

pNJEMEはpcJEMEと同じレベルの抗体誘導能をブタに示すことが明らかにされた。今後は、pNGVL4aあるいは同等のベクターを用いたDNAワクチンを中心に研究を行う予定である。この意味で、本研究において攻撃実験や抗体持続期間を調べる実験はpNJEME免疫ブタのみで行った。

pNGVL4aは、ヒトイントロンを付加することにより発現量を高める工夫がなされたベクターである。したがって、pNJEMEはpcJEMEより高いレベルの抗体誘導能を示すことが期待された。しかし、ブタにおけるpNJEMEの抗体誘導能はpcJEMEと同等であった。pNJEMEとpcJEMEは、CHO-K1細胞における発現やマウスにおける免疫誘導能においても同レベルであった（本年度の同研究班分担研究報告書『ヒト用候補日本脳炎DNAワクチンの開発及びマウスにおける実験的評価』参照）。この結果は、JEVのシグナル/prM/E遺伝子カセットを組込んだpcJEMEの発現量が本来高いことに起因すると考えられる。

実験に用いたブタの頭数は少ないが、ジーンガンを用いた投与法は期待されるほどには高いレベルの抗体誘導を示さなかった。追加免疫直後には比較的高い抗体価を示したが、この抗体価は2週目に急激に低下した。一般的に報告されているように、この投与法は筋肉内接種に比較して、少量のDNAで有効に免疫を誘導することができる。本研究においても2.6ugのジーンガン投与が400ugの筋肉内投与に匹敵するレベルのHAI抗体を誘導した。しかし、2.6ugのジーンガン投与には、かなりの面積の皮膚炎を伴った。

攻撃実験は、JEVの感染に対する防御ではなく、抗原の投与に应答して誘導される特異抗体の上昇を調べる目

的で行った。本年度の同研究班分担研究報告書『日本脳炎 DNA ワクチン免疫マウスにおける防御機構：攻撃後の2次免疫応答』に詳述したように、マウスモデルにおいては攻撃後の2次免疫応答が防御に重要な役割を果たす。ワクチン免疫により誘導される記憶B細胞やヘルパーT細胞が因子になると考えられる。ブタにおいても、抗原投与後急激なHAI抗体上昇が認められ、pNJEME免疫による記憶B細胞及びヘルパーT細胞の誘導が示された。

動物用日本脳炎不活化ワクチンの1mlによる2回の接種により、最大で1:10のHAI抗体価しか誘導されなかった。この製剤に含まれるウイルス蛋白の免疫原性は、DNAワクチンの免疫原性に比較して、かなり低いものであることが推定された。何らかの理由で今回用いた製剤ロットの品質が損なわれたことが懸念された。しかし、攻撃実験において不活化ワクチンの2mlを投与した後に、pNJEME免疫ブタは8日目に1:2560のHAI抗体価を示し、不活化ワクチン製剤に含まれるウイルス蛋白の免疫原性は確認された。平行して攻撃した不活化ワクチン免疫ブタにおいては8日目に最大で1:80のHAI抗体価しか示さなかったことから、pNJEME免疫ブタにおける記憶B細胞による攻撃後のHAI抗体応答は、不活化ワクチン免疫ブタのそれより高いと考えられた。

E. 結論

日本脳炎ウイルス（JEV）のシグナル、前駆膜（prM）及び外被膜（E）遺伝子からなるカセットをpcDNA3及びpNGVL4aベクターに組込んで作製したプラスミド（pcJEME及びpNJEME）は、ブタにおいて中和抗体、HAI抗体及び記憶B細胞を誘導するこ

とが明らかにされた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K. and Mason P. W.: Anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* in press.

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I. and Mason P. W.: Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* 72, 4925-4930 (1998).

Konishi E., Kurane I., Mason P. W., Shope R. E., Kanesa-Thanan N., Smucny J. J., Hoke C. H. Jr. and Ennis F. A.: Induction of Japanese encephalitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by poxvirus-based JE vaccine candidates. *Vaccine* 16, 842-849 (1998).

2. 学会発表

小西英二、山岡政興、倉根一郎： Dengue DNA ワクチンのマウスにおける免疫誘導能。第2回日本ワクチン学会学術集会（1998）。

小西英二、山岡政興、高田和男、倉根一郎：日本脳炎DNAワクチンにより免疫したマウスにおける攻撃後の2次免疫応答。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会（1998）。

高田和男、正木秀幸、高崎智彦、小西英二、高橋光雄、倉根一郎：日本脳炎ウイルス特異的マウスキラーT細胞が認識するE蛋白上のエピトープの同定。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会（1998）。

Konishi, E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K., Mason P. W.: Secondary neutralizing antibody responses are a critical factor for protection in mice immunized with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. The 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science, 1998.

表 1. pNJEMEがブタに誘導するHAI抗体の持続期間^a

初回免疫後の 日数	HAI 抗体価			
	不活化ワクチン ^b		pNJEME ^b	
	#107 ^c	#108	#127	#128
28	1:10	<1:10	1:160	1:40
49	<1:10	<1:10	1:40	1:40
63	<1:10	<1:10	1:20	1:20
84	1:10	1:10	1:10	1:20
116	1:10	1:10	1:10	1:20
124	1:10	1:10	1:10	1:20

