL/head twice a week. The mice were bled from a caudal vein every week, and antibodies were measured by ELISA. The antibodies were appeared from 3 week after inoculation, and so on. These results suggested that vaccine using alga *C. reinhardtii* was useful for antibody production by oral.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：Neospora caninum ネオスポラ症 ワクチン 経口投与 アジュバント 腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

Neospora caninum は 1984 年に脳脊髄炎および筋炎を発症した犬の組織から分離され (Bjerkas *et al.* 1984)、その後新種として記載されたアピコンプレックス類に属する病原性細胞内寄生原虫である (Dubey *et al.* 1988)。本原虫は犬、牛、緬・山羊など広範囲の宿主で感染が認められるが、終宿主はオーストの排泄から犬であることが判明し (McAllister *et al.* 1998)。自然界ではココロテなどを含むイヌ科動物を終宿主、イヌ科動物を含む他動物を中間宿主として生活環が成立している。本原虫による臨床症状を伴った疾病は主として犬と牛において見られるが、発症を起因する原虫ステージは中間宿主としてのタキゾイトとブラディゾイトである。そして本原虫性疾患における伝播上の最大の特徴は、垂直感染による伝播が主経路となることである。

牛における本症は母牛での死・流産、および新生子牛における神経症状、後駆の進行性過伸展による泌乳および起立の不能である (Dubey *et al.* 1989)。日本でも 1992 年の初報告 (Ogino *et al.* 1992) 以来、全国各地でその発生が報告され、牛の流産の主要な原因となり (Koiwai *et al.* 2006)、本症に対する予防・治療法の確立が強く求められている。一方、犬においては死・流産の報告は少なく (Lindsay and Dubey 2000)、疾病としては先天感染した子犬の進行性後駆麻痺、筋肉衰退、摂食および嚥下困難である (Barber and Trees 1996)。

牛および犬いずれの場合にも、本症伝播で特に問題となるのは、非妊娠時の原虫感染による宿主体内での増殖 (タキゾイト) と分布 (シスト形成) とそれに続く、妊娠時の原虫感染による、あるいは妊娠等の刺激が誘因となるシスト内原虫ブラディゾイトの再活性による、タキゾイトの垂直伝播で、ワクチンを開発する上でこれらの抑制が重要である。

これまでの我々の研究はタキゾイトの細胞内侵入には約 73kDa の虫体抗原が関与することを単クローン性抗体を用いて証明し、ワクチン抗原として有用であることを報告した (Uchida *et al.* 2004)。この抗原は後に Zhang ら (2007) によって報告された NcAMA1 であった。さらにワクチン開発に必須の実験動物としてマウスよりもジャンガリアンハムスターが感受性において優っていること (Uchida *et al.* 2003) として原虫感染に対する免疫を人為的に Th1 に誘導させる免疫賦活物質としてゴーヤ綿抽出物 (Ike *et al.* 2005) およびエリンギ加熱抽出物 (Ike *et al.* 2012) が優れていることを報告し、ワクチン化への準備を進めてきた。さらにグレーハウンド犬における先天性ネオスポラ症の症例を経験するに至り (Ishigaki *et al.* 2012) ワクチンの重要性を再認識した。

2. 研究の目的

これまでネオスポラ症のワクチン研究に用いられてきた抗原はタキゾイト由来抗原が主となり、いくつかの効果的な抗原が報告されている。一方、我々は効果的なブラディゾイト由来抗原の存在を検証するため、ブラディゾイト由来 NcBAG1 遺伝子のクローニングを行い、その組換え蛋白を得た (Kobayashi *et al.* 2013; GenBank ID: AB475042)。さらに平成 22~24 年度科研費補助金の資金提供を受け、垂直伝播のメカニズム解析に用いるべくタキゾイトステージで緑色に、ブラディゾイトステージで赤色に蛍光発色する原虫を作製した (Hatano *et al.* in preparation)。本蛍光原虫を用いた垂直伝播に関する研究から、直接垂直伝播に関わる原虫ステージはタキゾイトであること、そして垂直伝播に対する免疫には液性免疫である Th2 が有効である成績を得た。

