

201318081A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

利便性の高い五種混合ワクチンの 開発に向けた研究

(H25-新興-一般-020)

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26（2014）年 3月

研究代表者 森 康子

(神戸大学大学院医学研究科)

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

利便性の高い五種混合ワクチンの開発に向けた研究

平成 25 年度 研究組織

研究代表者

森 康子 神戸大学大学院医学研究科微生物感染症学講座
臨床ウイルス学分野・教授

研究分担者

堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科
毒性学分野・教授

研究分担者

鶴田 宏樹 神戸大学
連携創造本部 応用構造科学産学連携推進センター長

研究協力者

湯 華民 神戸大学大学院医学研究科微生物感染症学講座
臨床ウイルス学分野・助教

研究協力者

河端 暁子 神戸大学大学院医学研究科微生物感染症学講座
臨床ウイルス学分野・助教

研究協力者

村上 宏起 神戸大学大学院医学研究科微生物感染症学講座
臨床ウイルス学分野

研究協力者

太田 恵美 神戸大学大学院医学研究科微生物感染症学講座
臨床ウイルス学分野

目 次

I. 総括研究報告

利便性の高い五種混合ワクチンの開発に向けた研究 -----	1
研究代表者 森 康子	

II. 分担研究報告

1. HHV-6B 構造タンパクの作製 -----	3
森 康子・湯 華民・河端 暁子・村上 宏起・太田 恵美	
2. ワクチン抗原産生システムの構築 -----	5
森 康子・湯 華民・河端 暁子・村上 宏起・太田 恵美	
3. HHV-6B ワクチンの安全性評価および四種混合ワクチンへの応用 --	9
堤 康央	
4. HHV-6B 構造タンパク質の精製および立体構造解析 -----	15
鶴田 宏樹	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	17
---------------------------	----

I. 総括研究報告

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究要旨:

本研究では、利便性および安全性の高い新たな混合ワクチン、即ち、現行の四種混合ワクチン(ジフテリア、百日咳、破傷風、ポリオ)に、社会的ニーズの高いヒトヘルペスウイルス 6B (HHV-6B) ワクチンを加えた新たな五種混合ワクチンを作製し、安全性および有効性を明らかにすることを目的とする。本年度は、そのためのワクチン抗原の作製やアジュバントの探索を行った。

A. 研究目的

本研究では、利便性および安全性の高い新たな混合ワクチン、即ち、現行の四種混合ワクチン(ジフテリア、百日咳、破傷風、ポリオ)に、社会的ニーズの高いヒトヘルペスウイルス 6B (HHV-6B) ワクチンを加えた新たな五種混合ワクチンを作製し、安全性および有効性を明らかにすることを目的とする。

B. C. 研究方法および結果

1. ワクチン抗原の作製

現行の四種混合ワクチンに、HHV-6B のワクチン原を加えて五種混合ワクチンとするためには、ワクチン原として、HHV-6B のウイルス粒子に存在する構造タンパクであり、HHV-6B の宿主受容体である CD134 分子と結合し、さらに、中和のターゲットでもある glycoprotein

Q1 (gQ1) /gQ2 複合体の精製が必要である。本研究では既に作製済みであるそれらの遺伝子を哺乳類培養細胞に導入し、その上清中の gQ1/gQ2 タンパク複合体の分泌およびその精製を行った。アフィニティークロマトグラフィーにより得た同じ画分には、gQ1 および gQ2 が含まれていることが確認された。gQ1/gQ2 タンパク複合体と CD134 分子との結合を確認したところ、gQ1/gQ2 遺伝子導入培養細胞上清および精製して得られた画分を用いた解析により、精製した gQ1/gQ2 複合体の CD134 への結合が確認された。

2. ワクチン抗原産生系の構築

HHV-6B ワクチンになりうる抗原である gQ1 と gQ2 を恒常的に発現する細胞を作製した。gQ1、gQ2 発現ベクターを HEK293GnTI 細胞に導入し、puromycin を添加することにより、ポジ

タイプ細胞を得ることができた。また、本細胞より gQ1, gQ2 が分泌されることを確認した。

特記すべきことなし

2.学会発表

特記すべきことなし

3. アジュバントについて

HHV-6B 構造タンパク質のワクチン効果を高め得るアジュバント開発の一環として、ナノ粒子のアジュバント活性を評価した。その結果、高濃度の C₆₀ フラーレン誘導体と LPS の共投与が Th1 型免疫を強く誘導する可能性が示された。また、ナノシリカが、強い抗体産生誘導能を有することが明らかとなった。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

4. 構造タンパク質の立体構造解析を行うためのタンパク質精製条件および X 線結晶構造解析の実施環境を整えた。

3. その他

特記すべきことなし

(倫理面への配慮)

本研究に関与する遺伝子組換え実験および動物実験は、当該研究機関における遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得ている。

D. E. 考察および結論

本年度の成果を以下に示す。

ワクチン抗原の発現および精製条件を検討した。ワクチン抗原の恒常的発現細胞を構築した。ナノ粒子のアジュバント活性を評価した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1.論文発表

