

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660226

研究課題名(和文) PRRS感染耐過ブタ由来ファージ抗体ライブラリを用いた中和エピトープの探索

研究課題名(英文) Neutralizing epitope(s) recognized by the pigs endured PRRS through phage display

研究代表者

五十嵐 樹彦 (Igarashi, Tatsuhiko)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：90467431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PRRSV感染耐過ブタの肺門リンパ節細胞からcDNAを合成し、抗体分子の可変領域をコードするDNA断片を直鎖状に連結した分子(scFv)をファージミドベクターに組み込みライブラリを作製した。また、ウイルス粒子を抗原とするELISAの系を構築した。作製したライブラリ(約百万クローン)からパンニング法によるスクリーニングを3回試みたが、PRRSV抗原に結合する抗体分子を選択することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：The cDNA was synthesized from the hilar lymph node cells of PRRSV infected and protected pig. The molecules of DNA fragment coding for the variable regions of antibody was ligated into the linear molecules (scFv) to prepare a library into a phagemid vector. In addition, the virus particles to construct a system of ELISA to the antigen. From the library (about one million clones) three attempts to screening by panning, but it was not possible to select an antibody molecule that binds to a PRRSV antigen.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス ブタ ワクチン 抗体 ファージディスプレイ 中和 ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

PRRS は大きく 2 つの遺伝子型(ヨーロッパ型および北米型)に分けられるが、我が国においては北米型の特定の遺伝子亜型が流行していることが知られている。本ウイルスは遺伝的多様性が非常に大きいことが知られており、ワクチン開発の障害となっているが、受身免疫により感染防御することが報告されており、適正な指向性および力価の中和抗体が誘導出来れば制御が可能である。

しかし、本ウイルス研究におけるウイルス中和は未整理な状況と言わざるを得ない。ウイルス粒子上にはウイルスタンパク M および GP5 の複合体(M/GP5)、GP2、GP3 および GP4 が発現しており、発現頻度が最も高い M/GP5 がウイルス中和エピトープを持つとの報告が多数あるが、他の蛋白にも中和エピトープが見いだされている。一方で、M/GP5 中和エピトープに対して誘導した抗体が中和活性を持たなかった例も報告されており、統一した見解がない。これらの研究の多くは中和エピトープを含むと想定される蛋白を免疫して抗体を誘導し、その抗体に中和活性がある事を示す実験方法であり、実際の感染制御に役立つ抗体を選び出したのではない。

また、ウイルス中和試験にはサル腎臓上皮由来細胞(MARC-145)が広く用いられているが、この細胞には本ウイルスの標的細胞への接着に関わる分子(CD169)が発現しておらず、個体感染における第一の標的細胞であるブタ初代肺胞マクロファージ(PAM)を用いた中和試験と結果が異なる事も最近報告されている。

最終的には感染防御に役立つと考えられる抗体を誘導可能な免疫原を用いた抗 PRRS サブユニットワクチンの開発を目標としているが、本研究計画ではそのための免疫原の同定を我が国で流行している遺伝子亜型に関して行う。

本研究計画は感染耐過個体が誘導した抗体のファージディスプレイライブラリを、肺胞マクロファージを用いたウイルス中和試験で評価する事により、実際の感染で働く中和抗体の選別およびその認識エピトープの同定を目指している。従って、先行研究とは逆向きに探索を行うことが特色といえる。

本研究計画が推進された場合、PRRS ウイルスの実際の感染制御において重要な中和エピトープが同定される。このエピトープを基にしたサブユニットワクチン開発の道を拓くことで、現在、養豚産業に世界的規模で甚大な経済的損失を引き起こしている PRRS の制御が可能となり、我が国、ひいては世界の食の安全、安定供給が期待できる。

申請者は、PRRS は抗体によって感染防御可能だが、先行研究では有効な抗体の標的の検索方法に再考すべき点があったため、有効な免疫原が同定されていないと考えている。従来、PRRS の中和エピトープの検索には、

1) 中和エピトープを持つと想定されるタ

ンパクを動物に免疫して抗体を作製し、その抗体の中和活性を示す

2) ウイルスの細胞表面への接着に関わる受容体である、CD169(sialoadhesin または siglec-1)を発現しないサル腎由来 MARC-145 細胞を用いて中和試験が行われてきた。その結果、多くのウイルス蛋白が見かけ中和エピトープを持つと報告されてきた、と考える。

感染耐過個体が誘導した中和抗体を検索する事で、感染制御に本当に重要な抗体およびその認識部位を見出すことができると考える。先行研究と比べ、アプローチが逆向きであること、抗体の中和活性を検索するために MARC-145 ではなく PAM を用いることから簡単な研究ではない。また、現在の知見はもっぱら欧米の分離株を用いた研究で蓄積されており、我が国における流行株に適用できるかは不明である。従って、本邦の PRRS 流行制御のためにも日本流行株を用いた本格的な検索の必要がある。

