

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03081

研究課題名(和文) 魚類のDNAワクチン有効性発揮メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of DNA vaccine efficacy in fish

研究代表者

高野 倫一 (Takano, Tomokazu)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・主任研究員

研究者番号：40533998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、魚類ラブドウイルス(CHNV)に対するDNAワクチンを接種したクローンギンブナの免疫応答を解析した。具体的には、DNAワクチン接種したギンブナの白血球をnaiveなギンブナに移植したのちCHNVで攻撃して受動免疫効果を評価した。次いで、CHNV感染させたギンブナ培養細胞とDNAワクチン接種ギンブナの白血球を共培養した際の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。一連の解析から、CHNVに対するDNAワクチンの効果発揮には、CD8+T細胞ではなく、それ以外の白血球(CD8-白血球)の役割が重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類用のDNAワクチン開発を加速させるためには、DNAワクチン有効性発揮のメカニズム解明が重要である。本研究では、個体間で細胞移植が可能なクローンギンブナを利用し、DNAワクチンの効果発揮にはCD8-白血球(CD8+T細胞以外の細胞)の働きが重要であることを示した。これまでDNAワクチンの効果には感染細胞を傷害するCD8+T細胞の活性化が重要だと考えられてきたため、今回得られた知見は魚類のDNAワクチン研究を新たな視点に導くきっかけになりえる。今後、CD8-白血球活性化の指標を利用することで、効果の高いDNAワクチンのスクリーニングなど、開発の効率化につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)： The immune response of clonal crucian carp inoculated with a DNA vaccine against fish rhabdovirus (CHNV) was analyzed in this study. Specifically, leukocytes from DNA-vaccinated crucian carp were transplanted into the naive fish and then challenged with CHNV to evaluate the passive immune effect. Furthermore, gene expression was comprehensively analyzed when leukocytes from DNA-vaccinated crucian carp were co-cultured with CHNV-infected cultured cells established from the crucian carp. A series of analyses indicated that the role of leukocytes other than CD8+ T cells may be important in exerting the protective efficacy of the vaccine.

研究分野：魚病学

キーワード：DNAワクチン ギンブナ ラブドウイルス 受動免疫 中和抗体 白血球 CD8

1. 研究開始当初の背景

DNA ワクチンは優れた免疫誘導能を発揮することから、不活化ワクチンでは防除できないウイルス感染症等への応用が期待されている。魚類の DNA ワクチンに関する研究からは、接種後に細胞性免疫に関わる遺伝子が発現変動することや、特定の T 細胞サブセットが増殖すること、また、特異的または非特異的に感染細胞を傷害する白血球が出現することが報告されていた。しかし、これらはいずれも断片的な情報であり、どのような免疫学的因子が有効性発揮に関わるのかは詳細に解明されていなかった。

2. 研究の目的

白血球の移植実験が可能なクローンギンブナで DNA ワクチンの試験モデルを確立した上で、DNA ワクチンを接種したクローンギンブナから CD8⁺T 細胞などの白血球を分画する。これらの細胞の移植による受動免疫試験や、ウイルス感染細胞との共培養試験を行い、細胞レベルや遺伝子発現レベルから DNA ワクチン有効性発揮メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) Carp Haematopoietic Necrosis Virus (CHNV) に対する DNA ワクチンの準備

CHNV を感染させた *Carassius Fin from lake Suwa* (CFS) 細胞とその培養上清から、ショ糖不連続密度勾配を使った超遠心分離により CHNV 粒子を精製した。精製ウイルス粒子から RNA を抽出し cDNA を合成したのち、全ゲノム配列を決定した。CHNV ゲノム中のグリコ (G) タンパク質遺伝子およびヌクレオカプシド (N) タンパク質遺伝子を別々に遺伝子発現ベクター (pcDNA6/V5-His) に挿入し、順に pcDNA6-CHNVg および pcDNA6-CHNVn を作製した。作製したベクターを CFS 細胞に導入し、ウエスタンブロットにより目的タンパク質の産生を確認した。