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

利便性の高い五種混合ワクチンの開発に向けた研究（H25-新興-一般-020）

HHV-6B 構造タンパクの作製

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究協力者・湯 華民、河端 暁子、村上 宏起、太田 恵美

神戸大学大学院医学研究科

研究要旨：

HHV-6B ワクチン原となる glycoprotein Q1 (gQ1) /gQ2 遺伝子を哺乳類細胞に導入し、培養上清中に分泌されるタンパク複合体の精製を試みた。その結果、培養細胞上清中において gQ1/gQ2 タンパク複合体の分泌が確認された。

A. 研究目的

現行の四種混合ワクチンに、HHV-6B のワクチン原を加えて五種混合ワクチンとするためには、ワクチン原として、HHV-6B のウイルス粒子に存在する構造タンパクであり、HHV-6B の宿主受容体である CD134 分子と結合し、さらに、中和のターゲットでもある glycoprotein Q1 (gQ1) /gQ2 複合体の精製が必要である。本研究では既に作製済みであるそれらの遺伝子を哺乳類培養細胞に導入し、その上清中の gQ1/gQ2 タンパク複合体の分泌およびその精製を試みた。

B. 研究方法

①培養細胞への gQ1 および gQ2 遺伝子導入

既に作製済みである、HHV-6B gQ1 遺伝子（タンパクを細胞外に分泌させるためのヒト抗体の Fc 領域、および精製のためのヒスチジンタグとの融合タンパクとして発現）あるいは gQ2 遺伝子をクローニング

した発現プラスミドを、ヒト胎児腎細胞である 293T 細胞にリン酸カルシウム法を用いて同時に導入した後、細胞を培養し、その上清を回収した。

②gQ1 および gQ2 遺伝子を導入した培養細胞上清中からの複合体の精製

回収した gQ1/gQ2 タンパク複合体を含む培養細胞の上清をニッケルカラムに結合させ、AKTA pure を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、gQ1/gQ2 複合体の精製を行った。

③gQ1/gQ2 タンパク複合体精製の確認

精製したサンプルに gQ1/gQ2 タンパク複合体が含まれているか否かに関して gQ1 および gQ2 に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。さらに、精製した gQ1/gQ2 タンパク複合体が、宿主受容体である CD134 分子に結合するか否かを、既

に樹立済みである CD134 発現 T 細胞を用いたフローサイトメトリー解析により確認した。

(倫理面への配慮)

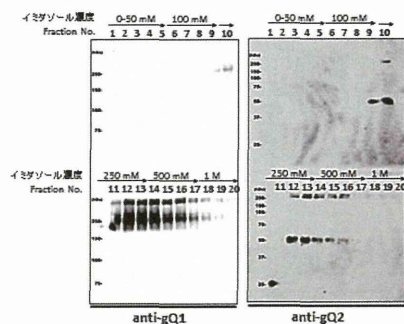
本実験は神戸大学で行い、当該研究機関における遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

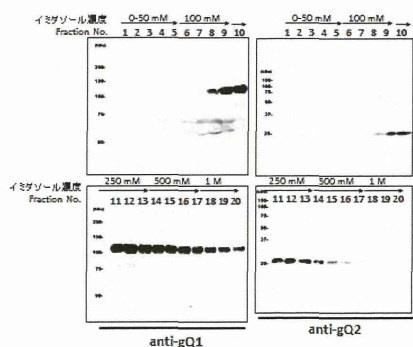
①ウェスタンブロットによる gQ1/gQ2 複合体の確認

アフィニティークロマトグラフィーにより得た同じ画分には、gQ1 および gQ2 が含まれていることが確認された。

ウェスタンブロットによるgQ1およびgQ2タンパクの確認(非還元条件)



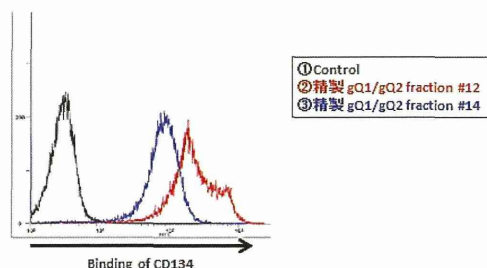
ウェスタンブロットによるgQ1およびgQ2タンパクの確認(還元条件)



②フローサイトメトリー解析による gQ1/gQ2 タンパク複合体の CD134 分子への結合の確認

gQ1/gQ2 タンパク複合体と CD134 分子との結合を確認したところ、gQ1/gQ2 遺伝子導入培養細胞上清および精製して得られた画分を用いた解析により、精製した gQ1/gQ2 複合体の CD134 への結合が確認された。

フローサイトメトリーによるCD134との結合確認



D. 考察

本研究により、gQ1 および gQ2 遺伝子を同時に導入した 293T 細胞の上清中から、ニッケルカラムを用いて gQ1/gQ2 タンパク複合体を精製できることが明らかとなった。

E. 結論

HHV-6B gQ1/gQ2 遺伝子導入培養細胞の上清中から、本タンパク複合体を精製した。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

