

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670225

研究課題名(和文)自然免疫活性化機構を利用した新規ウイルスベクターの作製

研究課題名(英文)Novel viral vector by using activation of innate immune responses

研究代表者

保富 康宏 (YASUTOMI, YASUHIRO)

独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・センター長

研究者番号：90281724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(HPIV2)は呼吸器粘膜への抗原伝達ベクターとしての効果を検討した。このベクターのMタンパクを欠損させ、非複製型とし、結核菌抗原を挿入したところ結核菌に対し防御効果を示した。我々は同様に感染に必要なレセプター分子であるHN欠損HPIV2も作製した。以上のことから、HPIV2は呼吸器粘膜を介した新たな粘膜免疫誘導型ワクチンベクターとなり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：We assessed the effectiveness of a novel mucosal vaccine using recombinant human parainfluenza type 2 virus (rHPIV2) as a vaccine vector. rHPIV2 showed the expression of inserted Ag in respiratory epithelial cells. M gene eliminated rHPIV2, which is replication-incompetent, incorporated cDNA of Ag85B gene from Mycobacterium bovis (rHPIV2-Ag85B) elicited Ag85B-specific immune responses. Moreover, rHPIV2-Ag85B showed protective effects against M. tuberculosis infection. We also constructed HN protein, which is receptor molecule to infection with respiratory epithelial cell, deleted rHPIV2. These findings provide evidence for the possibility of rHPIV2 as a novel mucosal vaccine vector.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫 ワクチン 感染症 ウイルスベクター 結核

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスベクターは免疫原性や安全性の観点から、実用化されているものの多くが、遺伝子の一部を欠損させる等によって自己複製能を欠いた組換え体である。HN タンパクはヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) の上皮細胞への感染レセプターである。HN 遺伝子欠損ウイルスは HN 遺伝子組み込み細胞のみにおいて HN 発現 HPIV2 となり、生体での感染の場合は感染・複製は行われるが HN タンパクが無いために 2 次感染は伴わない。M タンパク欠損においては粘膜免疫誘導型の結核ワクチンを開発した (Vaccine 2014)。これは他のウイルスベクターと同様に一部の遺伝子 (M 遺伝子) を欠損させることにより生体内での自己複製能を消失させたものである。このベクターは完全に複製しないことからワクチンベクターとしてアジュバント活性が低いと考えられている。HN 遺伝子を欠損させることで、感染・複製は正常に行われ、自然免疫誘導 (アジュバント活性) が野生型と同様のワクチンベクターが開発されると考えられる。

### 2. 研究の目的

ワクチンとして利用されるウイルスベクターは、病原性が無く、自己増殖能も欠損しているといった安全性が必要である。しかしながら自己増殖能を完全に欠損させたウイルスベクターではベクターウイルスの複製に伴う自然免疫反応によるアジュバント活性が低いと感がられている。本研究ではウイルス複製は完全にお行われるが、2 次感染をしない安全かつ感染局所における免疫反応を効果的に誘導するベクターの確立を目指す。ベクターにはヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) を用い、これに結核抗原を組み込んだ結核ワクチンを作製し、既存のベクターよりも有用性の高いワクチンベクターの確立を目指し、臨床応用可能な知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

1) HN タンパク欠損 HPIV2 の作製: リバースジェネティック法により HN タンパク遺伝子欠損 HPIV2 を作製した。  
2) GFP および結核抗原遺伝子挿入 HPIV2 の作製: NP 遺伝子の N 末側 NotI サイトに GFP 遺伝子、結核遺伝子 (CRL2) および Ag85B を HN 欠損 HPIV2 に挿入したりコンビナント HPIV2 を作製した。発現は RT-PCR および蛍光抗体にて確認した

### 4. 研究成果

CRL2 を組み込んだ 2 株のウイルス (76、91) が作製され RT-PCR での発現が確認された (Fig. 1)

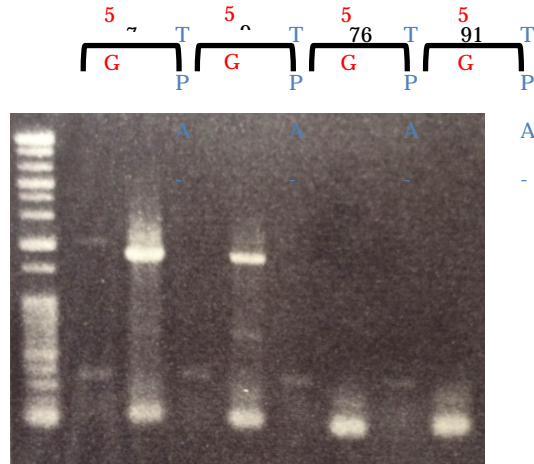


Fig. 1 RT-PCR による発現確認

またタンパクによる発現は蛍光抗体にて確認された。

### 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 17 件)

- 1) Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. Vaccine 2014;32:1727-1735.
- 2) Wada T, Kohara M, Yasutomi Y. DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. Vaccine 2013;31:5968-5974.
- 3) Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y., Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine

