

令和元年6月16日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09957

研究課題名(和文) CD8陽性細胞による非細胞傷害的ウイルス排除機序の解析

研究課題名(英文) To investigate the mechanism of non-cell lytic CD8 positive cells

研究代表者

宮崎 恭行 (MIYAZAKI, Yasuyuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：70607233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチンにより誘導される免疫のうち、細胞性免疫は細胞傷害性T細胞(CTL)と呼ばれるCD8陽性T細胞(CD8+細胞)による感染細胞の殺傷であることが知られている。一方、ウイルスを排除する非細胞傷害性CD8+細胞の存在を示唆する報告が様々なウイルス感染症において報告されているものの、この非細胞傷害性CD8+細胞のウイルス抗原排除の作用機序についてはほとんど分かっていない。デングウイルス由来の遺伝子を有する組み換えワクシニアウイルス(rVV)の作製を行った。rVVのマウスへの接種実験を行い、本研究の目的であるCD8+細胞のうちインターフェロン γ を産生する細胞の誘導が行われることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、社会的な脅威となるようなウイルス(デングウイルスやインフルエンザウイルス、HIV-1など)に対して有効なワクチンが存在しない。これらのウイルスに対して、弱毒化した生ワクチンや不活化ワクチン、DNAワクチンなど様々なシステムで効果的な免疫を付与する試みがなされている。例えばデングウイルスで知られているようにCTLは時に炎症性サイトカインの分泌により、却って病態を重篤化させることがある。非細胞傷害性CD8+細胞はそのような副作用を回避しつつ、組織を傷つけずウイルスを排除できる可能性を持っている。このように、ワクチンにより付与される免疫について深く理解をすることは非常に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been known that the function of CD8+ cells activated by vaccine is killing infected cells, so called CTL. Contrary to that, CD8+ cells also has been revealed the non-cell lytic function in various viral infection. However, the underlying mechanism is little known. In this study, we try to assess the mechanism of non-cell lytic CD8+ cell to work. Live attenuated vaccinia virus is selected as a vaccine vector due to the strong CD8+ cell activation ability. Recombinant vaccinia virus inserted dengue viral genes (rVV) were generated as a tool. The rVV was inoculated to mice intradermally. CD8+ cells inoculated rVV having dengue viral genes exhibited the interferon gamma response.

研究分野：ウイルス

キーワード：ウイルス 細胞性免疫

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

1. 研究開始当初の背景

現在、社会的な脅威となるようなウイルス（ Dengueウイルスやインフルエンザウイルス、 HIV-1 など）に対して有効なワクチンが存在しない。これらのウイルスに対して、弱毒化した生ワクチンや不活化ワクチン、 DNA ワクチンなど様々なシステムで効果的な免疫を付与する試みがなされている。ワクチンにより付与される免疫について深く理解することはワクチン開発においても非常に有用であると考えられる。

ウイルス感染症に対して、宿主は様々な免疫システムを誘導し、ウイルスから体を守る。免疫は大きく自然免疫と適応免疫に分かれているが、ワクチンでは主に適応免疫誘導を目指したものが主流である。適応免疫はさらに液性免疫（抗体）と細胞性免疫に大きく分類される。細胞性免疫の実態は細胞傷害性 T 細胞（CTL）と呼ばれる感染細胞の殺傷する活性を有する CD8+細胞による効果であると考えられている。この CTL による感染細胞への攻撃は感染宿主からウイルス増殖の抑制に大きく寄与していることはよく知られている（図 1a）。一方、ウイルス排除に関わる非細胞傷害性 CD8+細胞の存在はヒト免疫不全ウイルスや単純ヘルペスウイルス、 B 型肝炎ウイルスなど様々なウイルス感染症で知られている（図 1b）。これらはそれぞれ異なる細胞種を標的としており、普遍的な獲得免疫機構として注目されるべきである。