利便性の高い五種混合ワクチンの開発に向けた研究(H25-新興- 一般-020)

ワクチン抗原産生システムの構築

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究協力者・湯 華民、河端 暁子、村上 宏起、太田 恵美

神戸大学大学院医学研究科

研究要旨: HHV-6B の抗原を現行の四種混合ワクチンに加えた五種混合ワクチンの開発にあたって、HHV-6B 抗原の大量生産が不可欠だと考えられる。そこで、ウイルス抗原を大量生産する技術の構築を試みた。

A. 研究目的

HHV-6B 抗原を加えた五種混合ワクチンを開発するにあたって、HHV-6B 抗原の毒性、免疫原性などを調べる必要がある。それらの研究をスムーズかつ迅速に行うためには、簡便な抗原産生法の確立が必要である。

そこで、本研究は HHV-6B のワクチンになりうる抗原である gQ1 と gQ2 を恒常的に発現する細胞を作製すること目的とした。

B. 研究方法

■1. Dual 抗原発現ベクターの作製■

HHV-6B gQ1 遺伝子をヒト IgG 抗体の Fc 部分と fusion させ、その C 末端に His tag を付けた。次に、その gQ1 カセットおよび HHV-6B gQ2 遺伝子を発現ベクターである pCAGGS にクローニングした。作製した gQ2 発現ベクターから PCR 法により、gQ2 遺伝子発現カセットを増幅し、gQ1 遺伝子発現ベクターにクローニングした。最後に、puromycin 耐性遺伝子発現カセットを、作製した gQ1、gQ2 発現ベクターに挿入した。

■2. Dual 抗原発現ベクターの細胞への導入お

よびポジティブ細胞のクローニング■

作製した gQ1、gQ2 発現ベクターを HEK293GnTI 細胞に導入し、puromycin を添加することにより、ポジティブ細胞を selection した。

■3. gQ1、gQ2 positive 細胞から gQ1、gQ2 の分泌および分泌したタンパク機能の確認■

Puromycin selection から得られた positive 細胞の培地を回収し、His tag と結合する NI-NTA を用いて、分泌されたタンパクを精製した。精製したタンパクを western blot に供し、HHV-6B gQ1 と gQ2 分泌の有無を検討した。また、分泌されたタンパクと HHV-6B の entry receptor である CD134 との結合を flowcytometer により調べた。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組換え実験は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

■1. HHV-6B gQ1、gQ2 遺伝子発現ベクター

(dual 発現ベクター)の作製に成功

我々は HHV-6B の gQ1、gQ2 が pair で機能することが明らかとしている(未発表データ)。そのため、gQ1 と gQ2 抗原を作製する際には、一つの細胞に同時に gQ1 と gQ2 遺伝子が導入されている必要がある。また、gQ1 と gQ2 を恒常的に発現する細胞を作製するためには、gQ1、gQ2 を個々の発現ベクターに入れるよりも、一つのベクターに入れる方が恒常的な発現細胞の作製が容易であると考えられた。そこで、我々は gQ1 と gQ2 の二つの遺伝子発現カセットを持つベクターの作製に成功した。また、恒常的に発現している細胞の selection のため、そのベクターに puromycin 耐性遺伝子を挿入することにも成功した(Figure 1)。

■2. 恒常的に HHV-6B gQ1、gQ2 遺伝子を発現する細胞の作製

上記で作製したベクターを HEK293GnTI 細胞に導入し、puromycin を添加することにより、ベクターが導入された細胞を selection した。その細胞を間接蛍光抗体法で確認したところ、高率に gQ1 および gQ2 を発現していた(Figure 2)。

■3. HHV-6B gQ1、gQ2 の分泌の確認

次に、上記の如く作製した細胞の培地から NI-NTA を用いて、タンパクを精製し、HHV-6B gQ1、gQ2 の分泌を western blot 法により確認した。その結果、gQ1 および gQ2 がその細胞培地に分泌されていることが確認された(Figure 3)。

■4.分泌された HHV-6B gQ1、gQ2 は CD134 と結合する本来の機能を有する

最後に、分泌された HHV-6B gQ1、gQ2 抗原が本来の機能を果たすか否かについて検討した。具体的には、上記の如く作製した細胞から分泌されたタンパクと HHV-6B の宿主 receptor である CD134 との結合を flowcytometer で解析した。その結果、分泌された gQ1 と gQ2 は CD134 と結合することが明らかとなった(Figure 4)。よって、分泌された HHV-6B gQ1、gQ2 は本来の機能を持つタンパクであると考えられる。

