

图 1. pcDNA3 作製法

分担研究報告書

デングDNAワクチンの開発：マウスにおける中和抗体の誘導

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 山岡政興（兵庫県立衛生研究所）
倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス1部）
Peter W. Mason（米国プラムアイランド動物病センター）

研究要旨 フラビウイルスの前駆膜（prM）シグナル配列、prM及び外被膜（E）遺伝子から構成されるカセットは、細胞外粒子の産生そして高い免疫誘導を導くことが種々の系で証明されている。本研究は、デングDNAワクチンの開発を目的として、デング2型ウイルスニューギニアC（NGC）株のシグナル/prM/E遺伝子カセットをpcDNA3ベクターに組込んだプラスミド（pcD2ME）を作製・評価した。pcD2MEをトランスフェクトしたCHO-K1細胞内でデング2型ウイルスのEタンパクが発現されていることは、Eタンパクに対するモノクローナル抗体で免疫染色することにより確認した。100ugのpcD2MEを2週間隔で2回あるいは3回筋肉内接種により免疫したBALB/cマウスには、1:10の中和抗体価（90%プラーク減少法）が誘導された。NGC株による攻撃の後、4及び8日目に中和抗体価が1:40以上に上昇し、2次免疫応答の誘導が示された。これらの結果により、pcD2MEがマウスにおいて中和抗体及びデング2型ウイルス特異記憶B細胞を誘導することが証明された。

A. 研究目的

デングは、熱帯・亜熱帯地域に広く分布する蚊媒介性の疾患で、年間約1億人の患者を生ずる。特に、流行地域の拡大と患者数の増加が問題であり、重要な再興感染症の1つとして位置付けられている。しかし、現在認可されているワクチンはない。デングワクチンの開発を目的として、弱毒、組換え、サブユニット、キメラ、及びDNAワクチンがこれまで研究されてきた。

ウイルス遺伝子の一部を宿主の体

内で発現させることにより防御免疫を誘導する方法は、ワクチン開発における最近の有力な戦略の1つである。デングの防御に重要なウイルス蛋白は、prM、E及び非構造蛋白NS1であると考えられている。これらの蛋白に対して特異的なモノクローナル抗体の移入により、マウスが致死量の攻撃から防御されるからである。この理由により、これらの蛋白をコードする遺伝子が、遺伝子操作による新型ワクチン開発に用いられてきた。

我々は、日本脳炎ウイルス（JEV）、黄熱ウイルス、及びデングウイルスの前駆膜（prM）シグナル配列、prM及び外被膜（E）遺伝子から構成されるカセットが、prM及びEを正しく発現し、粒子の形で細胞外に放出することを報告してきた。この細胞外粒子は、本来のウイルス感染細胞から放出される非感染性のSHA（slowly sedimenting hemagglutinin）粒子と形態的及び生化学的に類似しており、それ自体でマウスに防御免疫を誘導することを証明した。また、昨年度の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』に報告したように、JEVのシグナル/prM/E遺伝子カセットをpcDNA3ベクターに組込んだプラスミド（pcJEME）がマウスにおいて中和抗体及び防御免疫を誘導することを明らかにした。

本研究において、我々はデング2型ウイルスニューギニアC（NGC）株のシグナル/prM/E遺伝子カセットをpcDNA3ベクターに組込んだプラスミド（pcD2ME）を作製し、マウスにおける中和抗体誘導能を調べた。

B. 研究方法

ウイルス：デング2型ウイルスNGC株をワクチンプラスミドの構築及び中和試験に、またマウス免疫実験における免疫原及び攻撃ウイルスとして用いた。このNGC株は分離後サル、蚊、及び蚊の細胞で継代されたもので、Yale Arbovirus Research Unit から分与されたものである。

プラスミドの構築：デング2型ウイルスNGC株からクローン化したcDNAを鋳型にして2種のプライマーを用いてPCRを行い、シグナル/prM/E遺伝子を増幅した。センスプライマー

は、EcoRVサイト、eukaryotic initiation site（ACC）、開始コドン（ATG）、そしてprMシグナル配列の6コドン（prMのN末端から上流方向に数えて20番目から15番目のアミノ酸まで）を含み、アンチセンスプライマーはEのC末端の6コドンに続いて停止コドン（TAG）及びXhoIサイトを含むように設計した。増幅された遺伝子を、pcDNA3ベクター（Invitrogen）のEcoRV/XhoIサイトに挿入してpcD2MEを作製した。シーケンシングにより、シグナル/prM/E遺伝子は報告されているNGC株の塩基配列とはわずかに異なるが、同じくデング2型のPUO-218株とはよく一致した。またシグナル/prM/E遺伝子前後の塩基配列は、設計どおりであることが確認された。発現実験及びマウス実験には、キアゲンキットを用いて精製したプラスミドDNAを使用した。