DNA ワクチンの有効性を確認する目的で、クローンギンブナ (OB1 系統) 1 尾あたり 5 µg の pcDNA6-CHNVg または pcDNA6-CHNVn を筋肉注射したワクチン接種区を用意した。対照区には同量の空ベクター (pcDNA6/V5-HisA) または PBS を筋肉注射した。接種後に 35 日間の免疫期間を設けたのち腹腔内注射で CHNV (8.0×10^6 TCID₅₀/fish) を接種し累積死亡率を求めた。さらに、死亡魚と生残魚の体腎中ウイルス量を定量的逆転写 PCR で評価した。

(2) DNA ワクチン接種魚血清の CHNV 中和活性測定

十分に免疫が賦与されるように、2 週間から 3 週間のインターバルで合計 4 回 DNA ワクチンを接種したクローンギンブナ (OB1 系統) を用意した。最終免疫の 2 週間後に各区 5 尾の尾静脈から末梢血を採取し血清を得た。10 倍に希釈した血清 100 µL と 4×10^3 TCID₅₀ の CHNV を混合し 25 °C で 2 時間静置し、培養プレート中でコンフルエントになった CFS 細胞に接種した。48 時間後に形成されたプラーク数を肉眼で計数し CHNV 中和活性を評価した。並行して、各ワクチン接種魚血清の特異抗体価の上昇を確認する目的で、精製 CHNV ウイルス粒子を固相化抗原とした酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) でも抗体価測定を行った。

(3) 白血球移植による受動免疫試験

(2) で使用した DNA ワクチン接種ギンブナから腎臓を摘出し、培地と共にナイロンメッシュに通すことで細胞を分散した。1.07 g/mL 比重のパーコールにこの細胞分散液を重層し低速遠心 (860 ×g、30 分) で白血球を分離した。分離した白血球を抗ギンブナ CD8 モノクローナル抗体で標識し、磁気活性化セルソーティング (MACS) で CD8⁺T 細胞とその他の白血球 (CD8⁻白血球) に分画した。次いで、4 ヶ月齢の naïve なクローンギンブナ腹腔内に、分画前の全白血球を 1.5×10^6 cells/fish、CD8⁺T 細胞を 1.0×10^5 cells/fish、または CD8⁻白血球を 1.5×10^6 cells/fish の条件で移植した。移植の 24 時間後に CHNV (8.0×10^5 TCID₅₀/fish) を腹腔内に接種し累積死亡率を求めた。

(4) 白血球とウイルス感染細胞の共培養試験

(2) と同じ方法で S3N 系統のクローンギンブナに DNA ワクチンを接種した。次いで、(3) と同様に MACS で CD8⁺T 細胞とその他の白血球 (CD8⁻白血球) を分画し、エフェクター細胞とした。他方で、96 ウェル培養プレート中で CHNV を感染させた CFS 細胞をターゲット細胞として用意した。次いで、エフェクター細胞数 : ターゲット細胞数 = 50 : 1 の比率で混合したのち 6 時間共培養した。共培養した細胞から微量 RNA 抽出用カラムで全 RNA を抽出し、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA キットを用いてライブラリーを調製したのち、NovaSeq システムを利用して 150bp ペアエンド RNA シーケンスを行った。得られたリードをキンギョのゲノムデータ (GCA_003368295.1) にマッピングし、各々の遺伝子の発現量を Transcripts Per Million (TPM) として求めた。次いで、空ベクター接種区の白血球の共培養と比較してワクチン接種区の白血球の共培養では何倍の遺伝子発現変動 (Fold change) が生じたかを TPM の比から求め、Fold change > |2| かつ FDR < 0.05 の範囲で変動した遺伝子を Differentially Expressed Genes (DEGs) と判断した。最後に、得られた DEGs に関して Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。