^apNJEMEを3週間隔で2回接種したブタ2頭及び不活化ワクチンを2週間隔で2回接種したブタ2頭を用いた。

^b免疫原。

^cブタ番号。

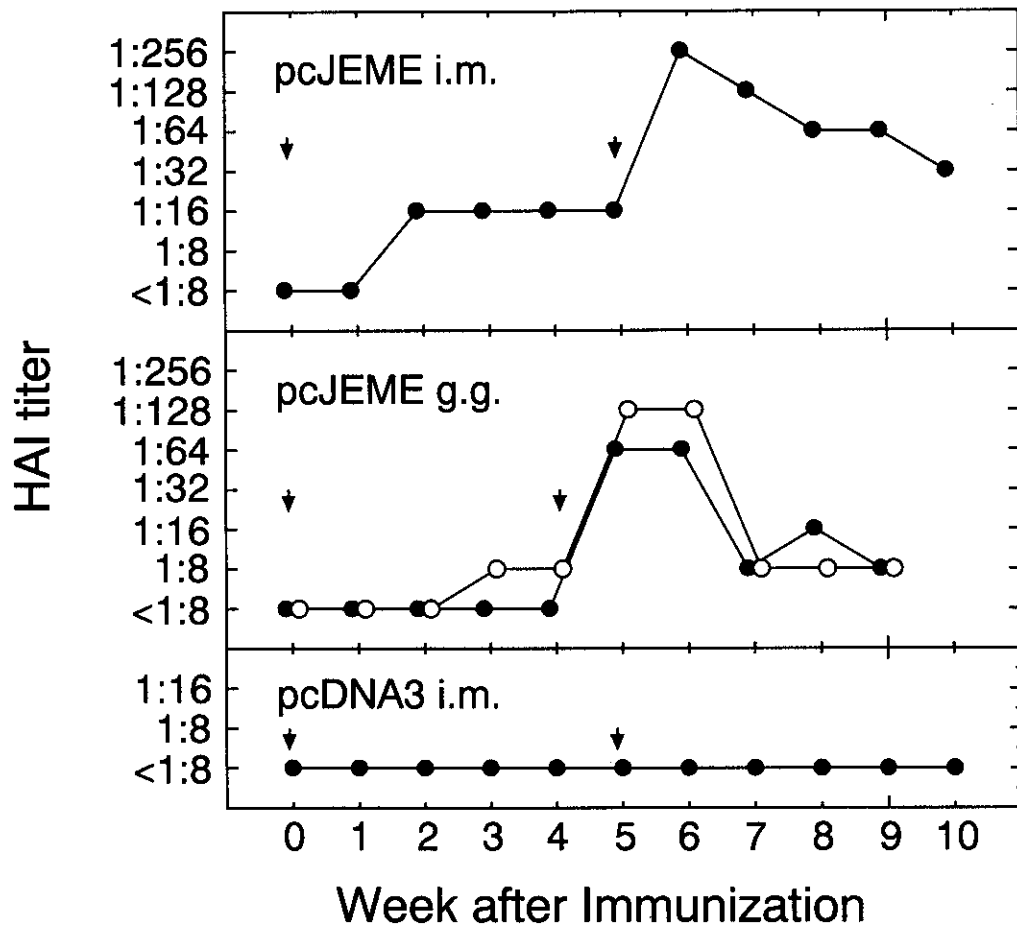


図1. pcJEME免疫ブタにおけるHAI抗体の誘導。筋肉内投与群 (i.m.) では、1頭のブタに400ugのpcJEMEを5週間隔で、またジーンガンによる投与群 (g.g.) では2頭のブタに1頭あたり2.6ugのpcJEMEを4週間隔で2回接種した。対照として、400ugのpcDNA3ベクターを5週間隔で2回筋肉内接種した。矢印は接種した週を示す。