発現実験：Transfectam（Biosepra）を用いてCHO-K1細胞をpcD2ME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（D1-4G2、3H5）で免疫染色した。D1-4G2はフラビウイルス交差抗原に対する抗体、3H5はデング2型ウイルス特異抗原に対する抗体である。

マウス実験：6週令の雄BALB/cマウスをグループあたり3から5匹用いた。免疫原はpcD2ME（1ug、10ugあるいは100ug）あるいはpcDNA3ベクター（100ug）であった。これらの免疫原を、マウスに2週間隔で2回から3回筋肉内接種した。また、 1×10^5 PFUのNGC株を2週間隔で2回腹腔内接種した。2から3週後に眼窩静脈叢より採血し、血清を分離した。血清はグループごとにプールした後、試験に用いた。攻撃実験は、グループあたり4から5匹の免

疫マウスを用いて 3×10^5 PFUのNGC株を腹腔内接種した。攻撃前及び攻撃後4、8、21日目に採血し、マウス個体別に中和抗体を測定した。

中和試験：90%プラーク減少法により血清中の中和抗体価を測定した。

C. 研究結果

ウイルス蛋白の発現：pcD2MEによるトランスフェクションの後、CHO-K1細胞は、D1-4G2あるいは3H5抗体により約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pcD2MEがCHO-K1細胞においてE抗原を発現したことを示す。

中和抗体の誘導：1 μ g、10 μ gあるいは100 μ gのpcD2MEをBALB/cマウスに2週間隔で2回から3回（6、8、10週令時）筋肉内接種した（表1）。10週令時（3回目の免疫前）及び13週令時に採血して、プール血清の中和抗体価を測定した。

100 μ gのpcD2MEにより2回免疫したマウスには、抗体価が1:10の中和抗体が誘導された。一方、1 μ gあるいは10 μ gのpcD2MEを2回免疫したマウスには、検出できる中和抗体は誘導されなかった。また、100 μ gのpcD2MEにより2回免疫したマウスに誘導された抗体価（1:10）は、3回免疫により上昇しなかった。対照グループにおいては、100 μ gのpcDNA3ベクターにより2回から3回免疫したマウスには中和抗体は誘導されず、NGC株により2回免疫したマウスには、1:10の中和抗体価が誘導された。

攻撃後の2次免疫応答：免疫マウスを 3×10^5 PFUのNGC株により腹腔内接種した後の、中和抗体の推移を調べた。

最初の実験（図1A）では、100 μ gのpcD2MEにより3回免疫した5匹のマウスの内1匹に1:10の中和抗体価が攻撃前に認められた。攻撃後、すべての免疫マウスに1:40以上の中和抗体価が4日目に、また1:80以上の中和抗体価が8日目に認められた。この中和抗体価の上昇は、2次免疫応答を示す。中和抗体価は21日目まで維持された。一方100 μ gのpcDNA3ベクターにより2回あるいは3回免疫した2匹のマウスにおいては、攻撃後4日目及び8日目に中和抗体は検出されなかった。この内1匹に攻撃後21日目に1:20の中和抗体価が検出された。おそらく攻撃ウイルスに対する抗体応答と考えられる。

2回目の実験においては、グループあたり4匹のマウスを用いて1 μ g、10 μ gあるいは100 μ gのpcD2MEによる2回の免疫が、2次抗体応答に及ぼす影響を調べた。攻撃前には、100 μ gのpcD2ME免疫群の2匹に、中和抗体が認められた。攻撃後、100 μ gのpcD2ME免疫群においては、4日目及び8日目に中和抗体価が1:40または1:80にまで上昇したが、1 μ gあるいは10 μ gのpcD2ME免疫群においては、4日目には中和抗体は検出されず、8日目に最大1:20の中和抗体価を示したにとどまった。100 μ gのpcDNA3ベクターにより2回免疫したマウス群においては、攻撃後4日目及び8日目に中和抗体は検出されなかった。以上の結果は、pcD2MEがマウスに、デング2型ウイルス特異的な記憶B細胞及びヘルパーT細胞を誘導したことを示す。