- in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. *PLoS One*. 2013 8(7): e66614
- 4) Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. *Differentiation*. 2013 85:131-139.
  - 5) Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y, Aonuma K. Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013, 27:413-424.
  - 6) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*. 2013 Jun;94(Pt 6):1318-24.
  - 7) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Arch Virol*. 2013,158:1209-20.
  - 8) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother*. 20139(2) 283-290.
  - 9) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect*. 2013 5:56-65.
  - 10) Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park EJ., Fujihashi K., Briles DE., Yasutomi Y, Tsukada H., Akiyoshi K. and Kiyono H. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunology* 2015 E-pub
  - 11) Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A $\beta$  pathology in brain accompanied by enhanced GA $\beta$  generation in nonhuman primates *PLoS One in press*
  - 12) Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2

- and Tfh responses to the coadministered antigen J. Immunol. 2015 *in press*
- 13) Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2014;111;3086-3091.
  - 14) Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. PLoS One 2014;9: E-pub
  - 15) Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. Mol Ther. Nucleic Acids 2014:E-pub
  - 16) Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y. Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. J.Am.Heart Assoc. 2014 E-pub
  - 17) Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y. Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, Plasmodium vivax and Plasmodium cynomolgi. Parasitol. Int. 2014 E-pub

{学会発表}(計12件)

- 1) Watanabe K, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with

- recombinant vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed mycobacteria-specific immunity. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
- 2) TSUJIMURA Yusuke, YASUTOMI Yasuhiro. The recognition mechanisms of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, in vivo 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
  - 3) 加藤誠一 保富康宏 松尾和浩. BCGウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチン第3回感染症若手フォーラム 長崎 2014
  - 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズウイルスの霊長類カニクイザルにおける細胞性免疫反応の解析第61回日本ウイルス学会 神戸 2013年11月10日-12日
  - 5) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 産地別SPFカニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルスのエイズ病態に関する研究第27回日本エイズ学会 熊本 2013年11月20 - 22日
  - 6) 保富康宏 インフルエンザウイルス感染におけるヘルパーT細胞(Th)の病態への関与 「シンポジウム: もっと効くインフルエンザワクチンを目指して」第54回日本臨床ウイルス学会 2013年6月8-9日 倉敷
  - 7) 保富康宏 教育講演: 「ワクチン開発のストラテジー: HIVワクチン・結核ワクチン開発の経験から」ワクチン開発に必要な研究を取り巻く環境の重要性 第17回日本ワクチン学会 2013年11月30日-12月1日 津
  - 8) 加藤 誠一、岡村 智崇、張 陰峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松

尾 和浩、保富 康宏 BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価第62回 日本ウイルス学会学術集会 2014年 11月10日～12日パシフィコ横浜 会議センター

- 9) Tsujimura Yusuke, Yasutomi Yasuhiro :  
Suppressive effect of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to innate immune response is depending on the interaction with RIG-I. 第43回日本免疫学会総会 2014年 12月10日～12月12日、京都国際会議場
- 10) 藤城(伊藤)康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系としてのカニクイザルMSCを用いた細胞標識の解析。第61回日本実験動物学会学術総会。2014年5月15-17日。北海道、札幌市
- 11) 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：新規実験動物としての *Tupaia Belangeri* の飼育および繁殖について 第157回日本獣医学会学術集会 平成26年9月9日～9月12日 北海道、札幌
- 12) 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：C型肝炎ウイルスに対する DNA ワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いた Prime/Boost 法による肝炎ウイルス特異的免疫賦活化効果の検討 第18回日本ワクチン学会学術集会 平成26年12月6日～12月7日 福岡国際会議場

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

名称：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.yasutomi-group.jp/>  
6. 研究組織

(1)研究代表者  
保富 康宏 (YASUTOMI YASUHIRO)  
独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・センター長  
研究者番号：90281724

(2)研究分担者  
渡邊 健太 (WATANABE KENTA)  
山口大学・共同獣医学部・助教  
研究者番号：20582208