

機関番号：34419

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）Basic research for development of CTL-inducible vaccine against West Nile virus using recombinant 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

研究成果の概要（和文）：ウエストナイルウイルス(WNV)は、時に致死性の脳炎・髄膜炎を発症させるヒト感染性ウイルスであるが、未だヒト用の実用ワクチンは存在しない。近縁のウイルスで得られた知見より、エンベロープ(E)蛋白が防御免疫を誘導するものと期待されている。本研究においては、組換え WNV E 蛋白と cross-presentation 誘導性アジュバントとの組み合わせによる、中和抗体のみならず CTL も誘導する組換え成分ワクチンの開発を目的として、数種類の WNV E 蛋白質発現系を確立し、また CTL の標的細胞を樹立した。

研究成果の概要（英文）：West Nile virus (WNV) is the human-infectious virus, which sometimes causes lethal encephalitis / meningitis, and the vaccine for human use has not been developed yet. Based on the findings concerning its relative viruses, it is anticipated that the envelope (E) protein should induce protective immunity. In the present study, we have established several recombinant WNV E protein expression systems and the CTL target cells in order to develop the recombinant component vaccine against WNV infection, which induces not only neutralizing antibody but also CTL, using recombinant WNV E protein combined with cross-presentation inducing adjuvant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

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日本脳炎ウイルス(JEV)に近縁の蚊媒介性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%におよぶ重篤な脳炎・髄膜炎を時に発症させる。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、このウイルスは広い宿主域を持ち、本来このウイルスが存在しないとされていた北米において、ニューヨーク市での最初の患者の報告から僅か5年余りにて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、我国において

もその根絶はほぼ不可能と思われ、また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未だ無く、従って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試みられているが、未だヒト用の実用ワクチンは存在していない。近縁の JEV に対する現行ワクチン（不活化全粒子ワクチン）に関する研究で得られた知見よれば、フラビウイルス属のウイルスに対する感染防御免疫を誘導する主体となるウイルス構造蛋白はエンベロープ(E)蛋白質であり、この部分に中和抗体エпитープが存在することが知られている。

ウイルス感染に対する防御免疫としては、中和抗体による宿主細胞への感染阻止と、細胞傷害性T細胞(CTL)によるウイルス感染細胞の破壊が主要なものと考えられている。後者のCTLについては、それが自己MHCクラスI分子と主に細胞質内で合成された蛋白質由来するペプチドとの複合体を認識することから、ウイルスが細胞に感染することにより、そのウイルス蛋白質が細胞質内で合成される生ワクチンやDNAワクチン接種時においては効率的に誘導されるものの、ウイルス蛋白質が細胞質内で合成され得ない不活化ワクチンや成分ワクチン接種時においては、中和抗体の誘導のみに止まると考えられてきた。しかしながら近年、ある条件下では、本来はCTLを誘導し得ないと考えられて来た不活化ワクチン等の外来性の蛋白質抗原であっても、MHCクラスI分子と外来性の蛋白質抗原由来するペプチドの複合体が形成され、CTLが誘導される cross-presentation とよばれる現象が目されるようになってきた。

以上の知見を基に、防御免疫を誘導するWNVのE蛋白質とcross-presentationを誘導するアジュバントを組み合わせることにより、成分ワクチンながら、中和抗体のみならずCTLをも誘導する、効率的かつ安全なWNVワクチンの基礎的開発研究を計画した。

## 2. 研究の目的

以上の背景を基として本研究では、昆虫細胞発現系により大量発現させた組み換えWNV E蛋白質を、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C57/BL6マウス(H-2<sup>b</sup>)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WNV不活化全粒子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組み換え成分ワクチンの開発に向けた基礎的研究を行う。以上の研究により、組み換えWNV E蛋白質の免疫により有意な中和抗体の誘導と感染防御能が誘導され、とりわけcross-presentation誘導免疫においてCTLの誘導と感染防御能の増強が確認されるならば、強毒性に変異する危険が常在する生ワクチンや宿主ゲノムにrandom integrationの恐れがあるDNAワクチンに比べてより安全で、さらに現行の組織培養由来JEV不活化全粒子ワクチンの改良と実用WNVワクチンの開発につながる有意義な知見となることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) バキュロウイルス発現系による組み換えWNV E蛋白質の作成

