

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07524

研究課題名（和文）タンパク質“自己結合”システムを用いた多機能型ウイルス様中空粒子ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of VLP vaccines using protein-protein self-joining system

研究代表者

竹内 薫（TAKEUCHI, Kaoru）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00192162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）は牛にウイルス性下痢・粘膜病を引き起こす重要な病原体である。しかし、現行のワクチンには種々の問題がある。そこで、本研究では魚類に感染する小型球形ウイルスのウイルス様中空粒子（VLP）にBVDVの主要な抗原であるE2タンパク質をタンパク質-タンパク質自己結合システムを用いて提示させた。このVLP-E2複合体をマウスに接種したところ、E2タンパク質に対する極めて高いELISA抗体と中和抗体を誘導する事ができた。抗原となるタンパク質をVLPの表面に提示して免疫原性を高める手法は免疫原性が弱い他の病原体のタンパク質にも応用可能であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BVDVは牛ウイルス性下痢・粘膜病を引き起こす重要な病原体で、畜産業に甚大な経済損失をもたらしている。現在、BVDVに対する治療法はなく、感染牛の摘発淘汰またはワクチンによる予防が有効な対策とされている。しかし、現行の生ワクチンは、妊娠牛への接種により胎内感染が起こるため接種ができないという問題がある。また不活化ワクチンは、抗体価が低く予防効果が完全ではないという課題がある。本研究で作成したE2抗原を提示するVLPワクチンは有望なワクチン候補と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a pathogen of commercial consequence in cattle. Although many vaccines are commercially available, their drawbacks precipitate the need for new effective vaccines. Virus-like particles (VLPs) are safe and powerful technology; however, it is difficult to produce large amounts of BVDV VLP. In this study, we generated red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) VLP presenting BVDV E2 protein by exploiting SpyTag/SpyCatcher technology. Mice immunized with RGNNV VLP conjugated with E2 proteins of Nose and KZ-91-CP strains at day 0 and 14 elicited robust IgG titers against E2 proteins of homologous strains. In addition, this prime-boost regimen induced strong neutralization titers against homologous BVDV strains. Our results indicate that conjugation of E2 protein to RGNNV VLP strongly enhanced the antigenicity of E2 protein and that RGNNV VLPs presenting E2 protein are promising BVDV vaccine candidates.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス様中空粒子 VLP BVDV RGNNV SpyTag/SpyCatcher

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス様粒子 (Virus-like particles: VLP) は遺伝情報を持たない、ウイルスと同様の外殻構造を持つ粒子である。遺伝子組換え技術を用いて作成した VLP はウイルスゲノムを持たないため感染性がない。さらに、VLP はウイルスと同じ外殻構造と大きさ (30-200 nm) を持つため、抗原性が極めて高く、液性免疫を強く誘導する。加えて VLP は抗原提示細胞に取り込まれた後、クロスプレゼンテーションにより MHC-I に提示されるため、細胞性免疫を誘導できる。したがって、VLP を用いたワクチンは弱毒生ワクチンよりも安全性が高く、不活化ワクチンよりも有効であるため、種々の VLP ワクチンの開発が進められており、B 型肝炎ワクチンや子宮頸がんワクチンなど既に実用化されているものもある。しかしながら、全ての種類のウイルスで VLP を生産できる訳ではない。

(2) 牛ウイルス性下痢ウイルス (Bovine viral diarrhoea virus: BVDV) は牛ウイルス性下痢・粘膜病を引き起こす重要な病原体で、畜産業に甚大な経済損失をもたらしている。主にウシに感染し、発熱や下痢、呼吸器症状を示し、妊娠牛に感染すると、生まれる子牛は胎内感染により免疫寛容がおこる。これにより、生まれた子牛はウイルスを産生・排出し続ける持続感染牛となり最も重要な感染源となる。現在、BVDV に対する治療法はなく、感染牛の摘発淘汰またはワクチンによる予防が有効な対策とされている。しかし、現行の生ワクチンは、妊娠牛への接種により胎内感染が起こるため接種ができないという問題がある。また不活化ワクチンは、抗体価が低く予防効果が完全ではないという課題があり、有効なワクチンの開発が望まれている。現在のところ、BVDV に関して効率の良い VLP 生産系に関する報告はない。

