

平成 22 年 2 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2010  
課題番号：19590604  
研究課題名（和文）組換えウエストナイルウイルス E 蛋白質による CTL 誘導性ワクチンの基礎的研究  
研究課題名（英文）Fundamental research for development of CTL-inducible vaccine using recombinant West Nile virus E protein  
研究代表者  
正木 秀幸（MASAKI HIDEYUKI）  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：90247982

研究代表者の専門分野：免疫学  
科研費の分科・細目：社会医学・衛生学  
キーワード：ウエストナイルウイルス・E 蛋白質・成分ワクチン・組換えワクチン・CTL・cross-presentation・中和抗体・感染防御

#### 1. 研究計画の概要

ウエストナイルウイルス(WNV)は、フラビウイルス属に属する蚊媒介性のヒト感染性ウイルスであり、その感染により高齢者層を中心に死亡率が4から14%におよぶ脳炎・髄膜炎を発症させる。自然界においては鳥と蚊によって感染環が成立し維持されているが、広い宿主域を持ち、米国東海岸での最初の患者の報告から僅か5年余りで北米大陸全域で発症例が報告されるようになったことから、一旦ウイルスの侵入を許せば、その根絶はほぼ不可能であり、現在の国際間の交通事情や来るべき高齢化社会を考えれば、その対策は急務である。WNV 感染に対して抗ウイルス薬は無く、ワクチン接種による感染予防が最も効果的と考えられており、現在種々のワクチンの開発が進められているが、未だヒト用の実用ワクチンは存在していない。近縁の日本脳炎ウイルスに対する現行ワクチン(不活化ワクチン)による知見より、ウイルス構造蛋白である E 蛋白が中和抗体を誘導することが知られているが、不活化ワクチンや成分ワクチンはその性質上、生ワクチンや DNA ワクチンと異なって CTL は誘導されない。本研究では、昆虫細胞発現系により大量発現させた組換え WNV E 蛋白を、大阪大学の明石 満らにより開発された cross-presentation を誘導する比較的安全なアジュバントである -polyglutamic acid (-PGA)で encapsulate したものをワクチン候補としてマウスに免疫することにより、生ワクチン同様に中和抗体のみならず CTL も誘導するのか、また現行の家畜用不

活化ワクチンよりもより効率的に WNV 感染に対して防御するのか等について中心に検討を行い、安全かつ効果的な WNV 組換え成分ワクチンの開発に向けた基礎的研究を行う。

#### 2. 研究の進捗状況

現時点までは、昆虫細胞による組換え WNV E 蛋白の大量発現系を確立するために、以下の2点を行った。

(1) バキュロウイルス発現系による組換え WNV E 蛋白の作成

WNV(NY99-6922 株)由来の PrM と E 蛋白質の cDNA が入ったプラスミド(pcWNVME)より、PrM の最終 45 塩基から E の 1290 塩基(E 蛋白質 N 末端側 80%相当部)および C 末端側に His tag 配列を組み込んだ primer を設計して PCR 法により同部を増幅、ドナープラスミド pFastBac1 の Bam HI および Xho I サイトに導入して組換えドナープラスミド(pFastBac1-WN80E)を構築した。この組換えドナープラスミド pFastBac1-WN80E を、bacmid を内在する大腸菌株 DH10Bac に transfect させることにより transposition を起こさせて組換え bacmid(Bac/WE80E)を得た。組換え bacmid Bac/WE80E を、Sf9 細胞株に transfect させて組換えバキュロウイルス(Bac.WN)を作成した。この組換えバキュロウイルス Bac.WN を感染させた Sf9 細胞もしくは High Five 細胞の細胞内および培養上清中には、目的とする組換え WNV E 蛋白が発現されていること、さらにこの蛋白質は WNV E 蛋白の抗原性を保持していることを、Western blot および ELISA にて確認した。現在、Bac.WN

を感染させた High Five 細胞を大量培養し、その培養上清より Ni キレートクロマトグラフィー・イオン交換クロマトグラフィー・ゲル濾過を用いて組換え WNVE 蛋白を精製中である。