一方、水平感染におけるマウス脳内原虫観察では、脳内での遊離のインターメディアートゾイト (タキゾイトとブラディゾイトの中間体) がブラディゾイト (シスト) と共に多数認められることを見出した。そこで NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, NcSAG4 の 4 種類のブラディゾイト由来抗原を用いた水平感染マウスモデルにおける細胞性免疫 (Th1) 誘導型注射剤ワクチン試験から、NcBSR4 を除く NcBAG1, NcMAG1, NcSAG4 は脳内原虫数の有意な低下をもたらすことを示し (Uchida *et al.* 2013)、さらにブラディゾイト抗原中、最も効果的であった NcBAG1 と既知の NcSAG1 (タキゾイト由来抗原) の混合ワクチンはマウスにおける脳内原虫数を減少させることでその混合効果を示した (Nagashima *et al.* in preparation)。このことは細胞性免疫である Th1 型免疫応答を利用して「非妊娠時の原虫感染による宿主体内での増殖と分布」の課題をクリアしたことを示している。

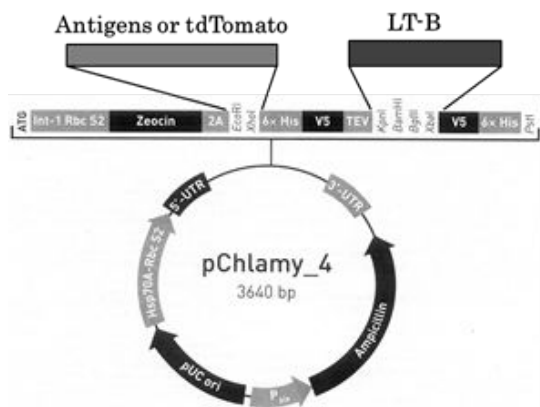
ネオスポラ症ワクチン開発で残された課題は、「妊娠時の原虫感染による、あるいは妊娠等の刺激が誘因となるシスト内原虫の再活性による垂直伝播」に対する対策で、このワクチンに求められるのは、Th2 型免疫の長期誘導能と妊娠期間中の接種ゆへの安全性である。鶏ロイコチトゾーン症ワクチンではオイルワクチン投与後にジャガイモ発現抗原の経口投与により安全に血中抗体価が維持されることが明らかになっている (Ito *et al.* 2013)。そこで本研究では、この報告を参考に上記 2 条件を満たすべく将来、植物での発現も念頭に置きながら、経口投与型ワクチンの開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) 発現遺伝子ベクターの構築

クラミドモナスの発現ベクターである pChlamy_4 において付着因子である LT-B お

よび蛍光蛋白 tdTomato や GFP、さらに *N. caninum* 表面蛋白であるタキゾイト抗原 NcSAG1 およびブラディゾイト抗原 NcBAG1 のクローニングを行った。組合せとしては LT-B + tdTomato or GFP、さらに LT-B + NcSAG1、LT-B + NcBAG1 で行った

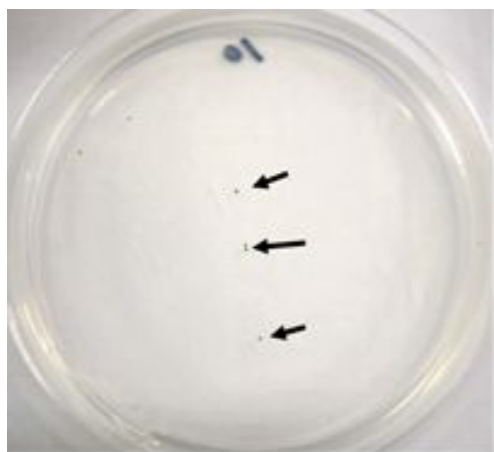


(2) 人工遺伝子によるコドンの最適化

LT-B、tdTomato、GFP、NcSAG1、および NcBAG1 に関してはクラミドモナスをターゲットとしたコドン最適化による人工遺伝子を作製（ファスマックに依頼）し、(1)と同様に発現ベクターの構築を行った。

(3) クラミドモナスへの遺伝子導入

新鮮培養クラミドモナスは GeneArt MAX efficiency transformation reagent (Invitrogen) での処理によりコンピテント細胞とした。コンピテント細胞への遺伝子導入は Gene Pulser II (Bio-Rad) にて 4mm ギャップ・キュベットを用い、500V、50μF、800Ω の条件下でエレクトロポレーションを行った。遺伝子導入処理された細胞は 40μM ショ糖を含む TAP 培地で一夜、26 で保温後、Zeocin を含む TAP 寒天培地で 26、7~10 日培養し、発育したコロニーを Zeocin 含有 TAP 液体培地にて培養し、各遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR にて遺伝子の挿入を確認した。