D. 考察

今回、我々は HHV-6B のワクチン抗原になりうるタンパク発現細胞の作製を試みた。本研究で作製した dual 発現ベクターによって、gQ1 と gQ2 遺伝子発現カセットを同時に一つの細胞へ導入することが可能となった。そのため、単独発現ベクターの使用よりも、多くの機能を持つ gQ1 と gQ2 が産生されると考えられる。ベクターに含まれる puromycin 耐性遺伝子により、導入された細胞がその耐性を獲得し、selection が容易であった。本発現システムは他の研究にも有用であると考えられる。本研究で作製した HHV-6B の抗原はその抗原の毒性や、免疫原性などのテストに有用であると考えられる。また、本研究で使用した細胞(HEK293GnTI)は糖タンパクが均一な糖鎖修飾をうけるため、構造解析には有用である。ワクチン抗原の製造には、限られた細胞しか認可されていない。今後、我々はワクチンの製造に認可された細胞(Vero、酵母など)を用いて、gQ1 および gQ2 を恒常的に発現する細胞を作製する予定である。

E. 結論

HHV-6B gQ1 及び gQ2 を恒常的に発現する細胞の構築に成功した。この細胞を用いることによって、更なる研究が可能となる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他
なし

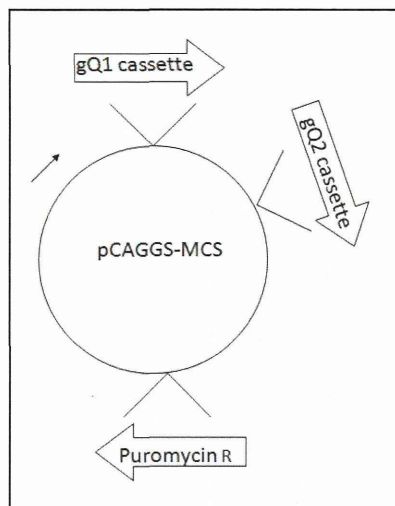


Figure1 HHV-6B gQ1、gQ2 遺伝子 dual 発現ベクター

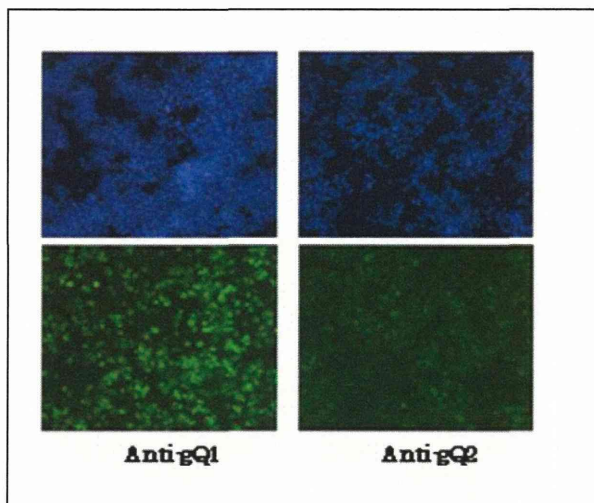


Figure 2 HHV-6B gQ1、gQ2 を 恒常的に発現する細胞

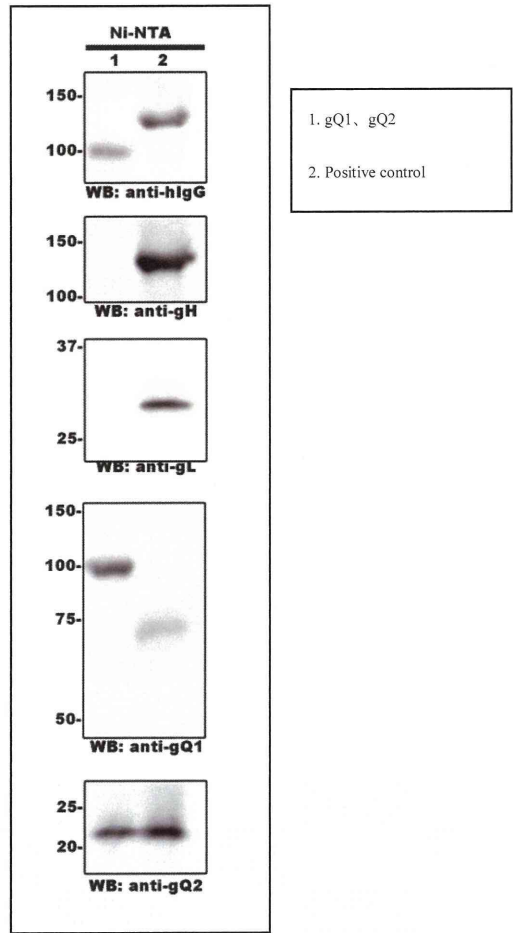


Figure 3 HHV-6B gQ1、gQ2 が分泌された。

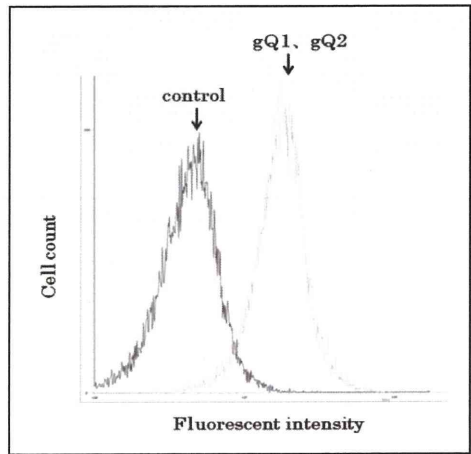


Figure 4 分泌された HHV-6B gQ1、gQ2 は本来の機能を有する。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