D. 考察

pcD2MEにより免疫したマウスにおいて、中和抗体及びデング2型ウイルス特異的な記憶B細胞が誘導されることが明らかにされた。しかし、誘導

された中和抗体は低レベルであり、その抗体価は検出限界価（1:10）であった。低レベルの中和抗体誘導は日本脳炎に対する候補DNAワクチンであるpcJEMEにおいても認められた。DNAワクチンを筋肉内接種した場合、誘導されるのはTh1応答と考えられており、抗体よりCTLを誘導する傾向にあるとされる。

pcJEME免疫マウスにおいては、記憶CTLが検出された（昨年度の研究報告書『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』）。しかし本研究において、100ugのpcD2MEにより2回あるいは3回免疫したマウスを用いて記憶CTLは検出されなかった。NGC株のC、prM及びEを発現する標的細胞に障害を与える記憶CTLがNGC株感染によりマウスに誘導されることが報告されており、今回の結果は、CTLエピトープがC領域に含まれることを示唆する。しかし、100ugのpcD2MEによる3回免疫でも検出できるほどのCTL活性が誘導されなかった可能性も残されている。

デングワクチンの防御効力を調べるために、従来免疫マウスに攻撃ウイルスを脳内接種する方法が一般的に用いられてきた。末梢からの攻撃は、ウイルスの1次増殖及び2次増殖をもたらすと考えられるが、デングの場合通常この接種経路で病気や死を引き起こすことは不可能とされる。本研究では、攻撃に末梢ルートを用い、攻撃後の2次免疫応答を調べることでpcD2MEを評価した。

pcD2ME免疫マウスにおいては、攻撃後4日目及び8日目に中和抗体価の上昇が観察されたが、非免疫マウスには観察されなかった。デングウイルスに対する防御における中和抗体の重

要性は、中和活性を持つモノクローナル抗体が移入によりマウスを防御することにより証明されている。我々の日本脳炎モデルにおいて、DNAワクチン（pcJEME）により免疫されたマウスが攻撃から防御されるのは、攻撃ウイルス（おそらくは攻撃ウイルスの末梢における増殖）に対する2次免疫応答により中和抗体価が急激に上昇するためであると考えている（本年度の研究報告書『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）。今後サルを用いてDNAワクチンの評価を進める予定である。

E. 結論

デング2型ウイルスNGC株のシグナル/prM/E遺伝子カセットをpcDNA3ベクターに組み込むことにより作製したプラスミド（pcD2ME）は、マウスにおいて中和抗体及びデング2型ウイルス特異的な記憶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 pre-membrane 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. pcD2MEにより免疫されたマウスにおける中和抗体の誘導^a

免疫原	投与量	投与経路	中和抗体価 ^b	
			2回免疫	3回免疫
pcDNA3D2ME	100 ug	i.m.	1:10	1:10
pcDNA3D2ME	10 ug	i.m.	<1:10	ND
pcDNA3D2ME	1 ug	i.m.	<1:10	ND
pcDNA3	100 ug	i.m.	<1:10	<1:10
DEN2 NGC ^c	10 ⁵ PFU	i.p.	1:10	ND

^a各免疫原をグループあたり3匹のBALB/cマウスに2回（6週及び8週令時）あるいは3回（6週、8週及び10週令時）に接種した後、10週令時（3回目の免疫前）あるいは13週令時に採血した。プール血清を中和試験に供した。