連携研究者である神戸大学の小西英二より供与された、WNV(NY99-6922株)由来のPrMとE蛋白質のcDNAが入ったプラスミド(pcWNME)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BamHおよびXho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bacmidBac/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、Hisタグを保持する目的とする組換えWNV E蛋白質(prM(last 15AA)-WNVE(N80%)-His)が発現されていること、さらにこの蛋白質はWNV E蛋白質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。Bac.WNを感染させたHigh Five細胞を大量培養して、その培養上清および感染細胞を採取して可溶化、超遠心もしくは限外濾過によりバキュロウイルスが除去できることを確認したうえで、Niキレートクロマトグラフィー(His Trap HP)・イオン交換クロマトグラフィー(HiTrap Q HP)・ゲル濾過(HiLoad 16/60 Superdex 200)を用いて組換えWNV E蛋白質を精製した。

### (2) Drosophila 発現系による組み換えWNV E蛋白質の作成

(1)と同様の手法で増幅したWNV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 His タグを保持する（バキュロウイルス発現系によるものとは若干異なった）目的とする組換え WNV E 蛋白 (Bip-WNVE(N80%)-V5-His) が分泌されること、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、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 (His Trap HP) ・イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap Q HP) ・ゲル濾過 (HiLoad 16/60 Superdex 200) を用いて組換え WNV E 蛋白を精製した。

#### (3) 大腸菌発現系による組換え WNV E 蛋白の作成

上述の昆虫細胞発現系により作成された組換え WNV E 蛋白に共通して含まれる His タグに対する免疫反応を除外するために、His タグとは異なる GST (Glutathione S Transferase) タグを保持する組換え WNV E 蛋白を作成するために、pMT/Bip-WNE より制限酵素 Bgl と Xho により WNV E 蛋白質遺伝子部分を切り出し、大腸菌発現ベクター pGEX-6P-2 の BamH および Xho サイトに導入して組換え発現プラスミド pGEX-WNE を作成した。pGEX-WNE を大腸菌に導入し IPTG 誘導を掛けることにより、目的の組換え WNV E 蛋白 (GST-WNVE(N80%)) が不溶性封入体分画として発現されることを確認した。GST-WNV E(N80%) が発現された大腸菌を溶菌して封入体を精製し 8 M 尿素により変性可溶化、その後緩やかに尿素を取り除くことにより re-holding させ、Glutathione Sepharose 4B を用いてアフィニティー精製を行った。

#### (4) WNV E 蛋白遺伝子導入 EL-4 細胞の作成

-PGA で encapsulate した組み換え WNV E 蛋白の C57/BL6 マウス (H-2<sup>b</sup>) の免疫による CTL の誘導および標的細胞として用いるために、Celfectin 2000 により pcWNME を EL-4 細胞 (H-2<sup>b</sup>) に transfection して G418 により選択を掛けることにより、WNV E 蛋白遺伝子導入・安定発現株の作成を試み、6 種類の transfectant line (EL-4/0.2WNME、EL-4/0.4WNME、EL-4/0.5WNME、EL-4/0.6WNME、EL-4/0.8WNME、EL-4/1.0WNME) を樹立した。

## 4. 研究成果

### (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

Sf9 細胞もしくは High Five 細胞に感染することにより、目的とする組換え WNV E 蛋白

(prM(last 15AA)-WNVE(N80%)-His) を産生する組換えバキュロウイルス (Bac.WN) を確立し、かつこの蛋白質 (分子量 48.8kD) が WNV E 蛋白の抗原性を保持していることを確認した (図 1、図 3、および表 1)。Bac.WN を感染させた High Five 細胞の培養上清より、Ni キレートクロマトグラフィー (His Trap HP) ・イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap Q HP) ・ゲル濾過 (HiLoad 16/60 Superdex 200) を用いて prM(last 15AA)-WNVE(N80%)-His を精製することができた。以上により、この蛋白を cross-presentation 誘導性アジュバントである -PGA で encapsulate して CTL 誘導性ワクチンを作成し、マウスに免疫実験を行う準備が整った。