2. 研究の目的

(1) 近年、VLP の高い免疫原性を利用して、小型球形のウイルスの VLP をキャリアとして用い異種抗原を提示し、種々の感染症に対する組換え修飾 VLP ワクチンを開発する試みが行われている。例えば、VLP のカプシドタンパク質の外側に突出したループ領域または、カプシドタンパク質の末端へ異種抗原の短いアミノ酸配列を挿入、付加することにより異種抗原を提示することができる。しかしながら、抗原の一部のアミノ酸を提示するだけでは十分な感染防御抗体は誘導できない。また、長い異種抗原ペプチドを挿入すると立体障害を引き起こし、VLP の形成自体が起こらなくなってしまう可能性が高い。さらに、ウイルスの膜タンパク質等は、複雑な高次構造を持ち糖鎖付加などの翻訳後修飾が行われるので異種抗原を小型球形のウイルスの VLP 上に発現させるのはそもそも不可能である。

(2) そこで、本研究では、小型球形のウイルスの VLP と BVDV の主要な抗原であり膜タンパク質である E2 タンパク質を別々の発現系で発現させ、その後、SpyTag/SpyCatcher System (Zakeri et al, 2012) を用いて両者を共有結合することで VLP 上に正しい構造を有する異種抗原を高密度に提示させ (図 1)、BVDV に対する有効なワクチンを作成することを目的にした。

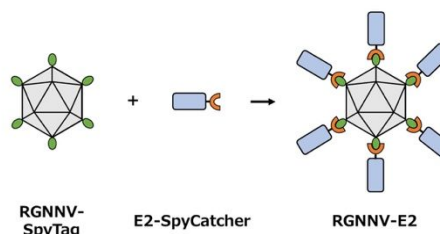


図1 RGNNV VLPとBVDV E2タンパク質の結合

3. 研究の方法

(1) 小型球形のウイルスの VLP は、魚類に感染するキジハタ神経壊死症ウイルス (Red-spotted grouper nervous necrosis virus: RGNNV) のカプシドタンパク質を用いて作成した。RGNNV は直径 25-30 nm で、ベータノダウイルス属に属するプラス一本鎖 RNA ウイルスである。BVDV の E2 タンパク質を SpyTag/SpyCatcher System で結合させるため、RGNNV のカプシドタンパク質の C 末端に SpyTag (13 アミノ酸) を付加した。RGNNV の VLP は大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いて発現させた後、大腸菌を破碎し、シヨ糖密度勾配遠心により精製した。

(2) BVDV の E2 タンパク質は 1 型に属する Nose 株と 2 型に属する KZ-91-CP 株のタンパク質を用いた。分泌型に改変したそれぞれの E2 タンパク質の C 末端に SpyCatcher (92 アミノ酸) と精製用の 6×His 配列を付加した。E2 タンパク質は、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系を用いて High Five 細胞で発現させ、培養液から Ni-レジンをを用いて精製した。

(3) E2 タンパク質を提示する VLP (VLP-E2) は、SpyTag を有する VLP と SpyCatcher を有する E2 タンパク質を混合し 4 で一晩保持して作成した。

(4) VLP-E2 のマウスへの投与は、アジュバントなしの腹腔内投与を 2 回 (0 日目と 14 日目) 行い、28 日目に血清を回収した。抗体価の測定は、Nose 株と KZ-91-CP 株の E2 タンパク質を用いた