^b90%プラーク減少を示した最高血清希釈倍数。

^cデング2型ウイルスニューギニアC（NGC）株。

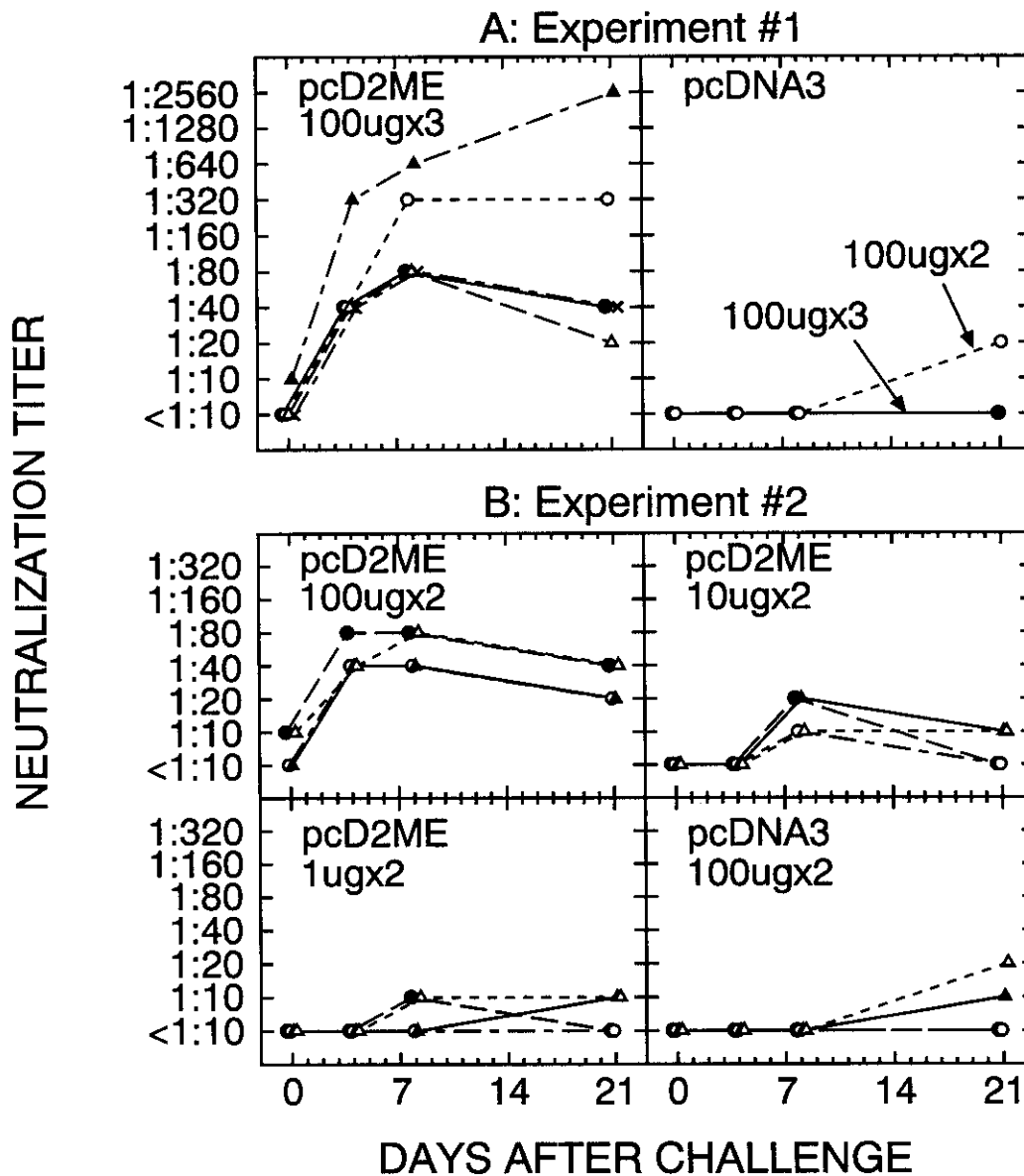


図1. pcD2ME免疫BALB/cマウスにおける攻撃後の中和抗体価の推移。(A) 100ugのpcD2MEにより3回免疫した5匹のマウスを、 3×10^5 PFUのNGC株を腹腔内接種することにより攻撃した。対照として100ugのpcDNA3ベクターにより2回あるいは3回免疫した2匹のマウスを用いた。(B) グループあたり4匹のマウスを用いて1ug、10ugあるいは100ugのpcD2MEによる2回の免疫後、 3×10^5 PFUのNGC株により攻撃した。攻撃前(day 0)、攻撃後4、8及び21日目に採取した血清を中和試験に供した。中和抗体価は、90%プラーク減少を示した最高血清希釈倍数で表した。

デングウイルス感染症の診断法の確立(2)

分担研究者 山田堅一郎(国立感染症研究所ウイルス第1部)

研究要旨 デングウイルス感染症は東南アジア、中南米など熱帯地域で広がっており、reemerging disease(再興感染症)の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。この疾病はわが国では流行・発生はみられないが、輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例が増加している。このような輸入感染症に備えて、その検査・診断法の基礎的条件を検討し、わが国での検査・診断体制を確立することを目的とした。RT-PCRによるウイルス遺伝子とIgM-ELISAによるIgM抗体の検出はDEN感染症の診断に極めて有用と思われる。今後、より精度の高い確実な診断法の確立と全国的な検査・診断体制の整備が肝要である。

A. 研究目的

近年、デングウイルス感染症は東南アジア、中南米など熱帯地域で広がっており、reemerging disease(再興感染症)の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国でのデングウイルス感染症は1940年代の一時期に関西以西で流行がみられたとの記録があるが、それ以降、流行・発生はない。しかし、東南アジアなど流行地からの帰国者などによって輸入感染症として、持ち込まれる症例がかなりの数に昇っていると思われるが、その実態は明らかでない。そこで、このような輸入感染症に備えて、その検査・診断法の基礎的条件を検討し、わが国での検査・診断体制を確立することを目的とした。

B. 研究方法

デングウイルス(DEN)はプロトタイプおよび分離株を用いた。これらのウイルスはカ由来培養細胞(C6/36, TRA-284-SF)で増やした。plaque assayはVeroとサル胎児肺細胞(MFL)を用いて行った。RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出はMorita, K. et al (J. Clin. Microbiol. 29, 1991)の方法に基づき、患者の血液および血清から特異的ウイルス遺伝子を検出した。HI試験は常法によって行った。IgM-capture ELISAはBundo, K. and