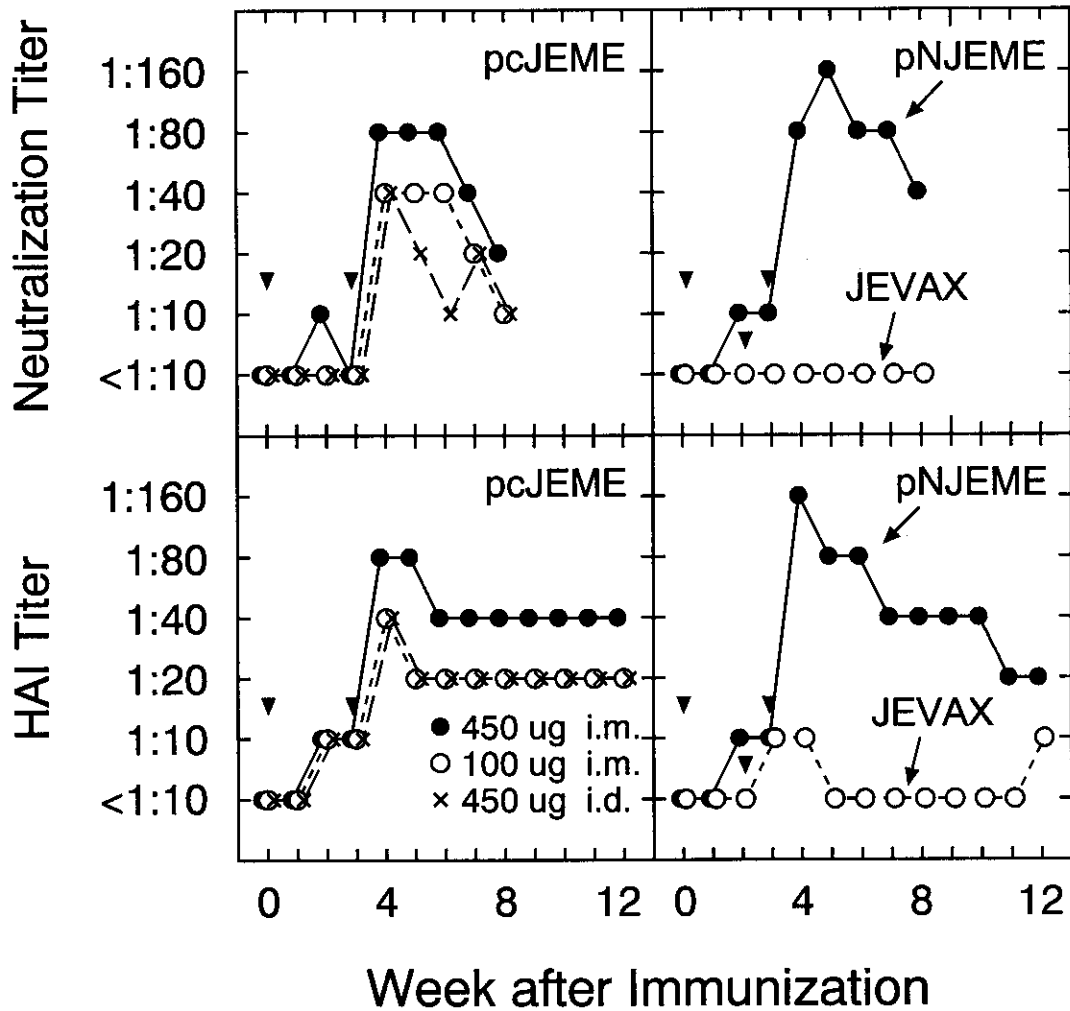


図2. pcJEME免疫ブタ及びpNJEME免疫ブタにおける中和抗体及びHAI抗体の誘導（抗体価の推移）。5頭を1グループとして、1頭あたり100ugまたは450ugのpcJEMEを筋肉内（i.m.）または皮内（i.d.）に、または450ugのpNJEMEを筋肉内に、3週間隔で2回接種した。対照として、1mlの不活化ワクチン（JEVAX）を皮下に2週間隔で2回接種した。矢頭は接種した週を示す。

