

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790444

研究課題名（和文）

SARS-CoV に対する不活化ワクチンの副反応機序の解明とその改善について

研究課題名（英文）

Study for side effects of inactivated SARS-CoV vaccine.

研究代表者

岩田 奈織子 (Iwata Naoko)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：10360695

研究成果の概要（和文）：

重症急性呼吸器症候群（SARS）コロナウイルス（SARS-CoV）は重症呼吸器疾患を引き起こす新興ウイルスである。ワクチンや治療薬はまだ開発されていない。UV 不活化 SARS-CoV 全粒子（UV-V）は多くのエピトープやタンパクを含んでおり、SARS のワクチン候補とされている。しかしながら、ヌクレオカプシドタンパクを含む不活化 SARS ワクチンはウイルス感染後マウスの肺に好酸球浸潤を示すことが報告されている。今回、Toll-like receptor (TLR) アゴニストが UV-V ワクチンの副反応を軽減するか半年齢の BALB/c マウスで調べた。UV-V、水酸化アルミニウム(Alum)添加 UV-V で免疫した半年齢マウスは、マウス馴化 SARS-CoV の感染に対して一部防御を示し、組織学的に肺で肺胞傷害像は見られなかったが、血管周囲に広汎な好酸球浸潤が見られた。一方、リポポリサッカライド、Poly(I:C)、PolyU を含む TLR アゴニストを添加した UV-V(UV-V+TLR)で免疫したマウスでは、肺での好酸球浸潤が著しく減少した。そして肺のサイトカイン量の測定で好酸球誘導に関わる IL-4 および IL-13 の値が UV-V 免疫マウスよりも低いことが示された。加えて、マイクロアレイ解析で UV-V 免疫マウスでは好酸球誘導に関わる遺伝子の発現が高くなっていたのに対し、UV-V+TLR 免疫マウスではそれらは低く、むしろ TLR3 および 4 の下流に位置する遺伝子の発現が高くなっていることが分かった。これらの結果から、SARS-CoV 感染により引き起こされる肺のワクチン誘発性好酸球浸潤は TLR アゴニストをアジュバントにすることにより、回避できると示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV) is an emerging pathogen that causes severe respiratory illness. Whole UV-inactivated SARS-CoV (UV-V), bearing multiple epitopes and proteins, is a candidate vaccine against this virus. However, whole inactivated SARS vaccine that includes nucleocapsid protein is reported to induce eosinophilic infiltration in mouse lungs after challenge with live SARS-CoV. In this study, an ability of Toll-like receptor (TLR) agonists to reduce the side effects of UV-V vaccination in a 6-month-old adult BALB/c mouse model was investigated, using the mouse-passaged Frankfurt 1 isolate of SARS-CoV. Immunization of adult mice with UV-V, with or without alum, resulted in partial protection from lethal doses of SARS-CoV challenge, but extensive eosinophil infiltration in the lungs was observed. By contrast, TLR agonists added to UV-V vaccine, including lipopolysaccharide, polyU, and poly (I:C) (UV-V+TLR), strikingly reduced excess eosinophilic infiltration in the lungs and induced lower levels of interleukin-4 and -13 and eotaxin in the lungs than UV-V-immunization alone.

Additionally, microarray analysis showed that genes associated with chemotaxis, eosinophil migration, eosinophilia, and cell movement, and the polarization of Th2 cells were up-regulated in UV-V- but not in UV-V+TLR-immunized mice. Rather, genes downstream of TLR3 and TLR4 were up-regulated in UV-V+TLR- compared with UV-V-immunized mice. These findings suggest that vaccine-induced eosinophil immunopathology in the lungs upon SARS-CoV infection can be avoided by the TLR agonists adjuvant.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|------|-----------|
| 2010年度 | 1,172,093 | 0 | 1,172,093 |
| 2011年度 | 427,907 | 0 | 427,907 |
| 2012年度 | 1,400,000 | 0 | 1,400,000 |
| 総計 | 3,000,000 | 0 | 3,000,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御・ワクチン・動物モデル