Igarashi, A. (J. Virol. Methods, 11, 1985)の測定方法に準じて行った。ウイルス抗原はC6/36感染培養液を作成し、各型とも抗原量を一定にして用いた。結果の判定はIndex valuesが2.0以上を陽性反応とした。IgM-ELISA用市販Kit (MRL Diagnosis, USA, PanBio, Australia)も併せて使用した。また、迅速診断Kit (Immnochromatographic test, PanBio, Australia)によりIgM及びIgG抗体を測定した。

C. 研究結果

1. 輸入感染症例数の動向

1985年~1998年間にデング熱を疑われて検査依頼のあった不明熱患者293例中、134例(45.7%)が血清学的及び病原学的診断法でDEN感染と診断された(Table 1)。最近5~6年は依頼検体数も多くなり、感染者数も増加の傾向を示した。また、他施設における検査結果でもタイ、インドネシアなど東南アジアからの帰国者から、陽性例が検出されている(Table 2)。

2. RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出

患者検体からRNAを抽出し、DEN共通プライマー及びDEN 1~4型の特異的プライマーを用いてDEN遺伝子を検出した結果、発病後5日目までの検体から特異的遺伝子が

検出された。

3. IgM及びIgG抗体の検出

IgM-capture ELISAにより、患者検体からIgM抗体を検出した。IgM抗体は発病6~7日以降の血清から検出され、発病後2ヶ月まで続いていたものもあった。各型の抗原量を一定にして、各型の抗原に対するIndex valuesを測定したところ、RT-PCRで型別が判明している血清のあるもので、RT-PCRの型別の結果と一致してIndex valuesがその型別に高く反応したものがみられた (Table 3)。IgM-capture ELISAで測定したものをIgM-ELISA用市販Kitで併せて測定したが、陽性反応はほぼ一致した。迅速診断Kit (Immuno-chromatographic test) は10分以内に判定ができるという利点があり、反応結果も前述の測定結果とほぼ一致したので、有効な診断法であると思われるが、今後、感度や精度の点などを検討することが肝要である。

4. 患者検体からのウイルス分離

感染初期の患者血液または血清を蚊由来細胞に感染させ、7日間培養後、その培養上清をRT-PCRでウイルス遺伝子を検出した。これまでのところ、第5病日以前の患者検体19例からDEN (1型; 7株、2型; 8株、3型; 3株、4型; 1株) が分離された。VeroとMFL細胞でプラークを形成させたところ、プラークの大きさは異なるが、両細胞とも明瞭なプラークが形成された。

D. 考 察

DEN感染症の検査、診断は血清学的、病原学的診断の両面からなされる。RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出は迅速で、同時にDENの型別まで診断できる利点があるが、発病後4~5日目までの感染初期の検体でしか検出できず、それ以降はIgM-ELISAによる血清診断が有効である。即ち、DEN感染症の診断にはRT-PCRとIgM-ELISAの両方法を実施することが有用であると思われる。今後、より精度の高い確実な診断法を確立し、輸入デング感染症への対策として速やかに対応できる検査・診断体制を整えることが肝要である。

E. 結 論

近年、輸入デング感染症として、わが国に持ち込まれる症例数が増加の傾向にあるようだが、その実数を把握することは、現状ではむずかしい。その実態を把握するためには、より精度の高い確実な診断法の確立と全国的な検査・診断体制の整備が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 五十嵐 章、長谷部 太、山田堅一郎、中山幹男、名和 優、江下優樹：媒介蚊体内におけるデングウイルス遺伝子の検出。長崎大学熱帯医学研究所共同研究報告集 (平成9年度) : 10-25, 1997.
 - 2) Eshita, Y., Itoh, T., Surathin, K., Miyamura, K., Kanuangkit, S., Hasebe, F., Nawa, M., Chanyasanha, C., Anantapreecha, S., Saguangwongse, S., Warachit, P., Sucharit, S., Chuananin, S., Sreeta, W., Rongsriyam, Y., Yamada, K., Agui, N., Fukuma, T. and Igarashi, A. : Behavior of dengue vector, *Aedes aegypti* and application of Olyset net, for its control in houses in an endemic area. In: The 9th International Congress of Parasitology, Tada, I., Kojima, S. and Tsuji, M. (Edi.), Monduzzi Editore, Bologna, Italy, : 1049-1053, 1998.
 - 3) 中山智祥、狩野信和、青井則子、渡邊英幸、遠藤守人、奥田直裕、高木浩人、松本紘一、渡辺吉康、大井洋之、小沢友紀雄、上松瀬勝男、矢内 充、山田堅一郎、倉根一郎：デング熱の一例—日大板橋病院初の報告—。日大医誌: 58 (2) : 109-115, 1999.
 - 4) Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M. and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of imported dengue cases. *Jap.J.Trop.Med.Hyg.* 1999. (in press).
- ### 2. 学会発表
- 1) 山田堅一郎、江下優樹、長谷部 太、中山幹男、名和 優、倉根一郎、五十嵐章：RT-PCR法を用いた媒介蚊内における

デングウイルス遺伝子の検出. 第33回日本脳炎ウイルス生態学研究会、1998.