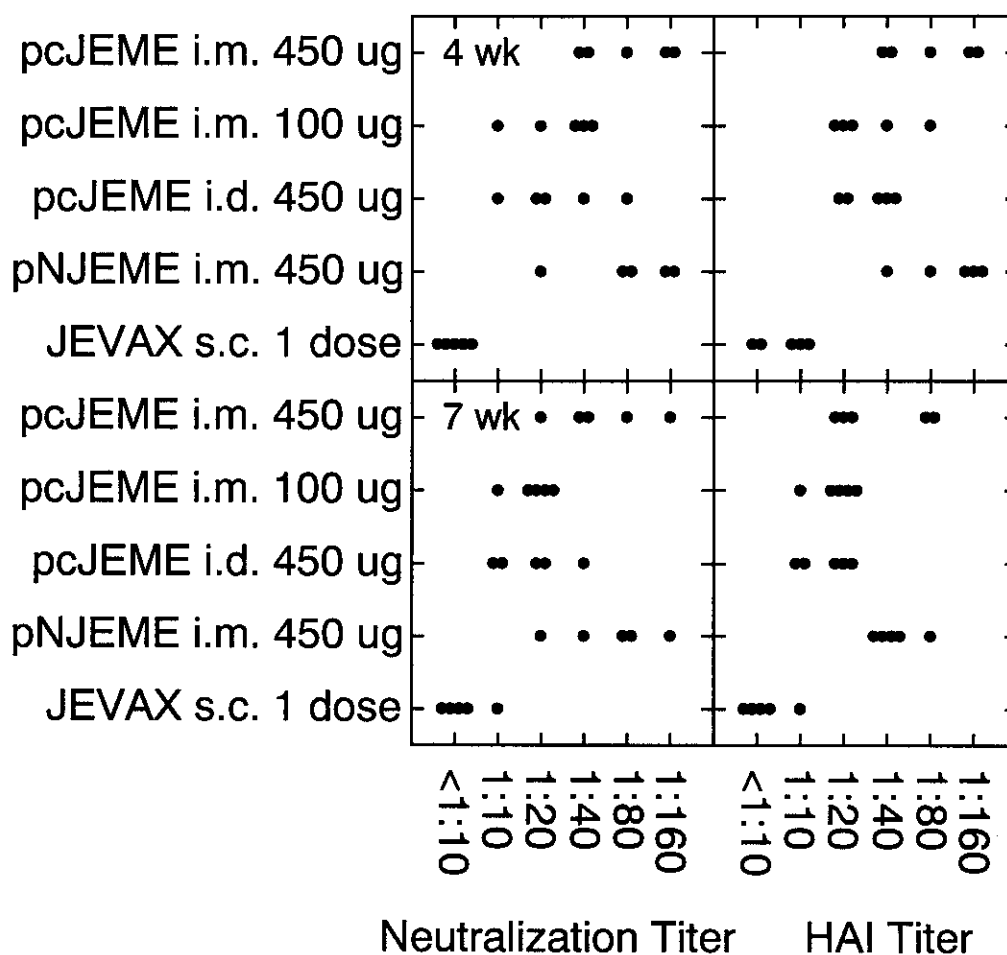


図3. pcJEME免疫ブタ及びpNJEME免疫ブタにおける中和抗体及びHAI抗体の誘導（初回免疫後4週目と7週目における個体別抗体価）。図2の説明参照。

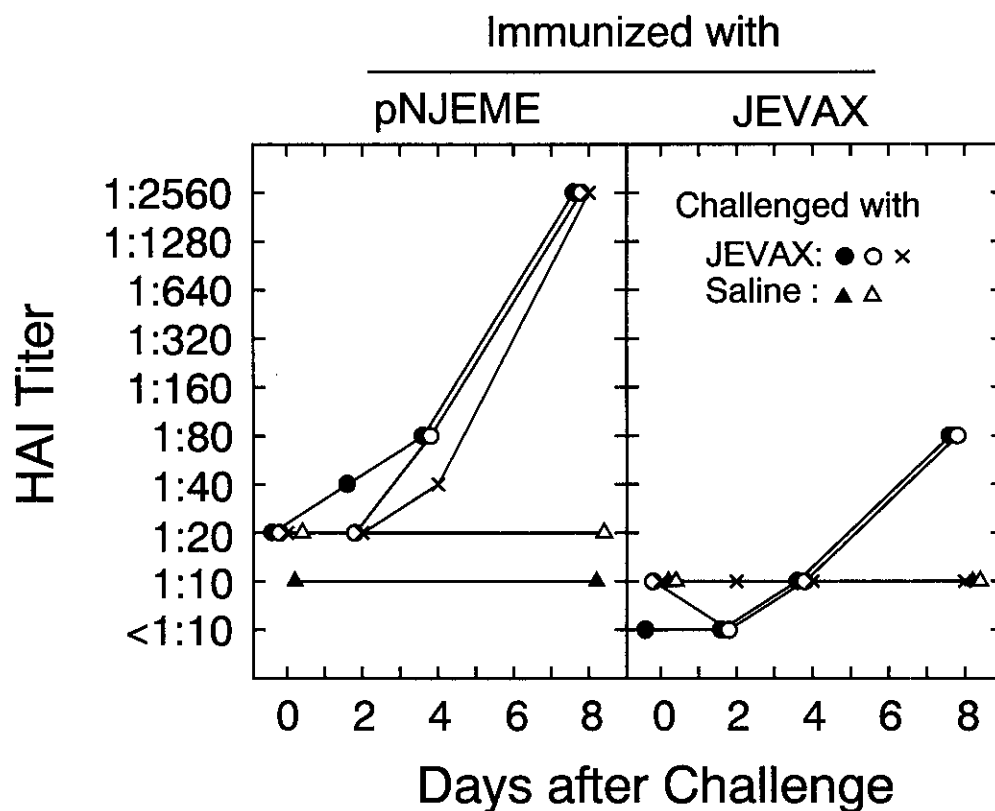


図4. 攻撃後のHAI抗体価の推移。450ugのpNJEMEを筋肉内に3週間隔で2回接種後14週目のブタ5頭、及び1mlの不活化ワクチン（JEVAX）を皮下に2週間隔で2回接種後15週目のブタ5頭を攻撃実験に用いた。それぞれのグループにおいて、3頭に2mlの不活化ワクチン（●、○、×）を、また2頭に2mlの生理食塩水（▲、△）を皮下に接種した後、2日目、4日目、及び8日目に採血し、HAI抗体価を測定した。

分担研究報告書

日本脳炎ウイルス細胞外粒子pr/M蛋白 切断部位における突然変異の導入

分担研究者 小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）

共同研究者 Peter W. Mason（米国プラムアイランド動物病センター）

研究要旨 現行の日本脳炎に対するワクチンや診断薬の製造に伴う危険性や高コストなどの問題点を解消するために、遺伝子工学技術の導入が有望視されている。プラスミドベクターを用いて、日本脳炎ウイルスのシグナル/prM/E遺伝子カセットを導入し、恒常的に細胞外粒子(EPs)を発現する細胞株の樹立は、安全で安価なウイルス蛋白を製造する1つの手段である。しかしEPsの細胞融合能が細胞株樹立の障害となっていた。本研究では、prMがfurinによってprとMに切断されることでEPsが融合活性をもつようになること、またfurinが特異的なアミノ酸配列モチーフを切断することに注目し、pr/M蛋白切断部位に人工的突然変異を導入したプラスミドを構築した。

A. 研究目的

現行の日本脳炎ワクチンは感染マウス脳由来の不活化精製ウイルス粒子ある。しかし、ワクチン製造には、多数のマウスを必要とし、また製造者に対する危険性、低精製度に基く副作用など、問題点は多い。また感染の診断には主に赤血球凝集抑制試験や補体結合試験が利用されるが、診断用抗原には感染マウス脳由来の抗原が用いられており、上記と同様の短所をもつ。これらの問題点を解消するために、遺伝子工学の技術を導入した新しいワクチンや診断薬の開発が望まれている。

日本脳炎ウイルスはフラビウイルス科に属するプラス鎖RNAウイルスで、ヌクレオカプシドを突起のある

エンベロープが包んでいる。ヌクレオカプシドには構造蛋白Cが、エンベロープにはMおよびEが含まれる。ウイルスゲノムには約10kbの唯一の読み取り枠が存在し、長いポリプロテインが合成された後、切断により各ウイルス蛋白が生成される。3種類の構造蛋白C、prM(Mの前駆体)、Eは5'末端側約1/4にコードされ、このうちprM、Eは小胞体で合成される糖蛋白で、それぞれの蛋白遺伝子の5'上流には疎水性のシグナルペプチドがコードされている。シグナルペプチド、prMおよびEはウイルスの粒子形成に重要な役割を果たす。ワクシニアウイルスをベクターとして、日本脳炎ウイルスprMのシグナル、prM、及びE遺伝子カセットを導入

した細胞は、prM/MおよびEを含むがヌクレオカプシドや核膜の存在しない空のウイルス様粒子(EPs)を放出することが証明されている。さらに、prMは細胞外へ放出されるまでの成熟過程で、ゴルジ体を通過する際にfurinという蛋白分解酵素によりprとMに切断され、粒子が融合活性をもつようになる。

EPsは感染性はないが、日本脳炎ウイルスと同様の免疫原性および抗原性、また赤血球凝集活性を示すことから、ワクチンや診断薬に適している。しかし、ワクシニアウイルスをベクターとしてJEVのシグナル/prM/E遺伝子カセットを細胞に導入する系においては、ワクシニアウイルス抗原の混入を避けることができない。そこで、プラスミドベクターを用いてJEVのシグナル/prM/E遺伝子カセットを導入し、恒常的にEPsを発現する細胞株を樹立することは、安全で大量の効果的ワクチンや診断薬の生産に貢献すると考えた。しかし、prMがprとMに切断されることにより細胞融合能をもつようになり、細胞外へ放出されたEPsは細胞膜に融合して融合細胞を形成したり、またEPsが細胞培養液中に効率よく回収できないという欠点も同時に考えられた。そこで、今回、細胞融合能をもたないEPsを産生させる系を確立することを目的として、furinにより切断されるアミノ酸配列モチーフに人工的突然変異を導入したプラスミドを構築することを目的とした。

