

令和元年6月21日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08044

研究課題名(和文) 子宮粘膜を刺激するインターフェロンを用いた経膈免疫法の研究

研究課題名(英文) Development of an intrauterine vaccination method using interferon to stimulate uterine mucosal tissues

研究代表者

彦野 弘一 (Hikono, Hirokazu)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：60355146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：経胎盤感染は家畜感染症において重要な位置を占めている。しかし、既存のワクチン手法は、経胎盤感染を効果的に阻止できない。本研究では、牛ウイルス性下痢(Bovine Viral Diarrhea: BVD)ウイルスをモデルとして、経胎盤感染を阻止できるワクチン手法を検討した。

BVDウイルスの感染防御抗原であるE2タンパク質を大腸菌にて発現し、抗BVDウイルス抗体を定量するためのELISA系を構築した。子宮粘膜組織を活性化するインターフェロンタウ(IFN-t)をアジュバントとし、不活化BVDウイルスとともにマウスの子宮または腹腔内に投与した。しかし、両群の血清中に抗E2抗体は検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家畜におけるウイルスの経胎盤感染は、しばしば流産・早産を引き起こすことにより、家畜生産の安定に大きな影響を及ぼす。本研究においては、子宮粘膜を刺激する物質と共に、ワクチンをマウスの子宮内に投与することにより、ウイルスの経胎盤感染を効果的に防ぐ新しいワクチン手法を開発することを試みた。しかし、良好な結果は得られなかった。家畜におけるウイルスの経胎盤感染を効果的に防ぐワクチン手法の開発は、家畜生産の安定に大きく寄与すると共に、ジカウイルス感染症など、人の経胎盤感染を伴う新興再興感染症に対するワクチン開発に新たな視点をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Vertical transmission plays an important role in animal infectious diseases by viruses such as Bovine Viral Diarrhea (BVD) virus. However, conventional vaccination methods do not effectively prevent vertical transmission of viruses. In this study, we used BVD virus as a model to develop a novel vaccination method to prevent vertical transmission of viruses.

E2 protein, which is a protective antigen of BVD virus, was produced in Escherichia coli. Using this recombinant protein, ELISA was built to measure anti-E2 antibody. Inactivated BVD virus was injected into peritoneal or uterine cavity of mice with interferon-tau as an adjuvant to stimulate uterine mucosal tissues. However, anti-E2 antibody was not detected in serum in both groups.

研究分野：獣医免疫学

キーワード：ワクチン ウイルス アジュバント 感染防御 胎盤 子宮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

経胎盤(子宮内)感染は、牛ウイルス性下痢(BVD)や馬鼻肺炎などの感染環において重要な位置を占めている。BVDにおいては、BVDウイルスが母牛から胎子に経胎盤感染すると、子牛はBVDウイルスを持続的かつ大量に排泄する持続性感染牛となり、感染源となる。しかし、既存のワクチンはBVDウイルスの経胎盤感染を阻止できない。

経胎盤感染を阻止するためには、子宮粘膜において強力な免疫応答を起こす必要がある。しかし、粘膜組織における免疫応答は、ワクチンの投与経路に大きな影響を受ける。通常のワクチンのように筋肉内や皮下に投与した場合、粘膜に免疫細胞が分布しないため、粘膜感染症に対する防御免疫を付与しない。一方、粘膜を介してワクチンを投与した場合、その粘膜に免疫細胞が分布し、粘膜感染症に対する防御免疫を付与する。そのため、子宮粘膜に免疫応答を起こすためには、子宮粘膜(実用的には膣粘膜)を介してワクチンを投与することが必要であると考えられる(Stary et al., Science 2015;348(6241):aaa8205)。しかし、現時点で実用化されている粘膜ワクチンのほとんどは生ワクチン(自己複製能が弱められた病原体)であり、病原性復帰やワクチン株の伝播など安全性に不安がある。