4. 研究成果

(1) CHNV に対する DNA ワクチン作製

CHNV のゲノムはマイナス鎖の 1 本差鎖 RNA で全長 11,106 bp だった。3' 側から順に N、フォスフォ (P)、マトリックス (M)、G および RNA ポリメラーゼ (L) タンパク質の遺伝子をコードしていた。分子系統解析からラブドウイルス科の Grass carp rhabdovirus (GCRV) に近縁であることが明らかになった。作製した pcDNA6-CHNVg または pcDNA6-CHNVn を導入した CFS 細胞のウエスタンブロット解析からは、順に G タンパク質または N タンパク質に等しい分子量のタンパク質が検出された。DNA ワクチン有効性試験の累積死亡率は、pcDNA6-CHNVg 接種区、pcDNA6-CHNVn 接種区、空ベクター区および PBS 区の順に、0%、16.7%、33.3% および 16.7% だった。定量的逆転写 PCR で腎臓中の P タンパク質遺伝子の RNA コピー数を測定したところ、死亡魚には各区分で違いが認められなかったが、生残魚では pcDNA6-CHNVg 接種区のみが有意に低かった (Tukey-Kramer 法、 $p < 0.05$)。これらのことから、pcDNA6-CHNVg には CHNV 感染を防除する効果があることがわかった。クローンギンブナを使った DNA ワクチン試験が実施できるようになった。

(2) DNA ワクチン接種魚血清の CHNV 中和活性測定

血清と反応させた CHNV を CFS 細胞に接種した際に出現したプラーク数 (図 1) の平均は、pcDNA6-CHNVg 接種区、pcDNA6-CHNVn 接種区、および空ベクター区の順に、0.8、56.2、および 62.6 個だった。形成されたプラーク数は pcDNA6-CHNVg 接種区のみで優位 (Tukey-Kramer 法、 $p < 0.01$) に低く、DNA ワクチンとして接種した G タンパク質遺伝子は中和抗体を誘導するが、N タンパク質遺伝子は誘導しないことがわかった。一方、ELISA による特異抗体検出の結果、pcDNA6-CHNVg 接種区では空ベクター接種区と比較して有意差が得られない程度の抗体価上昇だったが、pcDNA6-CHNVn 接種区では有意な抗体価上昇が認められた。すなわち、pcDNA6-CHNVn 接種区で CHNV の N タンパク質に対する特異抗体が産生されていなかったわけではないことが示された。これらの結果から、CHNV の G タンパク質は感染防御抗原であり、pcDNA6-CHNVg 接種ギンブナ体内で産生された抗 G タンパク質抗体が体液中の CHNV を中和し感染防御の一端を成すことが示唆された。

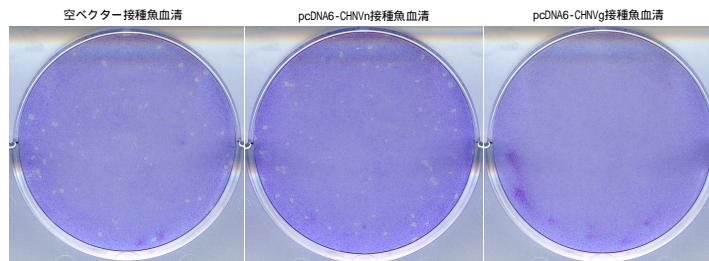


図 1. 各ワクチン接種区の魚の血清と CHNV を混合したものを CFS 細胞に接種したのち 48 時間後に形成されたプラーク

(3) 白血球移植による受動免疫試験

各ワクチン接種区の試験魚から用意した分画前の全白血球、CD8⁺T 細胞、または CD8⁻白血球を移植した naïve クローンギンブナ (各区 $n = 9 \sim 10$) を、CHNV で攻撃した際の累積死亡率を図 2 に示した。移植した細胞の違いによって有意 (Log-rank test, $p < 0.01$) に累積死亡率が変化したのは pcDNA6-CHNVg 接種区のみであり、CD8⁺T 細胞を移植した場合と比較して全白血球もしくは CD8⁻白血球を移植した場合に顕著な累積死亡率の低下が観察された。この結果は、CHNV の DNA ワクチン有効性発揮には、G タンパク質遺伝子で免疫した魚の CD8⁻白血球の役割が重要であることを示唆する。哺乳類では CD8⁺T 細胞が DNA ワクチン有効性発揮に重要だと考えられているが、ギンブナでこれを支持しない実験結果が得られたことは非常に興味深く、CD8⁻白血球に含まれる種々の白血球サブセットの役割には興味を持たれる。