B. 研究方法

プラスミド：pcDNA3ベクターにJEVのシグナル/prM/E遺伝子カセットを組み込んだpcJEME（昨年度の同研究班分担研究報告書『日本脳炎DNAワ

クチンの開発：マウスにおける防御免疫誘導』参照）を用いた。

PCR：図1に示したようにpcJEME上の4部位に対応するようにプライマーを作製した。この内、人工的突然変異を導入するpr/M切断部位に対応するprimer#2及びprimer#3の塩基配列を図2に示した。primer#2及びprimer#3は、本来の塩基配列とは異なる塩基配列にすることで、furinによる切断サイトから4つ上流のアミノ酸が本来のアルギニンからスレオニンに置換させると同時に、新しいSpeIサイトができるように設計した。これらのプライマーとpcJEMEを用いて、AmpliTaq DNA polymeraseにより突然変異を導入した遺伝子をPCRにより増幅した。PCRはGeneAmp PCR System（Perkin Elmer社）を用いて行った。

塩基配列の確認：ABI社のオートシーケンサー373Sを用いてシーケンシングを行った。

その他の遺伝子操作：制限酵素などの試薬はNew England Biolab社の製品を用い、標準法(Current Protocols in Molecular Biology)に基づき遺伝子操作を行った。ライゲーションは、Rapid Ligation Kit（ベーリンガーマンハイム社）を用い、トランスフォーメーションはDH5 α コンピテント細胞(Maximum Efficiency: Lifetech社)を用いて行った。また、DNAの精製には、Quantum DNA Purification Kit（BioRad社）を用いた。

発現実験：Transfectam（Biosepra）を用いてCHO-K1細胞をpcJEEPによりトランスフェクトした。23時間後に細胞を固定し、Eに対するモノクローナル抗体（J3-11B5）及びprMに対するモノクローナル抗体（J2-2F1）を用いて免疫染色した。

C. 研究結果

変異部分を含むインサートの作製：第1のステップとしてpcJEMEをテンプレートにして、primer#1、primer#2を用いてPCR①を、primer#3、primer#4を用いてPCR②をPCR産物として得た。第2のステップとしてPCR①、PCR②をテンプレートにしてprimer#1、#4を用いてPCR③を得た。同時にテンプレートとしてPCR①のみ、PCR②のみ、何も加えないものを同時にPCRし、pcJEMEが混入しなかったことを確かめた。PCR③およびpcJEMEを制限酵素EcoRIおよびEcoRVで切断した後、精製した。

変異を含むプラスミドの作製：ベクター(EcoRI/XbaI切断pcJEME)とインサート(EcoRI/XbaI切断PCR③)をライゲートして生成されたプラスミドを大腸菌DH5 α を用いて増殖させ、制限酵素EcoRI及びXbaIで切断してインサートをスクリーニングした。予想されるサイズのDNA断片をもつコロニーから、さらにSpeI及びEcoRIを用いて突然変異が導入されたコロニーを選別した。このようにして作製したプラスミドをpcJEEPと称した。pcJEEPにおけるインサート部分の塩基配列はシーケンシングにより、正しいことを確認した。

pcJEMEによるウイルス蛋白の発現：pcJEMEによりトランスフェクトしたCHO-K1細胞は、EあるいはprMに対するモノクローナル抗体により5%から10%の細胞が染色された。一方、対照として用いたpcDNA3ベクターによりトランスフェクトした細胞はいずれの抗体によっても染色されなかった。この結果はpcJEEPがCHO-K1細胞においてE及びprM抗原を発現したことを示す。

D. 考察

ウイルス表面蛋白がfurinによる切断を受けて活性化する現象は、種々のウイルスにおいて知られている。オクソミクスウイルス科のトリインフルエンザウイルスにおいては、furin切断モチーフであるアミノ酸RXXRを、人工的突然変異を導入してTXXRに置換することにより、HA蛋白の切断が阻止されている。我々は今回、フラビウイルス科である日本脳炎ウイルスprMの切断を阻止するためにRXXRからTXXRへの置換を試みた。

ウイルス蛋白を恒常的に発現する細胞株、いわゆるstable cell lineの樹立は種々のウイルスで報告されてきた。しかし、日本脳炎ウイルスのEPsに関しては連続発現系の樹立は困難を極めた。まず、CHO細胞に本来のシグナル/prM/E遺伝子カセットを導入したところ、発現は確認できたが、発現細胞が融合し分裂増殖できなかった。そこで次に、継代培養時にはEPsの発現を抑え、必要時に発現させるswitch on/offシステムを導入した。すなわち、Tet-off Gene Expression System (Clontech)を用いて、ウイルス蛋白の発現調節を試みた。しかし、この系では発現を抑える薬剤(doxycycline)の濃度が低いと発現を完全に抑えることができず、また濃度が高いと細胞自身が傷害を受け生育しなくなる、などの理由からEPs連続発現細胞樹立には至らなかった。このような背景の下に、今回は発現を抑えるのではなく発現蛋白の生物活性(融合活性)を抑えるという観点から変異プラスミド作製を試みた。発現EPsの融合活性は損なわれるものの、他の生物活性、すな

わち免疫原性、抗原性、赤血球凝集活性は本来のウイルス粒子と同等であることが、切断していないprMをもつEPsで証明されており、この系がワクチンや診断薬の開発に貢献すると考えられる。

E. 結論

pr/M蛋白切断部位に人工的突然変異を導入したプラスミド (pcJEEP) を構築した。恒常的に細胞外粒子を発現する細胞株の樹立に有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K. and Mason P. W.: Anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* in press.