2) 江下優樹、Surathin, K., 伊藤高明、宮村紀久子、Kanuankid, S., 長谷部 太、名和優、Chanyasanha, C., Anantapreech, S., Saguanwongse, S., Warachit, P., Sucharit, S., Chuananon, S., Sreeta, W., Rongsriyam, Y., 山田堅一郎、福間利英、五十嵐 章：デング流行地においてオリセットネットを用いた人家内のネッタイシマカ防除. 第33回日本脳炎ウイルス生態学研究会、1998.

3) 名和 優、山田堅一郎、倉根一郎：IgM-ELISAを用いたデング輸入感染例の血清診断. 第5回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会. 1998.

4) 山田堅一郎：輸入デングウイルス感染症の現状とその検査・診断体制. 第39回日本熱帯医学会大会、1998.

Table 1 Number of imported dengue fever diagnosed in NIID, 1985-1998

Year	Total number of samples	DF	DHF (Death)		Suspect	Before	Total	
							DEN	Non DEN
1985	8	4			1		4	3
1986	2					1	1	1
1987	13	4			1		4	8
1988	6	4					4	2
1989	6	1					1	5
1990	21	10		1	2		11	8
1991	11	5	1		1		6	4
1992	28	13			2	1	14	12
1993	15	7			1		7	7
1994	28	11			3		11	14
1995	35	16			2		16	17
1996	34	14			1	1	15	18
1997	26	6			1		6	19
1998	60	33				1	34	26
Total	293	128	1	1	15	4	134	144

Table 2 他機関でのデング熱の検査・診断

機 関 名	TOTAL	DEN	TYPE	渡 航 先
成田空港検疫所 (1998年)	27	8	(2) 2 型 (1) 3 型	マレーシア(1), タイ(1) タイ(1)
大阪府立公衛研 (1994-1998年)	18	9	(1) 1 型 (1) 2 型 (2) 3 型	インドネシア(1) タイ(1) タイ(2)
大分衛生環境センター (琉球大・医・ウイルス) (1998年)	1	1	(1) 3 型	タイ(1)
国立感染症研究所 (1998年)	60	34	(5) 1 型 (3) 2 型 (1) 3 型	タイ(4), パンケラティ(1) タイ(2), インド(1) インドネシア(1)

Table 3 Diagnosis of dengue virus infection by RT-PCR & IgM-capture ELISA

Specimens	RT-PCR	D1-Ag	D2-Ag	D3-Ag	D4-Ag	Interpretation
NK - 3	DEN-1	1.1	1.0	1.1	2.4	
-10		14.1	8.2	8.7	5.3	DEN-1
OK - 2	DEN-1	1.2	1.1	1.0	2.2	
- 8		12.7	3.3	3.8	6.0	
-19		13.1	8.4	6.9	5.1	DEN-1
TN - 5	DEN-1	7.6	1.5	1.4	2.4	
-21		11.9	4.4	5.0	5.4	DEN-1
YA - 4	DEN-2	1.3	1.2	1.1	2.6	
-12		6.7	11.2	4.5	4.0	DEN-2
SF - 4	DEN-2	1.0	1.0	1.0	3.1	
- 8		7.1	10.4	5.5	5.9	DEN-2
TH - 2	DEN-3	1.0	1.0	1.0	2.1	
- 6		1.8	1.6	4.8	2.5	DEN-3
YoA-3	DEN-4	1.2	1.1	1.1	2.1	
-24		2.7	2.5	2.8	10.3	DEN-4