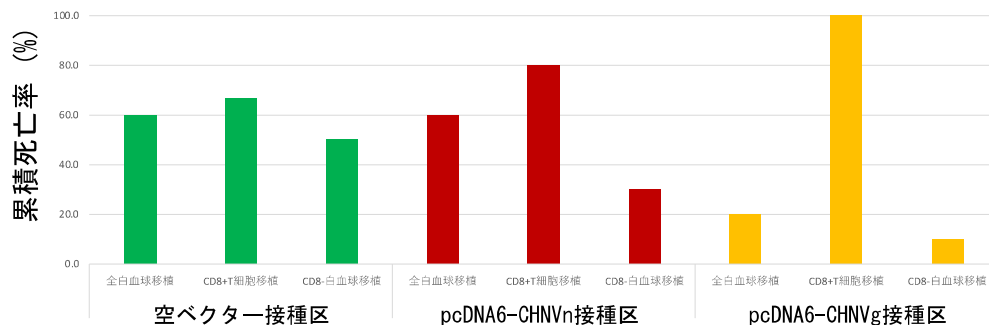


図 2. 各ワクチン接種区の試験魚から分画した白血球を移植した naïve クローンギンブナの CHNV 攻撃後の累積死亡率

(4) 白血球とウイルス感染細胞の共培養試験

各ワクチン接種区の CD8⁺T 細胞または CD8⁻白血球をエフェクター細胞としてターゲット細胞と共培養した場合、DEGs として判定された遺伝子は全体で約 1,700 種類あった。興味深いことに、そのうちの 98%が pcDNA6-CHNVg 接種区 CD8⁻白血球の共培養において特徴的な DEGs だった。これらの DEGs のうち、発現上昇していたものに関して GO エンリッチメント解析を実施した結果、主としてタンパク質の生合成やプロセッシングに関わる「Ribosome」と「Proteasome」、免疫応答の「Toll-like receptor signaling」、「NOD-like receptor signaling」、「Cytosolic DNA-sensing pathway」および「RIG-I-like receptor signaling」パスウェイに関わる遺伝子が多く含まれていた(図3)。すなわち、pcDNA6-CHNVg で免疫した CD8⁻白血球は何らかの形で CHNV 感染細胞を認識し、タンパク質産生量の増大や、パターン認識受容体に関わる免疫応答を起こすと考えられた。パターン認識受容体が感染 CHNV を認識し、抗ウイルス活性を向上させることで「semi-specific な感染防除」^[1]が誘導されている可能性に注目して今後解析を進める必要がある。

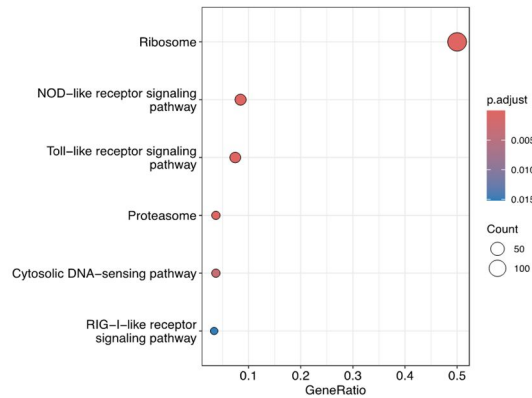


図3. pcDNA6-CHNVg接種区のCD8⁻白血球をCHNV感染細胞と共培養した際に特徴的に発現上昇したDEGsのエンリッチメント解析結果

CHNV 感染耐過クローンギンブナを使った先行研究から、単球や NK 様細胞がウイルス感染に対する細胞性免疫に重要であることが示されている^[2]。アメリカナマズにおいても、CD4⁺/CD8⁻または CD4⁻/CD8⁻白血球がウイルス感染細胞を傷害することが報告されている^[3]。本研究に使用したギンブナの CD8⁻白血球にも単球、NK 様細胞や CD4⁺細胞が含まれていることから、これらの先行研究における観察との間に矛盾は生じない。ただし、本研究では受動免疫試験の際に中和抗体を産生する B 細胞も同時に移植されたため、移植後にレシピエント体内で産生された中和抗体がどの程度感染防御に寄与したかを今後評価しなければならない。いずれにせよ、CHNV に対する DNA ワクチン有効性の発揮には、G タンパク質遺伝子で免疫された CD8⁺T 細胞以外の白血球の働きが重要であることが本研究から示唆された。

