

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：74412

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860304

研究課題名(和文) 広域反応性ウイルス中和抗体のエピトープの構造に着目したワクチンのデザイン

研究課題名(英文) Design of vaccine antigen focused on the epitopes recognized by broad neutralizing antibodies

研究代表者

井上 雄嗣 (Inoue, Yuji)

一般財団法人阪大微生物病研究会・研究部 探索研究課・主任

研究者番号：90548869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、インフルエンザウイルス抗原蛋白質HAの保存性の高い「ステム領域」に着目し、その領域への露出度を高める事によって広範囲のウイルス株に対して免疫原性を持ったワクチン抗原を構築する事を目的とした。

まず、組換えHA蛋白質発現系の構築に取り組んだ。得られた精製HAの頭部領域をビオチン-ストレプトアビジン結合を介してマイクロビーズに固定する事により、本来隠れているステム領域が表面に露出した抗原粒子を作製した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to construct a vaccine complex to protect infection from a broad range of influenza viral strains. Here we focused on the "stem region" in the hemagglutinin protein on the surface of influenza virion. The stem region is known to be less-variable but less-accessible compared to another part called "head region". To increase accessibility of the stem region, we prepared recombinant HA proteins and tried to bind them onto the surface of nanoparticles through the head region, on which HA molecules are inverted to expose the stem region.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ワクチン インフルエンザ

## 1. 研究開始当初の背景

現行のインフルエンザワクチンは、ウイルス表面に突き出た、ヘマグルチニン (HA) と呼ばれる抗原蛋白質を主な標的として、いくつかの形態で製造されている。ワクチンによって誘導される HA の中和エピトープは主に先端の頭部領域に集中している。しかし、この領域は変異の頻度が高く、中和抗体が誘導されてもやがてエスケープ変異を獲得した耐性株が出現してしまい、ワクチンで得られた感染防御効果は長く続かない。この事が主な要因となって、インフルエンザの流行株が常に変動し、毎年のように流行株の予測やワクチン製造株の検討が行われている。

一方、頭部領域に隠れて露出度の低い、「ステム領域」は概ね保存性が高い。ステム領域を認識する中和抗体について多数の報告があり、全体としてそれらは幅広いウイルス株を中和するという傾向が見られる。したがって、ステム領域を認識する抗体を効率的に誘導する事は、広範囲のウイルス株に対して長期間持続する感染防御能の獲得につながる事が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルス HA 蛋白質の保存性の高いステム領域に注目し、その露出度を高めた抗原複合体を作製する。その手段として、三量体 HA の組換え体を発現および精製し、精製物の頭部領域をビオチン修飾してストレプトアビジンマイクロビーズに結合する。これによって、本来のウイルス粒子上の HA 分子とは天地が反転した状態の抗原複合体が形成される事が期待される。

このモデル抗原をマウスに接種し、免疫によって得られた血清を用いたウイルス中和試験、免疫動物に攻撃ウイルスを接種しての感染防御試験などを行い、効果を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) ウイルス中和試験法の検討

ワクチン接種によって得られた検体のウイルス中和能を評価するため、フォーカスアッセイと呼ばれる試験方法に注目し、その改良を行った。検討には、主に季節性インフルエンザワクチンを接種したマウス血清を検体として用いた。これを RDE 処理した後、インフルエンザ攻撃ウイルス液とインキュベートし、あらかじめ 96 ウェルプレートで培養した MDCK 細胞に作用させた。培地交換で遊離のウイルスを除去した後、一晚培養し、抗インフルエンザ NP 抗体で免疫染色した。発色には DAB または AEC 試薬を用いた。感染細胞のカウントは目視での検鏡によって行うのが一般的であるが、自動カウントを可能にすべく、ELISPOT リーダーを活用して、測定条件・検出パラメータなどの最適化を試み

た。

### (2) 抗原発現系の構築

インフルエンザウイルス (A/H1N1 pdm09 および A/H3N2 型) より HA 遺伝子をクローニングした。C 末膜貫通領域を除き、三量体安定化のための CGN4 配列、検出および切断のための Flag 配列、精製のための Strep-tag または His-tag 配列を順に付加した。これを大腸菌発現プラスミド pCold1、プレバチルス発現プラスミド pNCM02、哺乳類培養細胞発現プラスミド pHEK293 にサブクローニングした。

### (3) 抗原蛋白質の発現

大腸菌発現では、発現プラスミドを用いて *E. coli* Origami (DE3) pLysS 株をトランスフォームし、LB(+Ampicillin) 培地で 37 培養した。OD(600)=0.5 付近で IPTG を添加 (最終 0.1 mM) して 15 で 1 晩振盪培養し、菌体を回収した。

プレバチルス発現では、発現プラスミドを用いて *B. choshinensis* SP3 株をトランスフォームし、2SY(+Neomycin) 培地に 30 振盪培養し、2 日後に菌体と培養上清を回収した。

哺乳類培養細胞発現では、発現プラスミドを用いて Expi293F 培養細胞に対しトランスフェクションを行った。これを Expi293 expression medium 中で 37、8% CO<sub>2</sub> 条件下で 5 日間程度振盪培養し、細胞と培養上清を回収した。