分担研究報告書

マウスユビキチン搭載プラスミドベクターの構築

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 DNAワクチンのマウスにおけるCTL誘導能を高めるために、マウスユビキチンを組込んだプラスミドベクターを構築した。pGEM3（プロメガ社製）をベースにして、発現量を高めるために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すでに組込んだプラスミド（pGEM3IMA）にBalb/cマウスのユビキチン遺伝子を組み込み、さらにその下流に遺伝子組み込み用のポリリンカーを付加して、日本脳炎ウイルス遺伝子がユビキチンの下流に発現し融合蛋白として作製されるように設計した。ユビキチン遺伝子は、Balb/cマウスの脾臓細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型にして、PCRによりクローン化した。このユビキチン遺伝子はシーケンシングの結果、報告されている遺伝子配列と一部異なったがアミノ酸配列は全く同一であった。pGEM3IMAにユビキチン遺伝子を組み込み、その上流には発現を高めるACC配列および開始コドンを含み、下流にはポリリンカーを付加した。シーケンシングの結果、設計どおりにプラスミド（pUBIQ）が作製されたことを確認した。このpUBIQに日本脳炎やデングウイルスの遺伝子の一部を組み込み、CTLエピトープを同定すると共に、CTLエピトープの防御における役割を調べることが可能となった。

A. 研究目的

日本脳炎の防御に重要な因子は中和抗体と考えられるが、CTLも移入により防御をもたらすことから、防御に何らかの役割を果たすと考えられる。しかし、移入により防御をもたらすCTLが認識するエピトープは決定されておらず、一方CTLエピトープが詳しく調べられているデング

ウイルスにおいては、そのエピトープを認識するCTLの防御能までは調べられていない。

ユビキチンはアミノ酸76残基からなる蛋白質で、ユビキチン-蛋白質複合体のプロテアソームによる分解を通じて、蛋白質の分解を促進し、また分解された蛋白質の一部を細胞表面に提示しCTLの誘導を促進すると

報告されている物質である。特にDNAワクチンにおいて、ユビキチン遺伝子の下流に目的のウイルス遺伝子を組込み、ウイルス蛋白をユビキチンとの融合体として宿主細胞内で発現させることにより、CTLの誘導が促進される。本研究は、より有効にCTLを誘導するワクチンを開発するために、またCTLエピトープを決定するために、ユビキチン組込みプラスミドベクターを構築することを目的とする。

B. 研究方法

プラスミド：市販のpGEM3ベクター（プロメガ社製）をベースにして、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組込んで作製したプラスミド（pGEM3IMA：Mason et al., 未発表）を用いた。

マウスDNA：BALB/cマウスの脾臓細胞を型通り採取した後、プロテナーゼKを最終濃度0.1mg/mlに含むDNA digestion bufferに浮遊し、50°Cで1夜保温した。フェノール/クロロフォルム/イソアミルアルコールによる抽出の後、エタノールで沈殿させDNA分画を得た。このDNAを、マウスユビキチン遺伝子をクローニングする際、PCRの鋳型として用いた。

PCR：プライマーは、Gene Bankに登録されているマウスユビキチン遺伝子の塩基配列に基づいて設計した。マウスユビキチン分子は4個のサブユニットから構成されるが、これらのサブユニットは、いずれも76個のアミノ酸から成り、塩基配列はわずかに異なるものの、相同のアミノ酸配列をもつ。今回のプライマー作製は、サブユニットIの塩基配列に基づいた。センスプライマーは、XhoI

サイト、eukaryotic initiation site (ACC)、開始コドン(ATG)、そしてユビキチンサブユニットIのN末端の7コドンを含み、アンチセンスプライマーはユビキチンサブユニットIのC末端の7コドンに続いてポリリンカーを付加するためにEcoRI及びXbaIサイトを含む。停止コドンはXbaIサイトのTAGを利用した。また、ユビキチンの活性を高めるために76番目のグリシンをアラニンに置換するための配列とした。これらのプライマーとBALB/cマウスのDNAを用いて、AmpliTaq DNA polymeraseによりユビキチン遺伝子をPCRにより増幅した。PCRはGeneAmp PCR System (Perkin Elmer社)を用いて行った。DNAの精製には、Quantum DNA Purification Kit (BioRad社)を用いた。

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。

C. 研究結果

ポリリンカーの除去：pGEM3IMAは別の目的で作製されたプラスミドであり、今回の目的には不用のポリリンカーを有していた。マウスユビキチン遺伝子をクローニングする際に、またマウスユビキチン遺伝子の下流にJEV遺伝子を挿入するためのポリリンカーを付加する際に不都合

であったために、このポリリンカーを除去した。ポリリンカーの両端に位置しているNruI及びNotIサイトを制限酵素で切断し、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端にした後にライゲートした。