(4) クラミドモナスにおける蛋白発現

クラミドモナスにおける蛋白発現は、26 の明照下で、Zeocin を含む TAP 液体培地で各遺伝子挿入クラミドモナスの連続培養を行い、蛋白発現はクラミドモナス虫体を超音波破碎後に SDS-PAGE にて確認した。

(5) 粘膜炎因子 LT-B の腸管粘膜細胞への附着性

ラプテックチャンバースライドにてヒト腸管粘膜細胞である HT-29 細胞を培養した。供試物として LT-B + tdTomato または LT-B + GFP を、対照として tdTomato または GFP のみを発現させたクラミドモナスをそれぞれ HT-29 細胞に接種し、37 で 60 分感作させた後、0.02% Tween20 を加えた PBS で 3 回洗浄し、乾燥後、蛍光顕微鏡下での鏡検を行ない、tdTomato または GFP の発色にて腸管粘膜細胞への附着性を確認した。

(6) クラミドモナスの不活化

培養したクラミドモナスは 56 の恒温槽で、0、5、10、15、20、30、40、50、および 60 分感作させた。感作細胞は各感作時間後、TAP 寒天培地に塗抹し、7 日間 26 で培養し、その生死を判定した。

(7) 経口投与実験

蛋白発現したクラミドモナスは 56、15 分加熱することで不活化した。その後、細胞を約 5×10^6 /mL に調整し、その 0.5mL を経口投与用ゾンデにて週に 2 回のペースでマウスに経口投与した。その評価は毎週尾静脈から部分採血し、血清抗体価の測定を行い、評価した。

4. 研究成果

(1) 発現遺伝子ベクターの構築とコドン最適化による効果

LT-B + GFP、LT-B + tdTomato、LT-B + NcSAG1、および LT-B + NcBAG1 の組合せで、オリジナル配列の遺伝子とコドンの最適化した配列の遺伝子をそれぞれ用いて発現遺伝子ベクターを構築した。それぞれのベクターをクラミドモナスへ遺伝子導入した蛋白発現クラミドモナスを作製した。

蛍光発色蛋白の発現において、tdTomato はオリジナルの配列でもコドン最適化した配列いずれも発現したが、必ずしも良好ではなかった。一方、GFP は特にコドン最適化した配列を用いた場合、良好な発現を示した。

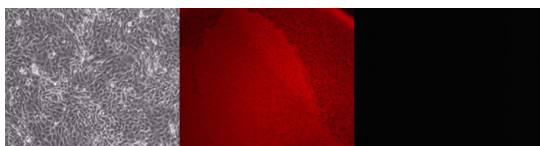
LT-B はコドン最適化した配列にて特に良好な蛋白発現を示した。

NcSAG1 および NcBAG1 ではコドン最適化した配列で良好な発現を示したが、オリジナルの配列と明確な差は確認できなかった。

これらのことは原核生物由来の配列はコドン最適化した方が良好な発現を示す傾向があると思われた。

(2) 腸管付着因子 (LT-B) の付着性

LT-B + tdTomato および LT-B + GFP を発現させたクラミドモナスの付着性をヒト腸管粘膜細胞である HT-29 細胞を用いて蛍光顕微鏡下で観察した。その結果 tdTomato および GFP のみを発現したクラミドモナスに比べ、LT-B を共発現したクラミドモナスは明確な蛍光が観察され、腸管粘膜細胞への付着性が確認された。



明視野 陽性 (Red) 陰性

(3) クラミドモナスの不活化

クラミドモナスを 56 の恒温槽で、0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, および 60 分感作させ、TAP 寒天培地上でのコロニー生育にてその生残を検討した。