HHV-6B ワクチンの安全性評価および四種混合ワクチンへの応用

研究分担者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野・教授

研究要旨

本研究では、既存の四種混合ワクチン（ジフテリア、百日咳、破傷風、ポリオ）の利便性を高める新たな混合ワクチンの開発に向けて、ヒトヘルペスウイルス 6B（HHV-6B）を加えた新たな五種混合ワクチンの開発を最終目標としている。特に、研究代表者が独自に見出した、HHV-6B 感染に必須となる HHV-6B 構造タンパク質のワクチン抗原としての有用性評価は勿論のこと、起炎性やアナフィラキシー惹起といった安全性評価や、四種混合ワクチンに適用した際の（新たな五種混合ワクチン）、有効性・安全性評価を推進するものである。平成 25 年度は、HHV-6B 構造タンパク質のワクチン効果を高め得るアジュバント開発の一環として、ナノ粒子のアジュバント活性を評価した。その結果、高濃度の C₆₀ フラーレン誘導体と LPS の共投与が Th1 型免疫を強く誘導する可能性が示された。また、ナノシリカが、強い抗体産生誘導能を有することが明らかとなった。以上の結果を基に、平成 26 年度には、HHV-6B 構造タンパク質のワクチン抗原としての有用性および安全性を評価すると共に、適切なワクチンアジュバントの探索も進めていく予定である。

A. 研究目的

近年、経鼻噴霧型のインフルエンザ生ワクチン（フルミスト）が開発された。しかし、この経鼻粘膜ワクチンは弱毒株とはいえ、「病原ウイルスそのものを用いた生ワクチン」であることから、その強烈な副作用が懸念され、使用には年齢制限等が厳格にかけられており、ワクチンが真に必要な脆弱な世代（乳児・妊婦など）、心・肺・肝・神経・アレルギーなどの慢性疾患患者に対しては禁忌となっている。また、子宮頸がんワクチンに観られるように、原因不明の副作用が多発するなど、ワクチンの安全性（ワクチンリスク）への社会懸念が高まっている。特に、抗原特異的 IgE 産生に起因するアナフィラキシーショック誘発の

懸念は、未だにワクチン開発における大きな課題となっている。さらには、妊娠期のインフルエンザ感染といった炎症応答が、子供の自閉症リスクを高めるといった可能性が報告されるなど、一世代のみならず、次世代への影響をも加味しつつ、ワクチンの安全性を検証せねばならないと考えられる。従って、今後開発すべきワクチンは、有効なのは当たり前で、安全性が高度に保証されることで、老若男女を問わず、安心してワクチン接種可能であることが必要不可欠となる。

本研究では、既存の四種混合ワクチン（ジフテリア、百日咳、破傷風、ポリオ）の利便性を高める新たな混合ワクチンの開発に向けて、ヒトヘルペスウイルス 6B（HHV-6B）

を加えた新たな五種混合ワクチンの開発を最終目標としている。特に、研究代表者が独自に見出した、HHV-6B 感染に必須となる HHV-6B 構造タンパク質のワクチン抗原としての有用性評価は勿論のこと、起炎性やアナフィラキシー惹起といった安全性評価や、四種混合ワクチンに適用した際の(新たな五種混合ワクチン)、有効性・安全性評価を推進するものである。平成 25 年度には、HHV-6B 構造タンパク質のワクチン効果を高め得るアジュバント開発の一環として、ナノ粒子のアジュバント活性を評価した。平成 26 年度には、本研究成果を活かしつつ、HHV-6B 構造タンパク質のワクチン抗原としての有用性評価および安全性評価を推進する予定である。

B. 研究方法

(1) C₆₀ フラーレンのアジュバント活性評価

本検討では、C₆₀ が 36 個の水酸基で修飾された水酸化 C₆₀ フラーレン (C₆₀OH₃₆) と、アミノ酸のプロリンと類似の骨格を有する官能基で修飾された C₆₀ Pyrrolidine tris-acid (C₆₀Pro) を用いた。C57BL/6 (雌性、7 週齢) にニワトリ卵白アルブミン (OVA、10 µg/mouse) と共に、C₆₀OH₃₆ または C₆₀Pro (100 nM/mouse) をフットパッドに週 1 回、計 3 回共投与した。また、他のアジュバント剤との相乗効果を解析するため、LPS (5 µg/mouse) を共投与する群も設けた。最終投与の 1 週間後、採血を行うと共に、脾細胞を回収した。血中の OVA 特異的抗体価 (IgG、IgE) は、ELISA 法により測定した。また、回収した脾細胞は、OVA (100 µg/mL) で再刺激し、培養上清中のサイトカイン量