それぞれの発現系での細胞 (菌体) 破砕液および培養上清を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色ならびにウェスタンブロッティングにより発現状態を確認した。

### (4) 抗原蛋白質の精製

Strep-tag を付加したものについては、発現が確認された分画を Strep-Tactin カラムを用いて精製を行った。His-tag を付加したものについては、同様に Ni-sepharose カラムを用いて精製を行った。

### (5) 抗原蛋白質の化学修飾と抗原粒子調製

精製した HA の糖鎖に対し、Hydrazide-biotin を用いてビオチン修飾を行った。これをストレプトアビジンマイクロビーズ (100 nm) に結合した。

## 4. 研究成果

### (1) インフルエンザウイルス中和試験

抗原調製に先行して、ウイルス中和試験法の検討と改良を行った。

インフルエンザワクチンの有効性評価の方法としては、古くから行われているプラークアッセイや細胞変性効果 (CPE) を指標とした TCID 法などがある。それぞれの方法は信頼性の高さや必要検体量が抑えられるといった長所があるが、それらを兼ね備えた方法

として、フォーカスアッセイと呼ばれる試験法に注目し、これを改良した。フォーカスアッセイは、免疫染色されたウイルス感染細胞をカウントするウイルス定量法に基づいており、信頼性が高い。また培養面積の小さい96ウェルプレートを用いる事ができる事から、検体量を抑えることができる。また、最短で2日で結果が得られ、4-5日を要するTCID法と比較して優位である。しかし、マイクロプレートを用いる事に検鏡し、感染細胞数を計数するという作業が必要であるため、作業者の負担が重く、多検体処理には向かないという難点があった。これを克服するため、ELISPOTリーダーを用いたカウントの自動化を中心に試験条件の検討を行い他の測定法との比較をおこなった。

TCID法で得られた中和抗体価は、ウイルス感作後の子孫ウイルスの放出を許すため、培養日数が長くなるに従って次第にCPEが拡大し、本来理想とする50%中和抗体価ではなく、100%中和抗体価に近い値となる傾向がある。今回試みたフォーカスアッセイは、ウイルス培養を短時間にし、子孫ウイルス放出を抑えた条件で行っており、長時間培養による感染細胞数の変動が少なく、50%中和抗体価が精度よく求められる。この原理上の違いのため、フォーカスアッセイで得られた中和抗体価はTCID抗体価と比較して概ね4-16倍高い値となった。この改良されたフォーカスアッセイによる中和試験法は、本研究のみならずインフルエンザワクチンの有効性評価の方法として広く有用であると考えられる。

#### (2)組換えHA蛋白質の発現と精製

組換え蛋白質の発現宿主として、分子構造形成や翻訳後修飾など天然状態に近い組換え体が得られる事が期待される哺乳類培養細胞での発現を行ったが、大量の発現量が期待される大腸菌、また培地中への高効率な分泌発現が可能とされるブレバチルス宿主とした発現系も検討することにした。これらについてそれぞれ発現系を構築し、発現状態を確認した。

大腸菌に関しては、ほとんどが菌体破碎液の不溶性画分に発現しており、リフォールディングおよび三量体形成は難しいと判断した。

ブレバチルスに関しては、培地中への分泌発現を期待したが発現量が少なく、これも断念した。

哺乳類培養細胞での発現は、組換え蛋白質の発現宿主として近年開発されたExpi293F細胞を用いた。発現プラスミドでトランスフェクトしたExpi293F細胞の培養後の細胞破碎液ならびに培養上清をウェスタンブロットング解析したところ、多くが培養上清に分泌発現していることが確認された。当初、精製用にstrep-tagを付加していたが、strep-tactinカラムへの吸着が不十分で精製効率に問題があり、続く工程でストレプト

アビジンビーズと結合しないようにタグ切断が必要となる事から、精製用タグをHis-tagに変更し、Ni-sepharoseによる精製とした。この条件で、30mlの培養液あたり約0.1-0.3mgの組換えHAが得られた。培養のスケールアップにより、マウスへの接種実験には十分な量が確保できると考えられた。

これらの検討により、Expi293F細胞を発現宿主とした組換えHA蛋白質を用いる事にした。

#### (3)抗原複合体の作製

哺乳類細胞での発現によって得られた組換えHAは糖鎖付加されていると考えられるが、付加部位は主に頭部領域である。この糖鎖に対し、ピオチン修飾を行った。これをストレプトアビジンマイクロビーズに結合させた。これにより、STEM領域を粒子表面に露出させた抗原複合体を形成される。

#### (4)実験動物への免疫試験

作製したモデル抗原複合体を用いた実験動物への接種については、研究期間中に実施に至らなかった。今後これを実施し、研究結果について発表・報告する予定である。

#### 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 1件)

井上雄嗣、他 「インフルエンザワクチンの有効性評価法としてのフォーカスウイルス中和試験法の検討」、第19回日本ワクチン学会学術集会、2015年11月14日-15日、犬山名鉄ホテル

〔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

井上 雄嗣 (INOUE, Yuji)  
一般財団法人阪大微生物病研究会・研究部  
探索研究課・主任  
研究者番号：90548869

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：