研究成果の要約

- 1) 個体間で白血球の移植が可能なクローンギンブナを使って DNA ワクチン試験が実施できるようになった。
- 2) CHNV の G タンパク質遺伝子を DNA ワクチンとして接種した場合にのみ中和抗体が産生されることを示した。
- 3) CHNV の G タンパク質遺伝子で免疫したギンブナの CD8⁻白血球を移植すれば受動免疫が成立することを示した。
- 4) CHNV 感染細胞を認識し強力に応答することができるのは、G タンパク質遺伝子で免疫した CD8⁻白血球のみであることを示した。

研究成果の展望と産業応用

CD8⁻白血球の共培養試験から見つかった DEGs はワクチン有効性と連動していることから、感染防御抗原遺伝子のスクリーニングや試作 DNA ワクチンの有効性指標としての利用が期待でき、魚類 DNA ワクチン開発の効率化に資する可能性がある。

文献

- [1] S.E. LaPatra, S. Corbeil, G.R. Jones, W.D. Shewmaker, N. Lorenzen, E.D. Anderson, G. Kurath, Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination, Vaccine 19 (2001) 4011-4019.
- [2] T. Somamoto, T. Nakanishi, M. Nakao, Identification of anti-viral cytotoxic effector cells in the ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii, Developmental & Comparative Immunology 39 (2013) 370-377.
- [3] E.B. Taylor, V.G. Chinchar, S.M.A. Quiniou, M. Wilson, E. Bengtén, Cloning and characterization of antiviral cytotoxic T lymphocytes in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Virology 540 (2020) 184-194.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sukeda M, Shiota K, Kondo M, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T	4. 巻 115
2. 論文標題 Innate cell-mediated cytotoxicity of CD8+ T cells against the protozoan parasite Ichthyophthirius multifiliis in the ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental and Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 103886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dci.2020.103886.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura Yuta, Takano Tomokazu, Matsuyama Tomomasa, Sakai Takamitsu, Terashima Sachiko, Nakayasu Chihaya	4. 巻 107
2. 論文標題 Development of a method to quantify endogenous IFN protein in amberjack species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 251-259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsi.2020.10.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tran Thu Trang, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Characterization of CD83 isotypes expressed on monocyte-macrophage lineage in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 16th Congress of the International Society for Developmental and Comparative Immunology (ISDCI)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tran Thu Trang, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Expression of CD83 isotypes during the differentiation of monocyte-macrophage lineage in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 第34回日本比較免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杣本智軌
2. 発表標題 硬骨魚類の病原体に対する細胞性免疫機構
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会九州支部大会・ミニシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Thu Trang Tran, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Differential expression of two CD83 isotypes in monocyte-macrophage lineage in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Thu Trang Tran, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto
2. 発表標題 Characterization of CD83 isotypes expressed in monocyte and monocyte-derived dendritic-like cells in ginbuna crucian carp
3. 学会等名 水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野倫一・松浦雄太・梅田剛佑・吉野友晃・中西照幸・松山知正・杣本智軌
2. 発表標題 フナ造血器壊死ウイルス（CHNV）に対するDNAワクチン
3. 学会等名 令和4年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阪中晴子・長澤貴宏・中尾実樹・杣本智軌
2. 発表標題 粘膜組織を介した抗原投与方法の違いによるギンブナ抗体産生応答の比較
3. 学会等名 令和3年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 助田将樹, 長澤貴宏, 中尾実樹, 杣本智軌
2. 発表標題 魚類CD8+T細胞のMHC非依存的な細胞媒介性細胞傷害における寄生原虫認識受容体の探索
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦 雄太, 松山 知正, 高野 倫一, 中易 千早
2. 発表標題 プリ類のインターフェロン (IFN) を定量する方法の開発
3. 学会等名 令和3年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杣本智軌	4. 発行年 2020年
2. 出版社 アクアネット(湊文社)	5. 総ページ数 4
3. 書名 魚類の粘膜を介したワクチン投与方法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杣本 智軌 (Somamoto Tomonori) (40403993)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	松浦 雄太 (Matsuura Yuta) (40823894)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・研究員 (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関