を ELISA 法により測定した。

(2) 非晶質シリカの経鼻アジュバント活性評価

本検討では、粒子径 10、30、50、70、100、300、1000 nm の非晶質シリカを用いた(各々、nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 と略す)。C57BL/6 (雌性、7 週齢) に、OVA と各粒子径の非晶質シリカ (OVA: 1 µg/mouse、シリカ: 400 µg/mouse) を、混合物として週 1 回、計 4 回経鼻投与した。最終投与の 1 週間後、採血を行い、血中の抗体価 (IgG) を ELISA 法により測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文科省の指針)」に準拠し、大阪大学および大阪大学薬学研究科、(独) 医薬基盤研究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版

「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」（基発第0331013号）が通達】、2009年3月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果

(1) C₆₀ フラーレンのアジュバント活性評価

炭素原子 60 個が切頂二十面体構造に結合した C₆₀ フラーレン（直径 1 nm）は、従来薬とは全く異なった作用点での抗ウイルス活性や抗菌活性、さらには圧倒的な抗炎症活性（抗酸化活性；活性酸素・ラジカル消去活性）を有するなど、エイズや肝炎、がん、炎症性疾患に対する画期的ナノ医薬として期待されている。本観点から我々は、炎症性腸疾患に対する新規治療薬として、強力な抗酸化活性や抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレンに着目してきた。特に我々は、C₆₀ フラーレン誘導体が、①サイトカイン刺激による炎症性サイトカイン産生を抑制し得ること、②T 細胞や B 細胞など、獲得免疫細胞に対しても、活性化抑制効果を発揮し得ることを明らかとしており、炎症性疾患に対する新たな治療薬として開発を進めている。一方で、C₆₀ フラーレンは凝集性が高く、低濃度域と高濃度域では全く異なる作用が発揮されることも見出しつつある。即ち、低濃度域においては、強い炎症抑制効果が発揮されるものの、高濃度域においては、免疫活性化作用が発揮される可能性を見出している。そのため、安全性などについて精査する必要があるものの、高濃度の C₆₀ フラーレンが、ワクチンアジュバント

トになり得る可能性が考えられた。そこで本検討では、高濃度の C₆₀ フラーレン誘導体を用いて、ワクチンアジュバントとしての有用性を評価した。本検討では、C₆₀ が 36 個の水酸基で修飾された水酸化 C₆₀ フラーレン (C₆₀OH₃₆) と、アミノ酸のプロリンと類似の骨格を有する官能基で修飾された C₆₀ Pyrrolidine tris-acid (C₆₀Pro) を用いた。これら C₆₀ フラーレン誘導体と OVA を共投与した後、抗体価を測定した。その結果、OVA 単独投与群と比較して、C₆₀OH₃₆、C₆₀Pro 共投与群では、OVA 特異的 IgG 産生が有意に増加していた (図 1)。さらに、LPS と共投与した場合においても、LPS によるアジュバント作用との相加作用が確認された (図 1)。次に、脾細胞の培養上清中のサイトカイン (IFN- γ 、IL-4) 産生を評価した (図 2、3)。その結果、C₆₀OH₃₆、C₆₀Pro と OVA の共投与群では、IL-4 産生に若干の産生増強を認めたものの、ばらつきも大きく、T 細胞性の免疫応答がほとんど増強されていないことが示唆された。一方で、LPS を共投与した群では、C₆₀Pro 免疫群で、IFN- γ 産生の増加傾向が認められた。以上の結果から、LPS と C₆₀Pro を共投与することで、Th1 型免疫を強く誘導可能であることが示された。前述したように、C₆₀Pro は凝集しやすい傾向にあり、本投与濃度では、凝集していることが予想される。今後、Th1 型免疫誘導メカニズムが、C₆₀Pro 自身の作用によるものか、凝集体の作用に起因するのかなどを検討する必要があると考えられる。なお本検討では、LPS との共投与モデルを用いた。現在、LPS 誘導体である Lipid A が、ワクチンアジュバントとして応用されつつある。今後は、Lipid A との共投与モデルを

用いた検討も実施する予定である。

(2) 非晶質シリカの経鼻アジュバント作用の解析

我々はこれまでに、非晶質シリカをワクチン抗原キャリアとして適用することで、①樹状細胞における抗原提示能を改変し、Th1、Th2 免疫応答を制御し得る可能性があること、②抗原と共に皮内投与後、抗原単独免疫群と比較して、高い免疫応答を誘導可能（抗原の体内での安定性向上・樹状細胞への送達に成功）であったことから、ナノシリカがワクチン抗原キャリアとして有用である可能性を明らかとしてきた（Hirai et al. Part Fibre Toxicol. 2011 等）。一方で、粒子径の違いが、ワクチン効果に影響するかどうかについては、十分検討できていなかった。そこで本検討では、粒子径の異なる非晶質シリカを用いて、ワクチン効果を比較検討した。その結果、OVA 単独投与群では、OVA 特異的 IgG の産生はほとんど観察されなかった一方で、シリカ共投与群では、いずれの粒子径のシリカ投与によっても OVA 特異的 IgG の産生が上昇することが観察された（図 4）。また、この作用は、シリカの粒子径が 100 nm 以下、所謂ナノサイズで特に強く、粒子径の減少に依存してさらに増強されることが観察された。以上の結果から、同じ質量のシリカを投与した場合、粒子径の小さなナノシリカの方が、より強いワクチン効果を発揮可能であることが示された。