1. 研究開始当初の背景

SARSは2002年から2003年にかけてアジアおよびヨーロッパ諸国で大流行したSARS-CoVの感染により起こる肺炎である。流行は2003年7月に自然終息したが、保菌動物の特定は未だなされておらず、再興の可能性があるため動物モデルを用いた治療薬やワクチンの開発が求められている。我々はSARS-CoVに対する不活化ワクチンの免疫効果と副反応について、我々の確立したSARS発症マウスモデル(N.Nagata, Am. J. Pathol.172,1625-37; 2008)を用いて、現在までに2つの現象を得ており、SARS-CoVの2回感染では、ウイルス増殖と発症に対して非常に効果的な感染防御免疫を誘導する事を明らかにした。そしてもう一つはSARS-CoVの不活化ワクチンはウイルス感染後に肺局所に好酸球浸潤を惹起することを明らかにした。これらの実験からSARS-CoVの不活化ワクチンはその実用化への大きな懸念となる好酸球浸潤および炎症の持続という副反応が確認された。

2. 研究の目的

本質としてSARS-CoVのN蛋白は肺の好酸球浸潤を引き起こし肺炎を重症化させる要因がある(F. Yasui *et al.*, J.Immunol., 181, 6337-6348, 2008)。この現象は不活化ワクチンを用いた実験で我々も確認した。一方で2回ウイルス感染では肺に好酸球浸潤を示さなかった。どちらも成分としてN蛋白を含んでいることから、副反応を誘導する潜在的可能性に違いはないはずである。では何故、結果は異なるのか？これを立脚点とし、(1)ウイルスと

不活化ワクチンでは惹起する免疫応答に違いがある、(2)Cytotoxic T cell (CTL)活性は感染防御と副反応の軽減に寄与する、(3)誘導される中和抗体の質的な違いは感染防御と副反応の重症度に寄与するという3つの仮説を構築し、これを検証することで有効な不活化ワクチンの開発、そして不活化ワクチンによって誘導されるアレルギー様の副反応のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) ウイルス感染を模倣した不活化ワクチンの免疫効果と副反応の検討

UV不活化ウイルス粒子(UV-V)、水酸化アルミニウム(Alum)添加UV-V(UV-V+Alum)、あるいはLPS, PolyI:C, PolyU添加UV-V(UV-V+TLR)を約15週齢のBALB/cマウスに6週間隔で2回皮下免疫した。最終免疫から8あるいは10日でマウス馴化SARS-CoV(FmusX)を経鼻接種し、感染3、10日目に採取した材料についてウイルス量、病理学的解析、サイトカイン量の測定、また肺のRNAを抽出しマイクロアレイ解析を行った。

(2) 中和抗体の感染防御効果と副反応の関連性について

ウイルス感染前に別途準備したSARS-CoV感染マウス血清、UV-V免疫マウス血清あるいはUV-V+TLR免疫マウス血清をNaiveマウスに腹腔内投与した。また対照群にはUV-Vを15週齢のBALB/cマウスに6週間隔で2回皮下免疫し、ウイルス感染前にSARS-CoV感染血清あるいはUV-V+TLR免疫マウス血清を腹腔内投与した。血清投与から3時間後にFmusX

(10LD₅₀)を経鼻接種した。ウイルス感染後3, 10日目で材料を採取し、ウイルス量、病理学的解析を行った。

(3) Cytotoxic T cell (CTL)活性の感染防御効果と副反応の関連性について

UV-Vを15週齢のBALB/cマウスに6週間隔で2回皮下免疫し、最終免疫7日後に免疫群および非免疫群それぞれに抗CD4抗体、抗CD8抗体あるいはIsotype controlを一日おきに3回腹腔内投与し、CD4枯渇群、CD8枯渇群、対照群とした。抗体の最終投与1日後にFmusX(10LD₅₀)を経鼻接種し、10日間の臨床観察を行った(一群10匹)。感染3, 10日目に材料を採取し、ウイルス量、サイトカイン量、病理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ウイルス感染を模倣した不活化ワクチンの免疫効果と副反応の検討

非免疫群は重度のび慢性肺胞傷害の組織像を示し致命的となった。免疫群はいずれも肺胞傷害はみられず、3日目の肺感染局所で血管周囲の軽度な好酸球浸潤がみられた。さらに10日目にはUV-VおよびUV-V+Alum免疫群の肺では好酸球浸潤が顕著であった。一方で、UV-V+TLR免疫群では10日目には好酸球は殆ど見られなかった。これらの免疫群の肺のサイトカイン量を比較した結果、UV-V免疫群ではEotaxin, IL-4, IL-13など好酸球誘導に関するTh2サイトカインが他の免疫群より高い傾向にあった。またマイクロアレイの結果はUV-V+TLR群でTLR下流の遺伝子が有意に発現していることが分かった。