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I. and Mason P. W.: Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* 72, 4925-4930 (1998).

Konishi E., Kurane I., Mason P. W., Shope R. E. Kanesa-Thanan N.,

Smucny J. J., Hoke C. H. Jr. and Ennis F. A.: Induction of Japanese encephalitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by poxvirus-based JE vaccine candidates. *Vaccine* 16, 842-849 (1998).

2. 学会発表

小西英二、山岡政興、倉根一郎：デングDNAワクチンのマウスにおける免疫誘導能。第2回日本ワクチン学会学術集会 (1998)。

小西英二、山岡政興、高田和男、倉根一郎：日本脳炎DNAワクチンにより免疫したマウスにおける攻撃後の2次免疫応答。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会 (1998)。

高田和男、正木秀幸、高崎智彦、小西英二、高橋光雄、倉根一郎：日本脳炎ウイルス特異的マウスキラーT細胞が認識するE蛋白上のエピトープの同定。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会 (1998)。

Konishi, E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K., Mason P. W.: Secondary neutralizing antibody responses are a critical factor for protection in mice immunized with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. The 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science, 1998.

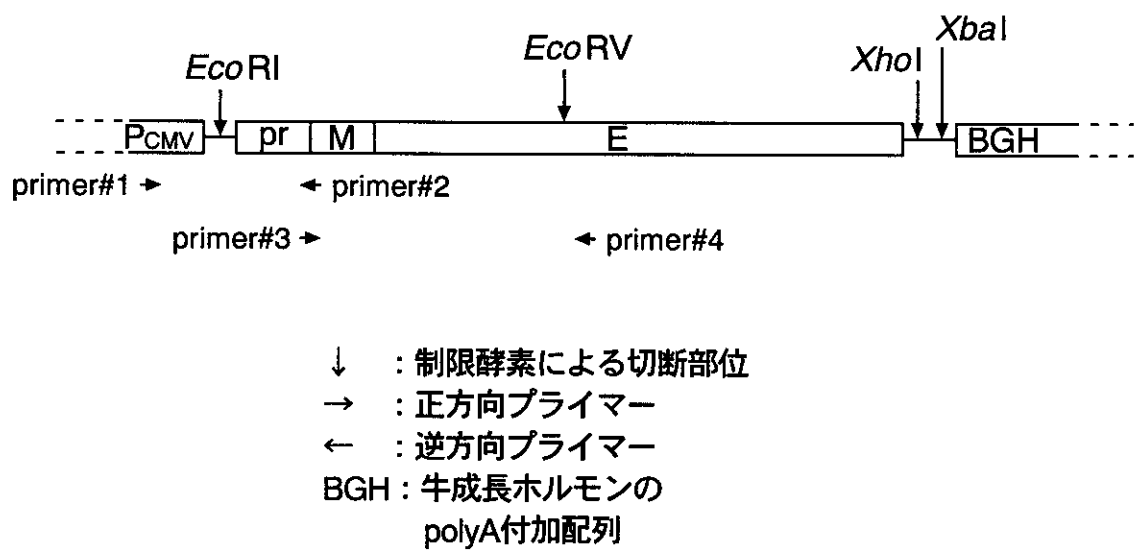


図1. pcJEMEの遺伝子構造(一部分)と使用したプライマーの方向および位置。

分担研究報告書

サルにおける日本脳炎ウイルス感染に関する研究

分担研究者 山田章雄 国立感染症研究所
研究協力者 榊原一兵 国立感染症研究所
研究協力者 向井鏡三郎 国立感染症研究所

研究要旨 日本脳炎ウイルス(JEV)に対するDNAワクチンの開発に向け、今年度はカニクイザルにおける日本脳炎ウイルス感染のモデルを確立するために、感染実験を行った。3株のJEVをカニクイザルに経鼻接種したところ、感染後12-15日に全てのサルが発症し、死亡あるいは安楽殺された。病理組織学的には汎脳炎像が認められ、免疫組織学的に日本脳炎ウイルス抗原が、神経細胞細胞質内に検出された。

A. 研究目的

JEVに対するDNAワクチンの実用化に際しては、ヒトにおける有効性及び安全性が確立されていなければならない。本研究ではヒトへの実際の応用を視野に入れて作成したDNAワクチンの有効性をヒトに近縁な霊長類で検証するための基礎として、カニクイザルのJEVに対する感受性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

5頭のカニクイザルにJEVJaTH-160, KE93, Beijing P3株を0.5mlずつ経鼻接種し、2-3日おきに体温測定を行うと同時に臨床経過を観察した。観察期間内に瀕死となった個体は麻酔下で安楽殺した。観察期間内に死亡したものも含めて病理学的に検索した。

C. 研究結果

1. いずれの株を接種したサルにおいても衰弱、振戦などの症状を呈し、カニクイザルは経鼻感染により、日本脳炎を発症することが明らかとなった。KE93を接種した2個体のうち一方は接種後10日、他方は11日目に瀕死となったためそれぞれ安楽殺をした。JaTH-160を接種した個体では若干病状の進行が遅れ、一方は接種14日後に安楽殺、他方は15日目に死亡した。BeijingP3株を接種した、1頭では11日目から元氣消退し、12日目から神経症状を呈したが、18日目まで生残したが、危篤状態となったため安楽殺した。