本研究計画の要所は、コロブスの卵のようであるが「実際に起こった感染を耐過した個体から学ぶ」点が先行研究とは異なっている。

PRRS は世界的に発生しており、我が国の調査では一農場で一回の発生があると最低 1500 万円の経済的損失を引き起こすと見積もられている(山根ら、2009)ことから、養豚産業にいかに大きな損失を引き起こしているか容易に想像できる。

すでに弱毒生ワクチンが市販されているものの、ワクチンが免疫個体から非免疫個体に水平伝播した例や病原性の復帰が疑われた例などが報告されている。また、ワクチン接種によって免疫個体の臨床的 PRRS は有効に抑制されたものの、その個体におけるウイルス複製は抑制されなかったことが報告されており(奥田ら、2009)、ウイルス伝播制御の点で問題が残っている。そのため、複製しないサブユニットワクチン等を用いることがよいと考えられる。

本研究が成功した場合、個体感染において真に重要なウイルス中和エピトープが同定され、それを免疫原としたワクチン開発への道が開かれ、より安全で安価な豚肉が安定的に供給可能となることが期待される。

感染耐過ブタからの血液採集に関しては、ブタに最もストレスの少ない方法を用いる。

また、血液試料分与者の情報については、分与者と合意の上、公表の可否を決定する。

生ウイルスを扱う実験(抗原の調製および中和試験)は生物災害レベル 2(BSL-2)以上の実験室で行う。本研究計画では動物への接種試験及び感染防御試験は行わない。

申請者は長年ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の病原性に関する研究を、サルモデルを用いて行ってきたが、PRRS ウイルスと HIV に共通した生物学的性状(易変異性及び遺伝的多様性の大きさ、マクロファージ指向性)および制御のむずかしさに興味を持ち、本研究計画

を立案した。従って、PRRS 研究の環境を整備する必要がある。

2. 研究の目的

ブタ繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) は、現在、世界的規模で養豚産業に最も甚大な経済的被害をもたらしているウイルス性疾患である。抗 PRRS 弱毒生ワクチンが存在するものの、著効を示しているとは言いがたい。妊娠ブタ及び肥育ブタが本ウイルス (PRRSV) に感染すると繁殖障害、間質性肺炎を伴う発育不良等重篤な病態を呈するが、成ブタでは呼吸器症状を呈するものの、耐過することが知られている。また、感染耐過ブタの血漿から調整した抗体の受動免疫で PRRSV の感染防御が可能なる事も知られている。この感染防御抗体分子が認識する抗原決定基を同定する事で、個体感染の文脈においてウイルス複製抑制に真に有効な免疫原を明らかにできると考えた。本研究の目的は、感染耐過ブタに誘導された抗体を詳細に解析することで、より有効な抗 PRRSV ワクチンの免疫原を明らかにすることである。

3. 研究の方法

野外の PRRS 耐過ブタから採血し、リンパ球の RNA を抽出する。抗体 VH および VL 遺伝子を RT-PCR 増幅し、M13 ファージのコート蛋白との融合蛋白として発現させたファージディスプレイライブラリーを構築する。単鎖可変領域フラグメント (scFv) を用いてブタ肺胞マクロファージでウイルス中和試験を行い、中和活性のあるフラグメントを選択する。選択されたフラグメントの認識蛋白を、可溶性ウイルス粒子を抗原とした免疫沈降法で同定する。同定された蛋白のペプチドセットを合成し、反応エピトープを同定する。

1) PRRS 耐過ブタからの血液採集：

我が国においても PRRS は全国的に流行しているため、家畜保健衛生所、農業協同組合等に協力を仰ぎ、複数の野外 PRRS 耐過ブタへパリン加血液試料 (10ml) の分与を受ける。

2) 抗体の重鎖および軽鎖遺伝子相補的 DNA の調製：

血液から型通りリンパ球を調製し、総 RNA を抽出する。遺伝子データベース (GenBank) に登録されているブタ免疫グロブリン遺伝子配列を参考にプライマーを設計し、RT-PCR により相補 DNA を調製する。

3) scFv DNA のディスプレイベクターへのライゲーション：

両遺伝子断片をリンカー DNA で結合した scFv DNA をアセンブリー PCR により構築し、市販のファージミドベクターにライゲーションする。

4) ファージ抗体ライブラリーの構築：

組み換えファージミドベクターで大腸菌を形質転換し、ヘルパーファージを重感染してファージ抗体ライブラリーを構築する。

5) ウイルス蛋白特異的なファージの選択：

細胞培養で大量調製したウイルス粒子をポリエチレングリコール濃縮し、ウイルス抗原を調製する。ウイルス抗原を 96 穴プレートにレクチンを介して固相化し、抗ウイルス抗体検出 ELISA 系を構築する。ライブラリーをこの系に適用し、反応性のファージをバイオパニング法で選択、濃縮する。