SARS-CoV不活化ワクチン免疫はマウスにおいて感染防御効果を示したが、UV-V単独免疫後のマウスにSARS-CoVが感染すると、局所の好酸球浸潤が観察される。これは、感染後にTh2サイトカインが優位に発現することが原因と考えられた。UV-V+TLR群ではTLR下流の遺伝子がUV-V単独免疫群よりも有意に発現しており、これによりTh1へバランスが傾き、好酸球浸潤を軽減していると考えられた。これらのことから、UV-V免疫後のウイルス感染で肺局所に好酸球が浸潤する現象はアジュバントを工夫することで軽減される可能性があること示唆された。

(2) 中和抗体の感染防御効果と副反応の関連性について

UV-V免疫マウスがウイルス感染後に肺局所に好酸球が浸潤してくる現象について、免疫後の何が引き金となっているのかを究明するため、まず免疫後に産生される血清中の中和抗体と好酸球浸潤との関連性について調べた。

NaiveマウスにSARS-CoV感染マウス血清、

UV-V免疫マウス血清あるいはUV-V+TLR免疫マウス血清を投与した。これらの群はウイルス感染後の体重変化は見られず、抗血清が感染を防御に効果を示していた。そして、これらの群では感染後の肺局所に好酸球の浸潤は見られなかった。一方、UV-V免疫マウスに各種血清を投与したマウスはウイルス感染後の体重変化は見られなかったが、肺局所に好酸球浸潤を示した。この結果から、UV-V免疫で誘導された中和抗体は感染防御に働くが、ウイルス感染後の好酸球浸潤に関与している可能性は低い事が明らかとなった。

(3) Cytotoxic T cell (CTL)活性の感染防御効果と副反応の関連性について

中和抗体と好酸球浸潤の関連性は否定されたため、次はCTLおよびメモリーT細胞とUV-V免疫マウスのウイルス感染後の肺局所での好酸球浸潤の関連性を調べた。

UV-V免疫マウスはCD4, CD8枯渇群ともに、ウイルス感染後の体重変化は見られず観察期間中、生残した。しかし、非免疫群では重度の体重減少が見られ、感染5-6日目に全個体瀕死となり安楽殺した。組織学的にUV-V免疫群は急性肺障害の像を呈さなかったが、血管周囲に好酸球を含む炎症細胞の浸潤が見られた。この細胞浸潤はいずれの枯渇群でも見られ、その浸潤細胞数も枯渇していないUV-V免疫群と有意差はなかった。サイトカイン発現はUV-V免疫群3群の中で有意差は見られなかった。

UV-V免疫後にCD4およびCD8陽性T細胞を枯渇しても、感染後の肺の好酸球浸潤は誘導され、サイトカイン発現に差が見られなかったことから、この現象にメモリーT細胞は、関与していないと考えられた。今回の結果から、UV-V免疫個体でSARS-CoV感染後に惹起される肺の好酸球浸潤は、UV-V免疫によって産生された抗体やメモリーT細胞でもない事が明らかとなった。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tseng CT, Sbrana E, Iwata-Yoshikawa N, Newman PC, Garron T, Atmar RL, Peters CJ, Couch RB. Immunization with SARS Coronavirus Vaccines Leads to Pulmonary Immunopathology on Challenge with the SARS Virus. PLoS One. 査読有, 2012;7(4):e35421.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 岩田奈織子, 永田典代, 辻 隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 佐多徹太郎 :

SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応について。第 99 回日本病理学会、2010 年 4 月 28 日、東京

- ② 岩田奈織子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、宇田晶彦、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎：SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の副反応について。第 58 回日本ウイルス学会、2010 年 11 月 8 日、徳島
- ③ 岩田奈織子、永田典代、鈴木忠樹、佐藤由子、横田恭子、西條政幸、森川茂、長谷川秀樹：SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の副反応発生機序について。第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月 14 日、大阪

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 奈織子 (Iwata Naoko)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：10360695