ELISA 法と Nose 株と KZ-91-CP 株の感染性ウイルスを用いたウイルス中和法により行った。

4. 研究成果

(1)RGNNV の VLP に SpyTag を付加した RGNNV-SpyTag を大腸菌において大量発現させ精製する事ができた。収量は 0.42 mg/100 ml であった。一方、BVDV の Nose 株と KZ-91-CP 株の E2 タンパク質に SpyCatcher を付加し、さらに精製用 His tag を付加した組換え E2-SpyCatcher をバキュロウイルス/昆虫細胞発現系で発現させ精製することができた。収量はそれぞれ、0.11 mg/100 ml、0.37 mg/100 ml であった。加えて、E2 タンパク質に His tag を付加した E2-His tag をバキュロウイルス/昆虫細胞発現系において発現させ精製することができた。収量は 1.7 mg/100 ml であった。

(2)精製した RGNNV-SpyTag と Nose 株あるいは KZ-91-CP 株の E2-SpyCatcher をそれぞれ混合し、4 で一晩保持し、サンプルを SDS-PAGE により展開したところ、それぞれの E2-SpyCatcher のバンドが消失し、分子的に RGNNV-SpyTag と E2-SpyCatcher が結合した RGNNV-E2 と考えられる新たなバンドが出現した。さらに RGNNV-SpyTag と E2-SpyCatcher を混合した RGNNV-E2 を電子顕微鏡で観察した結果、約 30 nm の球状粒子が検出された。E2 が結合していない RGNNV-SpyTag と比較すると、VLP の外側にスパイクタンパク様の構造が認められた。

(3)作成した RGNNV-E2 の抗原性を評価するため、マウスに接種実験を行った。Nose 株の RGNNV-E2 投与マウスから回収した血清中の E2 タンパク質に特異的な IgG 抗体価を測定した結果、約 500,000 倍という極めて高い抗体価が検出された。一方、E2 タンパク質単体投与マウスにおける血清中の E2 タンパク質に特異的な IgG 抗体価は約 1,000 倍であった (図 2A)。同様に、KZ-91-CP 株の RGNNV-E2 投与マウスから回収した血清中の E2 タンパク質に特異的な IgG 抗体価を測定した結果、こちらも約 1,000,000 倍という極めて高い抗体価が検出された。一方、E2 タンパク質単体投与マウスにおける血清中の E2 タンパク質に特異的な IgG 抗体価は約 400 倍だった。また、RGNNV と E2-His tag を混合した RGNNV+E2 投与マウスから回収した血清中の IgG 抗体価を測定した結果、約 9,000 倍であった (図 2B)。E2 単体投与時より高い値を示したので RGNNV にも一種のアジュバント効果があるものと考えられた。

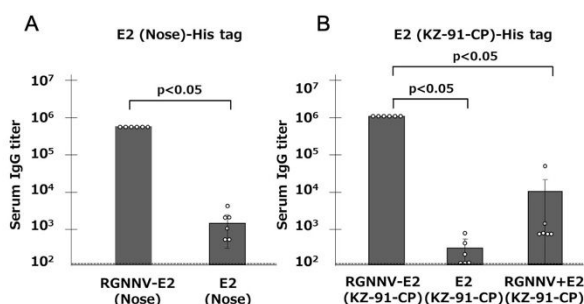


図2 E2タンパク質に対するIgG抗体値の上昇

(A) Nose株のE2タンパク質をELISA抗原として用い、VLP化したE2タンパク質 (Nose株)とE2タンパク質 (Nose株) 単独を接種したマウス血清のELISA抗体値を示した。(B) KZ-91-CP株のE2タンパク質をELISA抗原として用い、VLP化したE2タンパク質 (KZ-91-CP株)とE2タンパク質 (KZ-91-CP株) 単独およびVLPとE2タンパク質 (KZ-91-CP株) の混合物を接種したマウス血清のELISA抗体値を示した。