### (2) Drosophila 発現系による組換え WNV E 蛋白の作成

硫酸銅添加により、(バキュロウイルス発現系によるものとは異なった) 目的とする組換え WNV E 蛋白 (Bip-WNVE(N80%)-V5-His) を産生・分泌する stable transfectant S2.WN を樹立し、かつこの蛋白質 (分子量 49.3kD) が WNV E 蛋白の抗原性を保持していることを確認した (図 1、図 3、および表 1)。S2.WN を、硫酸銅を添加した無血清培地で大量攪拌培養を行った培養上清より、Ni キレートクロマトグラフィー (His Trap HP) ・イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap Q HP) ・ゲル濾過 (HiLoad 16/60 Superdex 200) を用いて Bip-WNVE(N80%)-V5-His を精製することができた (図 2)。以上により、この蛋白を cross-presentation 誘導性アジュバントである -PGA で encapsulate して CTL 誘導性ワクチンを作成し、マウスに免疫実験を行う準備が整った。

### (3) 大腸菌発現系による組換え WNV E 蛋白の作成

ワクチン作成用の組換え WNV E 蛋白に共通して含まれる His タグに対する免疫反応を除外するために、His タグとは異なるタグを保持する組換え WNV E 蛋白を作成するために、大腸菌発現系用の組換え発現プラスミド pGEX-WNE を作成し、これを大腸菌に導入し IPTG 誘導を掛けることにより、目的の組換え WNV E 蛋白 (GST-WNVE(N80%)、分子量 71.2kD) が不溶性封入体分画として発現されることを確認した (図 3)。GST-WNV E(N80%) が発現された大腸菌を溶菌して封入体を精製し 8 M 尿素により変性可溶化、その後緩やかに尿素を取り除くことにより re-holding させ、Glutathione Sepharose 4B を用いて精製を行った (図 2)。この蛋白は、GE Healthcare 社の PreScission Protease を用いて GST タグの切断が出来、タグを無しの WNVE(N80%) の調整が可能であり、これによりワクチン免疫後の WNVE 蛋白に対する特異的な免疫反応の検出が可能となることが期待される。

(4) WNV E 蛋白遺伝子導入 EL-4 細胞の作成

-PGA で encapsulate した組み換え WNV E 蛋白の C57/BL6 マウス(H-2<sup>b</sup>)の免疫による CTL の誘導および標的細胞として用いるために、EL-4 細胞の MHC クラス 分子の発現を確認した上で(図4) pcWNME を EL-4 細胞(H-2<sup>b</sup>)に transfection して WNV E 蛋白遺伝子導入・安定発現株の作成を試み、6 種類の transfectant line(EL-4/0.2WNME、EL-4/0.4WNME、EL-4/0.5WNME、EL-4/0.6WNME、EL-4/0.8WNME、EL-4/1.0WNME)を樹立した(図3)。これにより、C57/BL6 マウスに対するワクチン免疫後の in vitro における CTL の priming および CTL 活性の測定が容易となることが期待される。

表 1  
prM(last 15AA)-WNVE(N80%)-Hisの  
抗フラビウイルスモノクローナル抗体4G2に対する反応性

コーティング	培地 <sup>b</sup> のみ	未感染HF細胞 <sup>c</sup>	Bac.WN感染HF細胞 <sup>d</sup>	S2.WN細胞 <sup>e</sup>
4G2 <sup>f</sup>	0.039	0.052	1.304	1.632
なし	0.006	0.015	0.010	0.015

<sup>a</sup>アルカリフォスファターゼ標識抗Hisタグ抗体および発色基質にて検出。

<sup>b</sup>Express Five (EF)無血清培地。

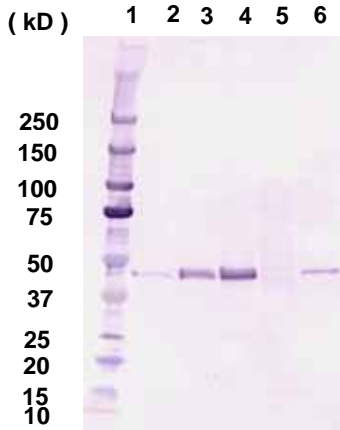
<sup>c</sup>未感染High Five細胞(HF)培養上清(E F培地)。