D. 考察および E. 結論

本検討では、高濃度の C₆₀ フラーレン誘導體と LPS の共投与が Th1 型免疫を強く誘導

する可能性を明らかとした。また、ナノシリカが、強い抗体産生誘導能を有することを明らかとした。いずれについても、抗原送達キャリアとして機能しているのか、アジュバントとして作用しているのかは不明であり、今後、詳細なメカニズム解明が必要がある。平成 26 年度には、これら情報を基に、HHV-6B 構造タンパク質のワクチン抗原としての有用性および安全性を評価すると共に、適切なワクチンアジュバントの探索も進めていく予定である

E. 研究発表

該当無し

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

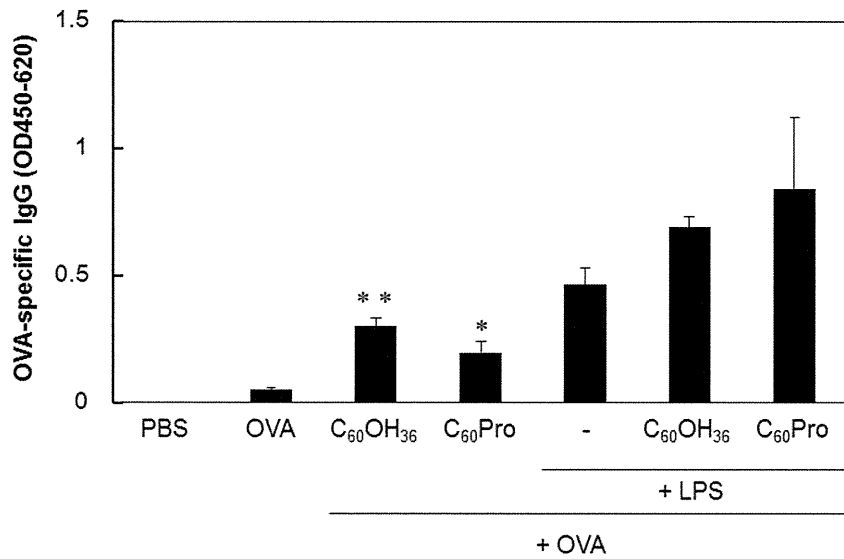


図 1 : C₆₀ フラーレン誘導体のアジュバント活性評価. OVA、C₆₀ フラーレン誘導体および LPS をフットパッドに週 1 回、計 3 回共投与した。最終投与後に血中の OVA 特異的 IgG を ELISA で測定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OVA

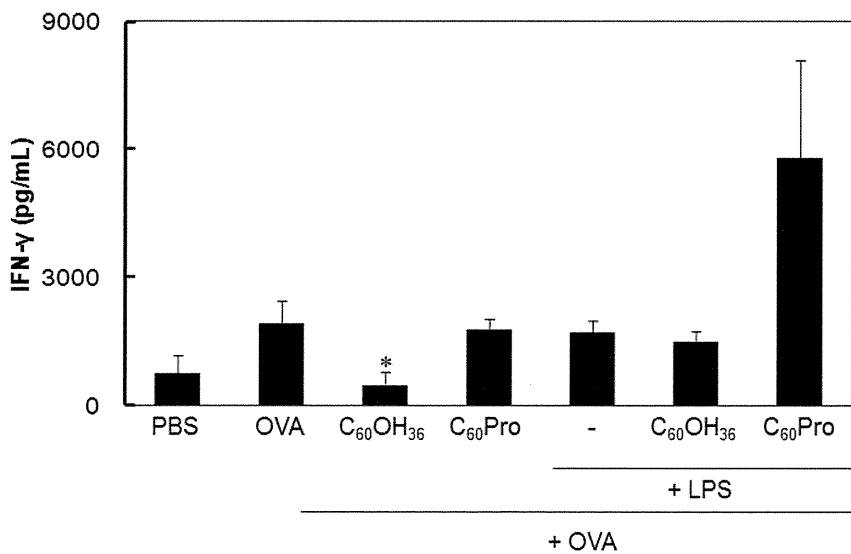


図 2 : C₆₀ フラーレン誘導体のアジュバント活性評価. OVA、C₆₀ フラーレン誘導体および LPS をフットパッドに週 1 回、計 3 回共投与した。最終投与後に、脾臓細胞を再刺激し、培養上清中の IFN- γ を ELISA で測定した。* $P < 0.05$ vs OVA