その結果、クラミドモナスは 56、15 分で不活化できることが判明した。

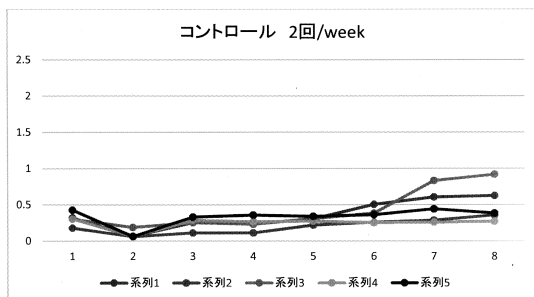
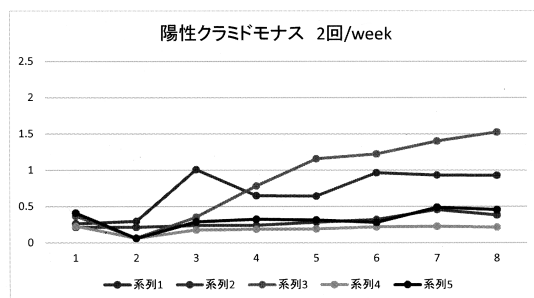
経時的なクラミドモナスの生残

| 分 | 時 間 | | | | | | | | |
|----|-----|---|----|----|----|----|----|----|----|
| | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 生死 | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

+ : 生残 - : 死滅

(4) 経口投与による血中抗体価

不活化クラミドモナスを約 5×10^6 /mL に調整後、その 0.5mL を週 2 回マウスへ経口投与を行った。その後、毎週マウス尾静脈より採血を行い、NcSAG1 を抗原とした ELISA により血中抗体の測定を行った。



その結果、投与群マウスは投与後 3 週目より抗体が検出されたが、対照群は抗体では

ほとんど抗体は検出されなかった。このことから、抗原発現クラミドモナスの経口投与によって血中抗体 (IgG クラス) が有意に上昇することが明らかになり、ワクチンとして十分な効果を発揮することが示唆された。

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 5 件)

Jinhua Dong, Takahiro Otsuki, Tatsuya Kato, Tetsuya Kohsaka, Kazunori Ike, and Enoch Y. Park. Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and application on the detection of neosporosis. PlosOne 査読有, 8, e53264 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0053264.

Masaki Uchida, Kotomi Nagashima, Yui Akatsuka, Akira Ito, Soichi Imai, and Kazunori Ike. Comparative study of protective abilities of NcBAG1, NcBSR4, NcMAG1, and NcSAG4 antigens against *Neospora caninum* infection in acute mouse model. Parasitology Research 査読有, 112, 655-663 (2013). doi: 10.1007/s00436-012-3182-5.

Tetsuya Kobayashi, Sayuri Narabu, Yuka Yanai, Yuka Hatano, Akira Ito, Soichi Imai, and Kazunori Ike. Gene cloning and characterization of the protein encoded by the *Neospora caninum* bradyzoite-specific antigen gene *BAG1*. Journal of Parasitology 査読有, 99, 453-458 (2013). doi: <http://dx.doi.org/10.1645/12-65.1>.

Tatsuya Kato, Takahiro Otsuki, Mai Yoshimoto, Kohei Itagaki, Tetsuya Kohsaka, Yumino Matsumoto, Kazunori Ike, Enoch Y. Park. *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus displaying *Neospora caninum* antigens as a vaccine candidate against *N. caninum* infection in mice. Molecular Biotechnology 査読有, 57, 145-154 (2015). doi:10.1007/s12033-014-9810-9

Mai Yoshimoto, Takahiro Otsuki, Kohei Itagaki, Tatsuya Kato, Tetsuya Kohsaka, Yumino Matsumoto, Kazunori Ike, Enoch Y. Park. Evaluation of recombinant *Neospora caninum* antigens purified from silkworm larvae for the protection of *N. caninum* infection in mice. Journal of Bioscience and Bioengineering 査読有, 120, 715-719 (2015). doi:10.1016/j.jbiosc.2015.04.002

〔学会発表〕(計 2 件)

赤塚 唯、栗原佑生子、松本裕美乃、吉岡邦晃、伊藤 亮、池 和憲 . *Neospora caninum* 垂直感染に対するタキゾイト由来 SAG1 およびブラディゾイト由来 BAG1 抗原のマウスモデルにおける防御試験 . 第 156 回日本獣医学会、2013 年 9 月 21 日 . 岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

松本裕美乃・坂川 遥・野尻紗矢・下戸裕太郎・小牧 陽・池 和憲 . *Neospora caninum* 感染におけるスナネズミモデルの検証 . 第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日 . 北海道大学 (北海道・札幌市).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

池 和憲 (KAZUNORI IKE)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号 : 50159597