2. 臨床的にはこれといった特徴は認められなかったが、危篤状態における体温の低下が著明であった。

3. 髄液および血液を材料とした、ウイルス学的、血清学的検索は現在進行中である。

4. 病理学的にはいずれの個体の中枢

神経系には肉眼的な病変は認められなかった。病理組織学的には全ての個体に日本脳炎ウイルスによると考えられる脳脊髄炎が認められた。詳細には全例で、大脳皮質、視床、中脳の黒質、赤核、橋脳、頸椎灰白質、胸椎灰白質、小脳に神経細胞の変性、壊死が認められた。また大脳の、皮質、視床、軟膜に囲管性細胞浸潤を、大脳皮質にグリア結節を認めた。このほか大脳軟膜、延髄、橋脳などに出血を認めた例もあった。ヒトの日本脳炎で認められる、軟化巣あるいは透明斑とよばれる限局性組織壊死巣に相当すると思われる病変が、1頭のみではあるものの橋脳に認められた。小脳のグリア叢林と呼ばれる像に関しては明瞭なものは認めなかったが、1例にグリア叢林を思わせる所見を認めた。

5. JaTHを感染させた個体では胸椎に全く病変が認められず、ウイルス株の病原性の差を顕している可能性も考えられ今後の検討を要する。

6. 免疫組織化学的に日本脳炎抗原の検出を試みているが、現在のところ、神経細胞の細胞質にウイルス抗原が検出されている。しかし、特異性の点で若干の問題が残っており、今後詳細に検討する予定である。

D. 考察

日本脳炎ウイルスに対するDNAワクチンの有効性をサルにおいて明らかにするための前段階として、カニクイザルの日本脳炎ウイルスに対する感受性を調べたところ、経鼻感染により、カニクイザルは脳脊髄炎を発症し、斃死することが明らかとなった。現在免疫学

的、ウイルス学的パラメーターを測定中ではあるが、DNAワクチンの効果判定を行ううえで極めて重要なサルにおける攻撃実験が可能であることが明らかになった。従って、このシステムを用いて、試作DNAワクチンの有効性試験を行う予定である。

E. 結論

日本脳炎ウイルスを標的とした新規ワクチンのカニクイザルにおける有効性評価を行うための基礎として、日本脳炎ウイルスに対するカニクイザルの感受性を経鼻接種で調べたところ、カニクイザルは本ウイルスに高い感受性を示し、ワクチンの有効性を知るための攻撃実験が可能であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fukao, T., Hirano, A., Nakamura, K., Yamazaki, Y., Yamada, A., Tshita, H., Inoue, R., and Kondo, N.: Perinatal mumps associated with bronchiolitis and respiratory distress. *Eur. J. Pediatr.*, 157, 952-953, 1998

Saito, H., Takahashi, Y., Harata, S., Tanaka, K., Sato, H., Suto, T., Yamada, A., Yamazaki, S., and Morita, M.: Cloning and characterization of the genomic RNA sequence of the mumps virus strain associated with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiol. Immunol.*, 42, 133-137,

1998

Kawana, R., Kitamura, T.,
Nakagomi, O., Matsumoto, I., Arita,
M., Yshihara, N., Yanagi, K.,
Yamada, A., Morita, O., Yoshida,
Y., Furuya, Y., and Chiba, S.:
Inactivation of Human Viruses by
Povidone-Iodine in Comparison
with Other Antiseptics. *Dermatol.*,
195, S2, 29-41, 1997

山田章雄：ムンプスのヒトにおける
病理と動物モデル、臨床とウイルス、
26, 13-16, 1998

山田章雄：DNAワクチン、治療学、
32, 1520-1523, 1998

G. 知的所有権の取得状況
特になし

分担研究報告書

デングウイルス非構造タンパク NS3 遺伝子組み込み DNA ワクチンの作製

分担研究者 山岡政興(兵庫県立衛生研究所)
共同研究者 小西英二(神戸大学医学部医療基礎学講座)
倉根一郎(国立感染症研究所)
Peter W. Mason(米国プラムアイランド動物病センター)

研究要旨 デング DNA ワクチンの候補としてサイトメガロウイルスの強力プロモーターやウシ成長ホルモン由来のポリA配列付加シグナルを含む市販の pcDNA3 ベクターに、デング (DEN) ウイルス 2 型ニューギニア C 株の非構造タンパク NS3 遺伝子約1850bp を組み込んだ pcD2NS3 を作製した。ワクチンとしての効力を高めるために、開始コドン上流に ACC 配列を置くなどをして、発現量を高める工夫をした。DEN ウイルスの NS3 遺伝子約1850bp は、PCR による読み間違いを避けるために DNA ポリメラーゼを選び、少ないサイクルで増幅した。pcD2NS3 のデングウイルス遺伝子カセットが正しく組み込まれていることは、遺伝子解析によって確認した。

A. 研究目的

病原体の遺伝子そのものを宿主内で発現させることにより防御免疫を誘導する DNA ワクチンは、動物モデルにおいて多くの病原体に対して有効であることが報告されてきており、新しいワクチン開発手法として注目されている。我々はこれまでに日本脳炎ウイルス (JEV) 遺伝子産物の防御免疫誘導能をマウスモデルを用いて解析してきた。prM のシグナル配列、prM および E 遺伝子からなる遺伝子カセットは、導入した細胞に JEV の

prM/E を粒子の形で発現させ、マウスに高い防御免疫を誘導することを報告した。同様の作戦でデングウイルス 2 型ニューギニア C 株の prM/E 遺伝子をプラスミドに組み込んだ pcD2ME をデング DNA ワクチンの候補として作製し、防御免疫誘導能をマウスモデルを用いて解析した。その結果、pcD2ME はマウスに中和抗体および記憶 B 細胞を誘導することが示された。しかし、pcD2ME によるデングウイルス特異的キラー T 細胞の誘導は明確には示されなかった。デングウイル

スに対するワクチンにおいては、液性免疫と同時に細胞性免疫を誘導することが必要とされ、デングウイルス感染においては NS3 タンパクが E タンパクよりも T 細胞に認識されると報告されている。本研究は、デングウイルスに対する特異的キラー T 細胞の誘導および防御効果を調べるために、デングウイルスの NS3 遺伝子組み込みプラスミドを作製することを目的とした。