6) 標的ウイルス蛋白の同定：

得られたウイルス蛋白特異的ファージをクローン化した後、scFv 遺伝子を単離し、FLAG 融合タンパク質として発現させる。ウイルス粒子抗原を FLAG 融合 scFv により免疫沈降し、認識ウイルス蛋白を同定する。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の条件を還元および非還元条件下で行い、単量体蛋白を認識するか、あるいは複合体 (多量体) を認識するか明らかにする。

7) ウイルス中和 scFv の選択：

PAM を用いた中和試験により、ウイルス蛋白特異的 scFv の中からウイルス中和活性のあるクローンを選択する。scFv を発現させ、我が国で分離された PRRS ウイルスと反応させたのち、肺胞マクロファージ培養に接種する。48 時間後の培養上清中のウイルス RNA から相補 DNA 合成し、リアルタイム PCR で定量して中和活性を判定する。50% 以上のウイルス粒子産生抑制効果を以て中和活性とする。

8) 線形エピトープの検索：

ウイルス中和 scFv を標的蛋白由来ペプチドを固相化した ELISA により検索し、エピトープを同定する。scFv がペプチドと結合しなかった場合、1 次構造を認識しないと判定される。その場合、標的蛋白の変異体 (特定ドメイン、糖鎖等の欠失変異体) を発現・精製し、レクチン等を介して固相化して ELISA を行い、認識エピトープを絞り込む。

9) PRRS ウイルス感染性分子クローンの構築：

8) で変異体蛋白の発現が必要になることを見越し、ウイルスゲノム相補的 DNA クローンを構築する。本邦において分離された PRRS ウイルスを PAM で調製し、ウイルス粒子由来 RNA を調製、相補的 DNA を得る。本ウイルスに関する既報の塩基配列を参考にプライマーを設計し、3 キロ塩基長までのサブクローンを PCR で増幅し、サブクローンを結合して全長のクローンを得る。相補的 DNA を哺乳類細胞で機能するプロモーター配列下に配置し、細胞へ遺伝子導入してウイルス粒子を産生させる。PAM で感染性の確認された分子クローンから標的蛋白遺伝子を制限酵素切断し、発現プラスミドにライゲーションし、変異体作製に備える。

10) ウイルス蛋白変異体の発現：

8) で線形エピトープが同定できなかった場合、9) で作製した感染性 PRRS ウイルス分子クローンから標的蛋白遺伝子をサブクローニングし、特定のドメインの欠失、糖鎖の欠失等の欠失変異体を作製し、発現ベクターに組み込む。発現変異体蛋白と中和 scFv の

反応を免疫沈降により検索する。

4. 研究成果

弱毒化 PRRSV を免疫後、野生型ウイルスの攻撃接種を感染防御した成ブタの感染5週後の肺門リンパ節細胞から総 RNA を抽出し、オリゴdTをプライマーとしてcDNAを合成した。抗体分子の重鎖および軽鎖(鎖および鎖)の可変領域をコードする DNA 断片をポリメラーゼ連鎖反応法により増幅し、リンカー配列を介して直鎖状に連結した分子(scFv)を合成した。これをファージミドベクター(pComb3XSS)に組み込みライブラリーを作製した。また、ウイルス抗原を 96 穴プレートにレクチンを介して固相化し、抗ウイルス抗体検出 ELISA の系を構築し、感染ブタの抗体と反応することを確認した。作製したライブラリー(約百万クローン)からウイルス粒子抗原に結合する性質を持つ抗体分子を選択するためにパンニング法による一次スクリーニングを3回試みたが、PRRSV 抗原に結合する抗体分子を選択することはできなかった。今後の改善点としては、ELISA で抗体価の高い感染耐過ブタを選択して試みたり、ELISA の反応系や抗体ライブラリーの質とサイズの改善を行うことが考えられる。

PRRS ウイルス感染性分子クローンの構築に関しては、本邦において分離された PRRS ウイルスを PAM で調整し、ウイルス粒子由来 RNA を調整した。この調整した RNA を鋳型として相補的 DNA を得た。本ウイルスに関する既報の塩基配列を参考にしてプライマーを設計し、約 3 kb の DNA 断片として PRRS ウイルスの全ゲノム領域をカバーするように5つのフラグメントとして PCR 増幅することに成功した。これら5つの断片のうち最も上流をカバーする断片を、哺乳類細胞で機能する CMV プロモーター配列下に配置し、他の4つのゲノム断片と共に、293T 細胞に遺伝子導入することにより、細胞内組換えによって感染性のウイルスが培養上清中に産生されることを期待したが、期待に反し残念ながら感染性のウイルスを得ることはできなかった。各相補的 DNA 断片の品質等の確認が必要と考えられる。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

五十嵐 樹彦(IGARASHI, Tatsuhiko)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号： 90467431

(2)研究分担者

(3)連携研究者