(4)次に、ウイルス中和法による中和抗体価を測定した。Nose 株 RGNNV-E2 投与マウスから回収した血清中の Nose 株に対する中和抗体価を測定した結果、約 1,200 倍という高い値であった (図 3A)。一方、E2 タンパク質単体投与マウスから回収した血清中の中和抗体価を測定した結果、検出限界 (100 倍) 以下であった。KZ-91-CP 株 RGNNV-E2 投与マウスから回収した血清中の KZ-91-CP 株に対する中和抗体価を測定した結果、約 1,600 倍という高い値であった (図 3B)。一方、E2 タンパク質単体投与マウスから回収した血清中の中和抗体価を測定した結果、検出限界 (100 倍) 以下であった。また、RGNNV と E2 (KZ-91-CP)-His tag を単に混合した RGNNV+E2 を投与したマウスから回収した血清中の中和抗体価は検出限界 (100 倍) 以下であった。

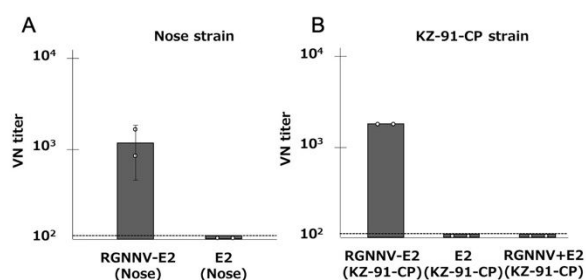


図3 E2タンパク質に対する中和抗体値の上昇

(A) BVDV Nose株を攻撃ウイルスとして用い、VLP化したE2タンパク質 (Nose株)とE2タンパク質 (Nose株) 単独を接種したマウス血清の中和抗体値を示した。(B) BVDV KZ-91-CP株を攻撃ウイルスとして用い、VLP化したE2タンパク質 (KZ-91-CP株)とE2タンパク質 (KZ-91-CP株) 単独およびVLPとE2タンパク質 (KZ-91-CP株) の混合物を接種したマウス血清の中和抗体値を示した。

(5)本研究で作成した新規 VLP ワクチン (RGNNV-E2) 投与マウスは、極めて高い E2 タンパク質特異的な IgG 抗体と BVDV に対する中和抗体を誘導することができた。この中和抗体の値は現行のワクチンで誘導されるマウスの抗体値より遥に高い値であり RGNNV-E2 は BVDV に対するワクチンの有望な候補になりうると考えられる。BVDV は 1 型と 2 型に分かれており、お互いに抗原性の交差は少ない。1 型と 2 型の E2 タンパク質を混ぜて VLP に提示させる、あるいは、1 型の E2 タンパク質を提示した VLP と 2 型の E2 タンパク質を提示した VLP を混合して接種する、といった方法で 1 型、2 型、両方の株に有効なワクチンができると考えられる。今回、単体では免疫原性が弱い E2 タンパク質も VLP と結合させることにより免疫原性を高められる事が示された。この手法は免疫原性が弱い他の病原体のタンパク質にも応用可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Nakahira, Y., Mizuno, K., Yamashita, H., Tsuchikura, M., Takeuchi, K., Shiina, T., Kawakami, K. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Mass Production of Virus-Like Particles Using Chloroplast Genetic Engineering for Highly Immunogenic Oral Vaccine Against Fish Disease | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Front Plant Sci | 6. 最初と最後の頁 717952 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.717952 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Katsura M, Fukushima M, Kameyama KI, Kokuho T, Nakahira Y, Takeuchi K | 4. 巻 168 |
| 2. 論文標題 Novel bovine viral diarrhea virus (BVDV) virus-like particle vaccine candidates presenting the E2 protein using the SpyTag/SpyCatcher system induce a robust neutralizing antibody response in mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Arch Virol | 6. 最初と最後の頁 49-58 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-022-05653-x | 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 Okura T, Tahara M, Otsuki N, Sato M, Takeuchi K, Takeda M | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Generation of a photocontrollable recombinant bovine parainfluenza virus type 3 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Microbiol Immunol | 6. 最初と最後の頁 204-209 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13052 | 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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

(プレスリリース) 養殖魚の疾病予防に有効な「食べるワクチン」を葉緑体工学で開発
<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/pdf/p202108231300.pdf>

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 | 中平 洋一 (NAKAHIRA Yoichi) (40423868) | 茨城大学・農学部・准教授 (12101) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|