B. 研究方法

PCR による NS3 遺伝子 DNA の増幅のために、すでにクローン化されているデングウイルス 2 型ニューギニア c 株の NS3 領域を含むプラスミド PLZNS3 (Padmanabhan et al., 1989) をテンプレートとした。ベクターとしてサイトメガロウイルスの強力プロモーターおよびウシ成長ホルモン由来のポリ A 配列付加シグナルを含む市販の pcDNA3 (Invitrogen) を用いた。すべての遺伝子操作は標準法 (Maniatis et al., 1982) に基づいた。作製したプラスミドは、コンピテント細胞に大腸菌 DH5 (東洋紡) を用いてトランスフォームさせた後、常法にしたがってコロニーを 2 回単離し、2xYT 培地で増殖させた。プラスミド DNA は、Qiagen を用いて精製し、1% アガロースゲル電気泳動および分光光度計を用いた吸光度測定により定量した。DNA ポリメラーゼには Takara Ex Taq (宝酒造) を用い、制限酵素は Eco RV および Xba I (Gibco BRL) を使用した。また、PCR には宝酒造のサーマルサイクラー TP480 を用い、吸光度測定には島津製作所の島津自記分光光度計 UV-2200A を用い、シーケンシングには ABI 社のオートシーケンサー 373A を

用いた。

C. 研究結果

発現量を高める工夫：pcDNA3 の T7 プロモーターの下流にあるマルチクロニングサイトの Eco RV と Xba I サイトにデングウイルスの NS3 遺伝子約 1800bp を組み込むために、PCR で 2 種類のプライマーを用いて NS3 遺伝子の増幅を試みた (図1)。センスプライマー (MY12) は、NS3 の5' 末端に開始コドン ATG を置き、さらにその上流に切り出し用の Eco RV を付加して作製した。また、アンチセンスプライマー (MY13) は、NS3 コード領域の3' 末端に停止コドンと切り出し用に Xba I 配列を入れて作製した。pcDNA3 には上述のとおりサイトメガロウイルスの強力プロモーターやポリA 配列付加シグナルが装備され、発現量を高めているが、今回我々は、開始コドン周辺の塩基配列が発現量に影響するという Kozak の報告 (1986) に基づき、ACC 配列を ATG のすぐ上流に置いて、発現量を高める工夫をした。ところで、NS3 領域約 1850bp を PCR で読み間違いをしないで正確に増幅するために、増幅サイクルを 15 回と常法より少なくし、さらに DNA ポリメラーゼに 3' →5' エキソヌクレアーゼ活性を含む耐熱性 DNA ポリメラーゼである Takara Ex Taq を選んだ。

作製されたプラスミドの検定：作製されたプラスミド pcD2NS3 のデングウイルス遺伝子部分、ACC 配列および開始、停止コドンがデザインどおり正しく組み込まれていることは、ABI 社の Dye Terminator Cycle Sequencing FS Kit を用いて反応させ、オートシーケンサー 373A を用いたシーケンシングにより

確認した。

D. 考察

ウイルス特異的キラー T 細胞は日本脳炎の回復に重要な役割をはたしていると報告されている。デングウイルスと同じフラビウイルス属に分類される JEV の prM/E 遺伝子カセットを用いた DNA ワクチンの防御免疫誘導能をマウスモデルを用いて解析してきた我々の一連の研究（平成 9 年度分担研究報告書「日本脳炎 DNA ワクチンの開発：マウスにおける防御免疫誘導」）から、日本脳炎に対する防御には中和抗体が重要であることが示されたが、それと同時に日本脳炎ウイルス特異的キラー T 細胞が誘導されることも明らかになった。一方、同じ作戦で prM/E 遺伝子カセットを組み込んだデング DNA ワクチンの評価（平成 10 年度分担研究報告書「デング DNA ワクチンの開発：マウスにおける防御免疫誘導」）では、中和抗体および記憶 B 細胞誘導能は示されたもののデングウイルス特異的キラー T 細胞の誘導は明確にはされなかった。しかしながら、デングウイルス感染においては NS3 タンパクが E タンパクよりも T 細胞が認識するエピトープを多く持つことが報告されており、今回作製したプラスミドを用いたデングウイルス特異的キラー T 細胞の誘導に関する解析が期待される。

E. 結論

pcDNA3 をベクターとし、発現量を高める工夫を加えてデングウイルスの非構造タンパク NS3 遺伝子約 1850bp を組み込んだデング DNA ワクチンの作製に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K. and Mason P. W.: Anamnestic Neutralizing Antibody Response is Critical for Protection of Mice from Challenge Following Vaccination with a Plasmid Encoding Japanese Encephalitis Virus Premembrane and Envelope Genes. *Journal of Virology* in press.

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I. and Mason P. W.: Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* 72, 4925-4930 (1998).

Konishi E., Kurane I., Mason P. W., Shope R. E., Kanasa-Thanan N., Smucny J. J., Hoke C. H. Jr. and Ennis F. A.: Induction of Japanese encephalitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by poxvirus-based JE vaccine candidates. *Vaccine* 16, 842-849 (1998).

2. 学会発表

小西英二、山岡政興、倉根一郎：デング DNA ワクチンのマウスにおける免疫誘導能。第2回日本ワクチン学会学術集会（1998）。

小西英二、山岡政興、高田和男、倉根一

郎：日本脳炎DNAワクチンにより免疫したマウスにおける攻撃後の2次免疫応答。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会（1998）。

Konishi, E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K., Mason P. W.: Secondary neutralizing antibody responses are a critical factor for protection in mice immunized with a

plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. The 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science, 1998.