(2) Drosophila 発現系による組換え WNVE 蛋白の作成

(1) とほぼ同様の手法で増幅した WNVE の E 蛋白質 N 末端側 80% 相当部遺伝子 (E の 1 から 1218 番目の塩基) を、発現ベクター pMT/Bip/V5-His A の Bgl I と Xho サイトに導入した組換え発現プラスミド pMT/Bip-WNE と hygromycin-B 耐性プラスミド pCoHygro を、S2 細胞に co-transfect して hygromycin-B で選択することにより stable transfectant S2.WN を樹立した。この stable transfectant S2.WN を硫酸銅添加により誘導を掛けると、培養上清中に目的とする組換え WNVE 蛋白が分泌されること、さらにこの蛋白質は WNVE 蛋白の抗原性を保持していることを、Western blot および ELISA にて確認した。現在、S2.WN 細胞を大量培養し、その培養上清より Ni キレートクロマトグラフィー・イオン交換クロマトグラフィー・ゲル濾過を用いて組換え WNVE 蛋白を精製中である。

3. 現在までの達成度  
遅れている。

(理由) 初年度の後半に、construct の作成を行っていた研究協力者である大学院生が、長期病欠の上に中退したこと、さらに次年度に construct の作成に協力していた別の研究協力者が所属している大学 (他学) が遺伝子組換え実験不正により実験停止処分になったため。いずれも想定外であった。

4. 今後の研究の推進方策

(1) -PGA nano particle の作製と免疫精製した組換え WNVE 蛋白を -PGA で encapsulate することにより、組換え WNVE 蛋白質を含んだ nano particle を作製する。-PGA と nano particle 作製の技術は研究協力者である阪大薬学部の中川晋作より提供される。作成した nano particle を C57/BL6 マウス (H-2<sup>b</sup>) に免疫し、経時的に血清と脾細胞を採取する。(E 蛋白質単独免疫群、他のアジュバントを用いた E 蛋白質免疫群、-PGA のみによる免疫群等をコントロールとして置く。)

(2) 液性免疫誘導の検討

血清については、ウエスタンブロットや ELISA (IgG・IgM) により抗 WNVE 抗体の誘導やその抗体価を測定する。抗原は、大腸菌発現系にて発現させた別の tag を持つ組換え WNVE 蛋白を用いる。中和抗体価は、vero 細胞を用いた 90% プラーク減少法により測定する。

(3) 細胞性免疫誘導の検討

脾細胞については、組換え WNVE 蛋白や不活化 WNVE 粒子に対する特異的増殖反応 (チミジン取込) や IFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$  等のサイトカイン産生 (ELISA・ELISPOT) により細胞性免疫反応の誘導を評価する。さらに、免疫磁気ビーズ法により脾細胞を CD4 T 細胞と CD8 T 細胞に精製し、それぞれについて同様の評価を行う。CD8 T 細胞については、80% E 蛋白質の全長にわたる 5 アミノ酸残基 overlapping の 15-mer ペプチド library を作成した上で、それぞれに対する IFN- $\gamma$  産生を ELISPOT で測定することにより CTL エピトープを決定する。抗クラス抗体による阻害実験により、各エピトープペプチドの MHC 拘束性を検討。その上でエピトープペプチド / クラス (H-2<sup>b</sup>) テトラマー結合 CD8 陽性細胞の誘導を検討する。エピトープペプチドで pulse した target 細胞 (EL-4 (H-2<sup>b</sup>)) や pcWNME を導入した EL-4、また WNVE を感染させた EL-4 に対する killing 活性を Cr-releasing assay により測定し、CTL としての property を検討する。

(4) ワクチン効果の検討

組換え WNVE 蛋白 -PGA nano particle で免疫された C57/BL6 マウスを WNVE で challenge し、morbidity や survival をモニターすることにより、組換え WNVE 蛋白 -PGA nano particle のワクチン効果を検討する。また、抗 NS1 抗体価や各臓器の WNVE の copy 数を real time PCR をモニターすることにより、sterile immunity の誘導についても検討する。(E 蛋白質単独免疫群、他のアジュバントを用いた E 蛋白質免疫群、-PGA のみによる免疫群や現行の家畜用不活化ワクチン等をコントロールとして置く。)

以上の生 WNVE を取り扱う実験については、研究協力者である国立感染研の倉根一郎・高崎智彦らに依頼する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

現時点では未だ無し。