マウスユビキチン遺伝子のクローニング：BALB/cマウスの脾臓細胞から抽出したDNAを鋳型にして、2種のプライマー（「材料と方法」参照）を用いて、PCRを行った。その結果、約260bpのDNAが増幅された。このDNAは、76アミノ酸から成る1個のユビキチンサブユニットをコードする遺伝子の長さに相当する。このDNAを、ポリリンカーを除去したpGEM3IMAのXhoI/XbaIサイトに組込んだ。この結果、ユビキチン遺伝子は、サイトメガロウイルスの強力プロモーターの下流に、そしてウシ成長ホルモン由来のポリA配列付加シグナルの上流に位置し、ユビキチン遺伝子の直前にはACCATG配列、直後にはEcoRI、XbaIサイト及びTAG配列を有するプラスミドが構築されたことになる。シーケンシングの結果、ユビキチン遺伝子は、すでに報告されている塩基配列と12個所の相違が認められたが、推定されるアミノ酸配列は同一であった。また、ユビキチン遺伝子付近の配列は、設計どおりであった。

ポリリンカーの付加：EcoRIサイトとXbaIサイトの間にBspEI、SacII、EcoRV、NruIの各サイトを含むオリゴDNAを作製して、上記のプラスミドに組込んだ。シーケンシングにより、このポリリンカーが正しく付加されたことを確認した。

D. 考察

マウスユビキチン搭載プラスミド

ベクター（pUBIQ）の構築に成功した。今後このプラスミドに日本脳炎ウイルス中山株の遺伝子の一部を組み込み、CTLエピトープを同定すると共にこのCTLエピトープの防御における役割を調べるのが可能となった(図1)。すでにJEVのE遺伝子の前半部分を組込んだプラスミド（pUJEE1/2）を作製し、マウスにおける防御効果を検討している。E遺伝子の前半部分には、CTLエピトープが存在することが明らかにされているが、ユビキチンを含まないプラスミド（pcJEE1/2）によっては防御が誘導されなかった（同研究班による本年度の分担研究報告書『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）。少数のマウスによる予備実験であるが、今までのところユビキチンによるCTL活性の増強に起因すると考えられる延命効果が認められている。

E. 結論

マウスユビキチンを組込んだプラスミドベクター（pUBIQ）を構築した。CTLエピトープの同定ならびに防御における役割を調べるため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 pre-membrane 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.

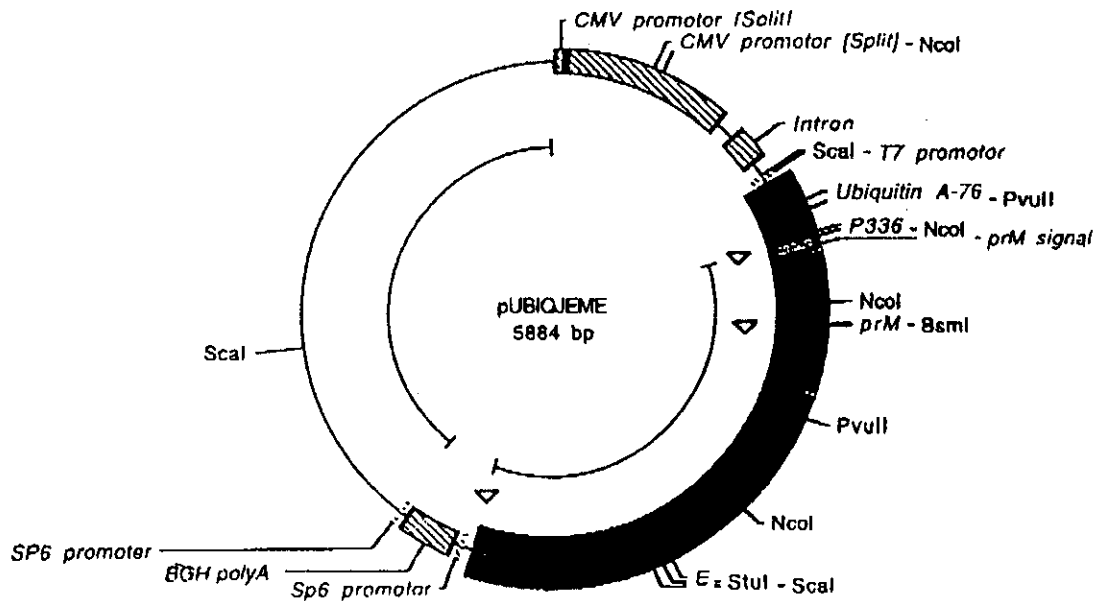


図1. マウスユビキチン搭載プラスミドベクターpUBIQに、JEVのprMシグナル、prM及びE遺伝子カセットを組み込んで作製したプラスミドpUBIQJEMEのジーンマップ。pUBIQを利用したプラスミド作製の1例として挙げた。上流より、サイトメガロウイルスの強カプロモーター、ヒトイントロン、マウスユビキチン、ポリリンカーの中にJEVのシグナル/prM/E遺伝子カセット、及びウシ成長ホルモン由来のポリA配列付加シグナルの順に組み込まれている。