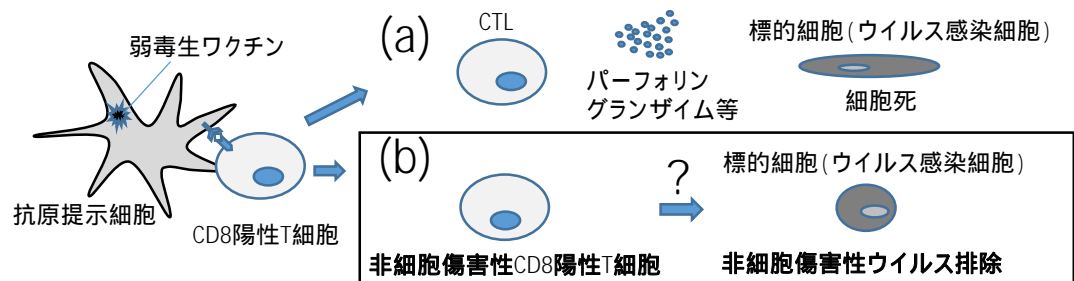


図1 生ワクチン等で誘導される細胞性免疫の模式図

本研究では黒枠で囲ったCD8陽性T細胞の非細胞傷害性ウイルス排除機構について研究を行う。

2. 研究の目的

DNA ワクチンや生ワクチンなどの細胞性免疫を誘導するようなワクチンにおいて、活性化された抗原特異的な CD8+細胞による効果のうち、非細胞傷害性 CD8+細胞による効果がどのくらいであるかはほとんど分かっていない。インターフェロン (IFN- γ)及び腫瘍壊死因子 (TNF- α)によりその活性が誘導されること、またプロテアソーム阻害剤(MG132)によりその効果が阻害されたことから、プロテアソームによりウイルス蛋白質分解が行われていることが分かっているだけである。この非細胞傷害性 CD8+細胞の効果的な誘導が可能になれば、組織を傷つけることなく、ウイルスを排除することが可能となり、より安全で効果的なワクチン開発に繋がると期待できる。これまで、

3. 研究の方法

(1) Dengueウイルスは全世界では年間約 1 億人が Dengue熱を発症し、約 25 万人が Dengue出血熱を発症すると推定されているが、有効な治療法が存在しない。このような社会的状況を鑑みて、Dengueウイルス由来の遺伝子を有する組み換えワクシニアウイルス (rVV) の作製を優先して行った。

(2) デングウイルスはヒトには感染するものの、野生型のマウスではほとんど増殖しない。このため、デングウイルスがよく増殖し、且つワクチンによる免疫応答を十分に付与することを目的としたマクロファージ(単球を含む)特異的なI型インターフェロン受容体ノックアウトマウスの導入を行った。

(3) バイオアッセイに有用な nanoluc 発光を利用したタグ付きデングウイルスの分子クローンの作製を行った。

(4) rVV のマウス接種実験を行った。

4. 研究成果

(1) 鶏胚線維芽細胞にワクシニアウイルスを感染させ、さらにデングウイルス遺伝子群を有するプラスミドをトランスフェクションする。相同組み換えによりデングウイルス由来遺伝子を有する rVV を選別し、大量培養した。しかし、rVV に組み込まれたデングウイルス遺伝子は非常に不安定で、しばしば、欠損を引き起こした。このことから、rVV を用いた組み換えワクチンの実用化には導入した遺伝子欠損に対する対策が必要であると考えられる。

(2) Cre-loxP システムを用いた組織特異的遺伝子ノックアウト法を用い、デングウイルスが増殖できる遺伝子改変マウスを作製した。マクロファージ細胞特異的にI型インターフェロンレセプターを欠損させるため、II型リソソームプロモーターをLoxP遺伝子で挟んだマウスとCre遺伝子を持つ遺伝子を掛け合わせた。II型リソソームは主にマクロファージで発現する遺伝子であるため、マクロファージ特異的にI型インターフェロン受容体のノックアウトマウスが作製できた。

(3) デングウイルスの分子クローン作製は大腸菌内で変異を引き起こしやすく、その分子クローンの作製は困難なことで有名であった。我々はデングウイルスの分子クローンを作製するにあたり、3本のPCRフラグメントを哺乳類細胞株に同時に導入し、細胞内での相同組み換えを利用し、作製した。その際、非常に短いnanoluc発光に利用可能なタグをデングウイルスの構造タンパク質であるCタンパク質のN末端に挿入したウイルスを作製した。このウイルスは、野生型ウイルスに比べ、わずかに増殖力が落ちるものの、発光により、容易にウイルス増殖が観察出来た。また、nanoLuc発光の値とフォーカスフォーミングユニットの値は高い相同性を示した。この組み換えデングウイルスを利用することにより、通常1週間程度必要で、且つ多くの手間を必要としてきたアッセイが、30分程度に短縮できた。

(4) rVVのマウスへの接種実験では、細胞性免疫の指標であるインターフェロン反応の再現性が低く、さらなる解析が困難であった。rVVの効果的な免疫誘導には皮内接種をする必要があるが、技術的な習熟が必要であり、結果がばらつく原因であると考えられる。今後は皮内接種の技術的な困難を乗り越える新しい機器や手法の開発が望まれると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hishiki T, Kato F, Nio Y, Watanabe S, Wen Tan NW, Yamane D, Miyazaki Y, Lin CC, Suzuki R, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Hijikata M, Vasudevan SG, Takasaki T. Stearoyl-CoA desaturase-1 is required for flavivirus RNA replication.. Antiviral Res. 査読有り 2019 May;165:42-46. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.03.002.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

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。