一方、不活化ワクチン(自己複製能のない病原体)は安全性が高いものの、免疫原性が低く、粘膜に投与しても免疫応答を起こさない。そのため、しばしば粘膜における免疫応答を増強させるアジュバントを必要とする。申請者は、鶏の高病原性鳥インフルエンザに対する点眼不活化ワクチンの研究において、コレラトキシンやCpGオリゴヌクレオチド等の既存の粘膜アジュバントは効果がないことを示した(Hikono et al. Vet Immunol Immunopathol. 2013;151(1-2):83-9)。このことから、不活化ワクチンを経膣投与することにより子宮粘膜に免疫応答を起こすためには、投与経路に適したアジュバントが必要であることが推察される。

インターフェロンタウ(IFN-t)は1型IFNのひとつであり、反芻動物の胎子の栄養膜細胞により産生され、母体の子宮内膜上皮細胞に作用してエストロゲン受容体やオキシトシン受容体の発現を抑え、プロスタグランジンF2の産生を抑える。また、IFN-tは他の1型IFNと同様に、signal transducer and activator of transcription (STAT)やinterferon regulatory factor (IRF)などの免疫応答に関わる細胞内シグナル伝達系を活性化することから、子宮内膜上皮細胞とともに、子宮粘膜組織内のT細胞、B細胞、樹状細胞などにも作用して、獲得免疫応答を増強するアジュバント活性を示すことが期待できる。

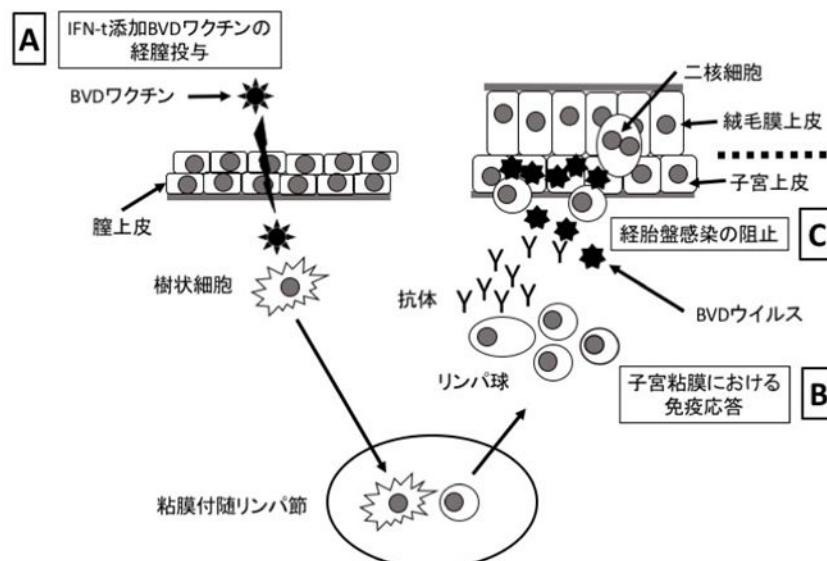
2. 研究の目的

本研究においては、経胎盤感染を阻止できる粘膜免疫応答の特徴を調べる。BVDウイルスの感染をモデルとして、IFN-tとともに不活化BVDウイルスをマウスまたはウサギに経膣投与し、子宮粘膜に誘導される液性および細胞性免疫応答を解析する。さらに、上記のワクチン手法にて免疫した妊娠ウサギをBVDウイルスにて攻撃し、経胎盤感染の阻止を検証する。

以上の研究により、IFN-tを添加した不活化BVDウイルスを経膣投与することにより誘導される粘膜免疫応答の特徴を明らかにする。さらに、上記の経膣免疫法により誘導された粘膜免疫応答が、BVDウイルスの経胎盤感染を阻止することができるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究においては、BVDウイルスの感染をモデルとして、経胎盤感染を阻止できる粘膜免疫応答の特徴を調べることを計画した。IFN-tとともに不活化BVDウイルスをマウスまたはウサギに経膣投与し(下図A)、子宮粘膜に誘導される液性および細胞性免疫応答を解析する(下図B)。さらに、上記ワクチン手法にて免疫した妊娠ウサギをBVDウイルスにて攻撃し、経胎盤感染の阻止を検証する(下図C)。