<sup>d</sup>Bac.WN感染HF細胞(MOI=1、74時間)培養上清(E F培地)。

<sup>e</sup>10倍希釈S2.WN細胞 500 μM CuSO<sub>4</sub>添加、94時間培養上清(E F培地)。

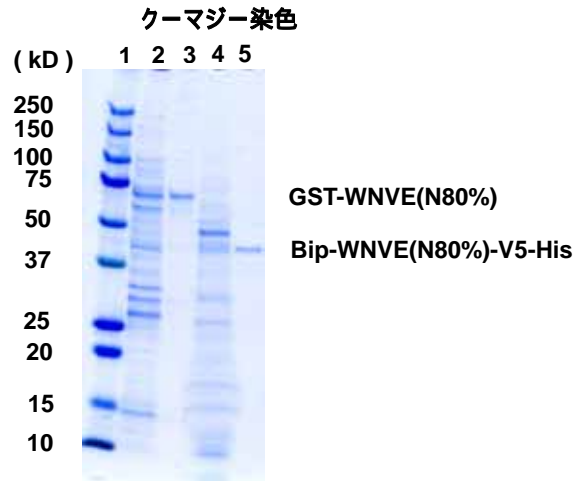
<sup>f</sup>1,000倍希釈。

アルカリフォスファターゼ標識抗Hisタグ(C末端)抗体にて染色



- 1; 分子量マーカー
- 2; S2.WN培養上清, CuSO<sub>4</sub> 不添加, 3日間
- 3; S2.WN培養上清, CuSO<sub>4</sub> 500 μM添加, 3日間
- 4; S2.WN培養上清, CuSO<sub>4</sub> 500 μM添加, 7日間
- 5; 非感染High Five培養上清, 3日間
- 6; Bac.WN感染High Five培養上清(MOI 1), 3日間

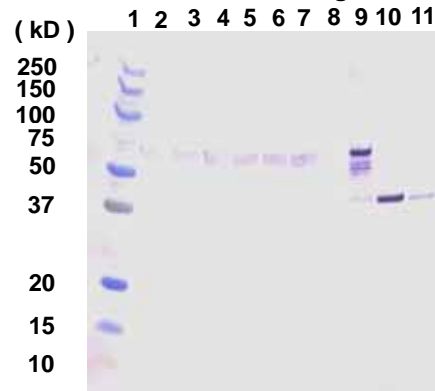
図1



- 1; 分子量マーカー
- 2; pGEX-WNE移入大腸菌体, IPTG 0.1mM添加, 3時間培養
- 3; 精製GST-WNVE(N80%)
- 4; S2.WN培養上清, CuSO<sub>4</sub> 500 μM添加, 7日間培養
- 5; 精製Bip-WNVE(N80%)-V5-His

図2

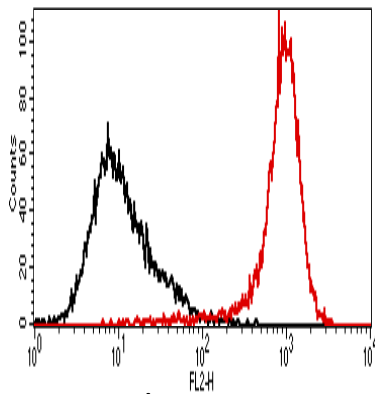
抗フラビウイルスモノクローナル抗体4G2および  
アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体にて染色



- 1; 分子量マーカー
- 2; EL-4/0.2WNME細胞溶解液
- 3; EL-4/0.4WNME細胞溶解液
- 4; EL-4/0.5WNME細胞溶解液
- 5; EL-4/0.6WNME細胞溶解液
- 6; EL-4/0.8WNME細胞溶解液
- 7; EL-4/1.0WNME細胞溶解液
- 8; EL-4細胞溶解液
- 9; 精製GST-WNVE(N80%)
- 10; 精製Bip-WNVE(N80%)-V5-His
- 11; 精製prM(last 15AA)-WNVE(N80%)-His

図3

## EL - 4 細胞



— ; アイソタイプコントロール(マウスIgG<sub>2a</sub> )

— ; PE標識抗マウスH-2K<sup>b</sup>抗体染色

図 4

### 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 )

特に無し。

### 6 . 研究組織

#### (1)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 : 9 0 2 4 7 9 8 2

#### (2)連携研究者

小西 英二 ( KONISHI EIJI )

神戸大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号 : 4 0 1 3 5 7 8 6

#### (3)研究協力者

佐藤 真弓 ( SATOH MAYUMI )

桑原 三和 ( KUWAHARA MIWA )

神戸大学・大学院保健学研究科・大学院生