(1) 遺伝子組換え BVD ウイルス E2 タンパク質の発現

BVD ウイルスの感染防御抗原である E2 タンパク質を大腸菌にて発現した。BVD ウイルス Nose 株の E2 タンパク質をコードする cDNA から、疎水性の高い 3' 領域をコードする cDNA を除き、N 末端側に 6x ヒスチジンタグ、C 末端側に 8x ヒスチジンタグをコードする DNA を付加し、大腸菌に導入した。遺伝子組換え E2 タンパク質の発現を、抗 E2 ウサギ血清(筑波大学 竹内薫 博士より分与)を用いてウエスタンブロット解析した。

(2) 遺伝子組換え E2 抗原を用いた ELISA 系の検討

BVD ウイルスに対する抗体を定量するために、遺伝子組換え E2 タンパク質を抗原とする ELISA 系を検討した。遺伝子組換え E2 タンパク質を炭酸バッファー (pH9.6) で 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、ELISA 用マイクロプレート (MaxiSorp、Thermo Fisher Scientific、MA、US) に 100 μl ずつ加え 4 時間で一晚静置した。200 μl の 0.05% Tween 20 含 PBS (PBS-T) で 4 回洗浄した後、ブロッキング液 (1% Bovine serum albumin (BSA) 含 PBS-T) を 100 μl ずつ加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間保温した。PBS-T で 4 回洗浄した後、被検サンプルとして市販の不活化 BVD ワクチンで免疫して作製されたマウス抗血清をブロッキング液にて 200 倍希釈した 10 μl ずつ各 2 ウェルに加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間保温した。PBS-T で 5 回洗浄した後、検出抗体として HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体 (Bio-Rad) HRP 標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA、USA) もしくは HRP 標識ヤギ抗マウス IgG2a 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) をブロッキング液にて 20000 倍希釈したものを 100 μl ずつ加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間保温した。PBS-T で 5 回洗浄した後、クエン酸リン酸バッファー (pH5.0) で 1.0 mg/mL となるように希釈した発色基質 o-Phenylenediamine (OPD; Thermo Fisher Scientific) を 100 μl ずつ加え、暗所で室温 30 分間静置した。100 μl の 2.5M 硫酸を加えて反応を停止させ、1420ARVO MX Perkin Elmer、Waltham、MA、USA) で 490 nm の吸光度を測定した。

(3) 経膣 (子宮内) 免疫法による免疫応答の誘導の検討

Balb/c マウス (6 週齢) を 5 群に分け、IFN-t (10^3 U/g) を添加した不活化ウイルス (20 ul/head) を、2 週間隔で 2 回子宮または腹腔内に投与した。最終投与から 2 週間後に頸椎脱臼により安楽死し、採材した。血清と子宮乳剤に含まれる E2 タンパク質特異的抗体を、ELISA を用いて定量し、液性免疫応答を評価した。

	ワクチン	投与場所	頭数
1 群	IFN-t 添加不活化 BVD ウイルス	子宮	5
2 群	不活化 BVD ウイルス	子宮	5
3 群	IFN-t 添加不活化 BVD ウイルス	腹腔	5
4 群	不活化 BVD ウイルス	腹腔	5
5 群	なし	なし	5

4 . 研究成果

(1) 遺伝子組換え BVD ウイルス E2 タンパク質の発現

E2 タンパク質をコードする cDNA を導入した大腸菌において、およそ 35 kDa の分子量を示すタンパク質の発現が見られた (図 1 左)。このタンパク質は、抗 E2 ウサギ血清に反応した (図 1 右)。これらの結果から、大腸菌にて抗原性を保持する遺伝子組換え E2 タンパク質を発現できたことが示された。

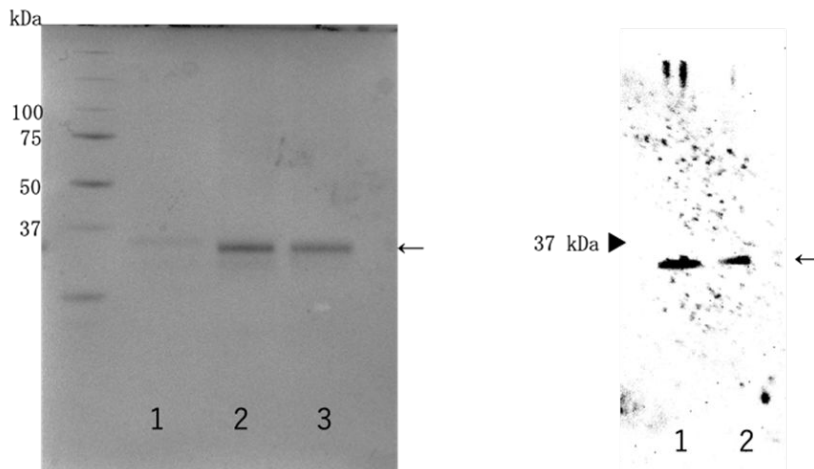


図 1. 遺伝子組換え BVD ウイルス E2 タンパク質の発現。(左)遺伝子組換え E2 タンパク質の SDS-PAGE 解析。レーン 1: His タグ精製後の E2 タンパク質; レーン 2: 遺伝子組換え E2 タンパク質 (ロット 1); レーン 3: 遺伝子組換え E2 タンパク質 (ロット 2)。(右) 遺伝子組換え E2 タ

ンパク質のウエスタンブロット解析。レーン 1：遺伝子組換え E2 タンパク質(ロット 1)；レーン 2：遺伝子組換え E2 タンパク質(ロット 2)。矢印は遺伝子組換え E2 タンパク質、左端の数字は分子量マーカーを示す。

(2) 遺伝子組換え E2 抗原を用いた ELISA 系の検討

市販の不活化 BVD ワクチンを免疫してマウス血清を作成し、そこに含まれる抗 E2 抗体を、遺伝子組換え E2 タンパク質を抗原とする間接 ELISA を用いて検出した。その結果、市販の不活化 BVD ワクチンを 1 回および 2 回免疫した血清において有意な吸光度の上昇が見られたことから、本間接 ELISA が血清中の抗 E2 抗体を検出できることが示唆された(図 2)。

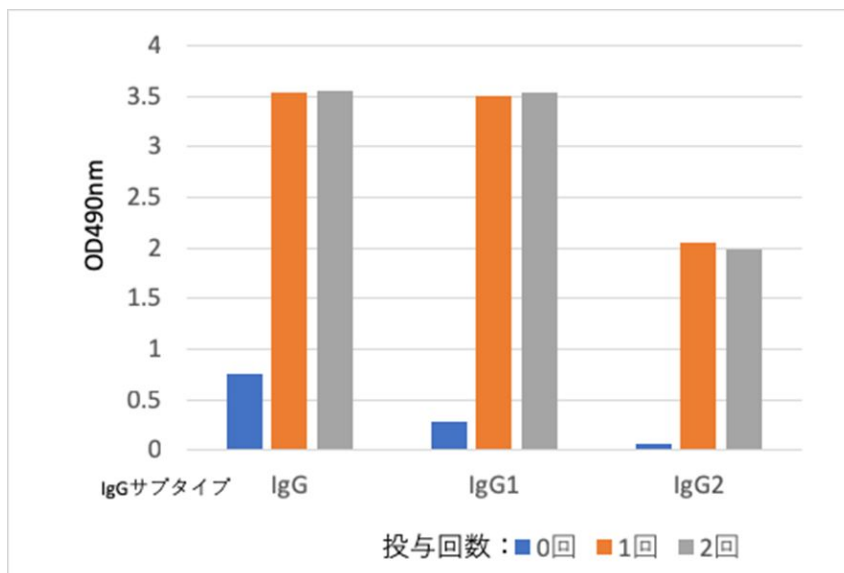


図 2. 市販不活化 BVD ワクチンを免疫したマウス血清に含まれる抗 E2 抗体の検出。遺伝子組換え E2 タンパク質を抗原とする間接 ELISA を用いて、市販不活化 BVD ワクチンを免疫したマウス血清に含まれる抗 E2 抗体を検出した。各棒は 490 nm における吸光度を示す。

(3) 経膣 (子宮内) 免疫法による免疫応答の誘導の検討

子宮粘膜組織を活性化するインターフェロントウ (IFN-t) をアジュバントとし、不活化 BVD ウイルスとともにマウスの子宮または腹腔内に投与した。しかし、両群の血清中に抗 E2 抗体は検出されなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：村上 賢二

ローマ字氏名：Murakami Kenji

研究協力者氏名：竹内 薫

ローマ字氏名：Takeuchi Kaoru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。