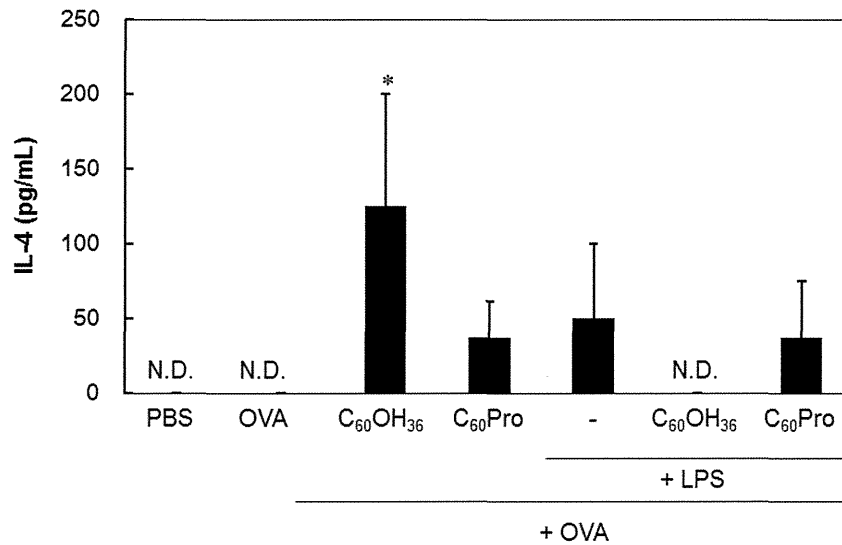


図3: C₆₀ フラーレン誘導体のアジュバント活性評価. OVA、C₆₀ フラーレン誘導体および LPS をフットパッドに週 1 回、計 3 回共投与した。最終投与後に、脾臓細胞を再刺激し、培養上清中の IL-4 を ELISA で測定した。* $P < 0.05$ vs OVA

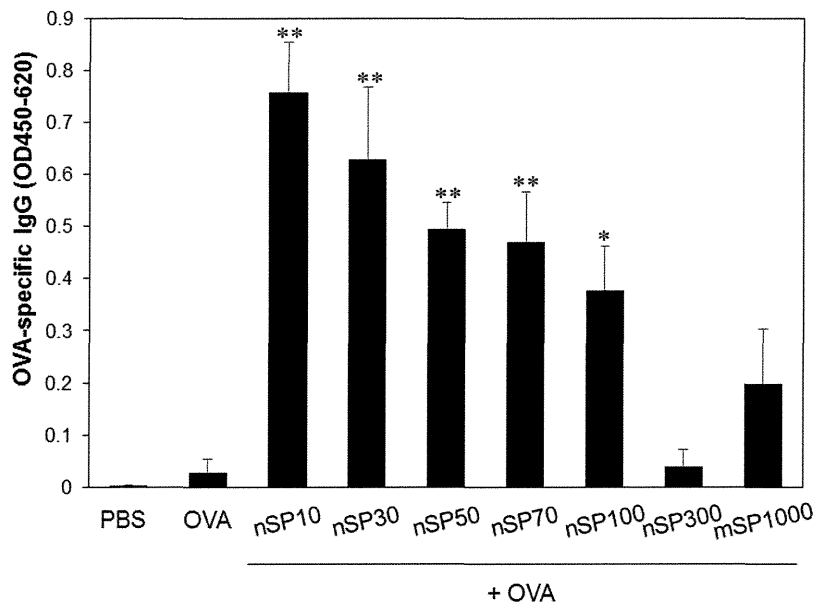


図4: ナノシリカのアジュバント活性評価. 各粒子径の非晶質シリカと OVA を週 1 回、計 4 回経鼻投与した。最終投与後に血中の OVA 特異的 IgG を ELISA で測定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OVA

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

HHV-6B 構造タンパク質の精製および立体構造解析

研究分担者 鶴田宏樹 神戸大学 連携創造本部 応用構造科学産学連携推進センター長

研究要旨

X線結晶構造解析に供試する HHV-6B の構造タンパク複合体を大量発現・精製するために、HEK293S GnTI⁻細胞株のトランスフェクション法の条件を確立し、培地中に含まれる血清タンパク質と組換えタンパク質を His タグアフィニティー精製にて分離できることを確認した。また、来年度の SPring-8 のビームタイムを確保し、X線結晶構造解析の実施環境を整えた。

A. 研究目的

現行の四種混合ワクチンに、社会的ニーズの高いヒトヘルペスウイルス 6B (HHV-6B) ワクチンを加えた新たな五種混合ワクチンを作製することを目的とする。HHV-6B の感染阻止には、ウイルスの構造タンパク複合体 (gH/gL/gQ1/gQ2) をターゲットとした中和抗体が有効である。この構造タンパク複合体の立体構造を決定し、中和抗体との結合様式を理解することで、安全性と有効性の評価を試みる。

B. 研究方法

(1) タンパク質発現系の確立

X線結晶構造解析に供試する HHV-6B の構造タンパク複合体をヒト胎児腎臓由来 HEK293S GnTI⁻細胞 (N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 欠損) 株に発現するために、ポリエチレンイミン (PEI) によるトランスフェクション法の条件を検討した。75 μ l の 1 mg/ml pcDNA4/*myc*-His/*LacZ* (Invitrogen) と 75 μ l の 2 mg/ml ポリエチレンイミン (PEI)

を 4 ml の血清不含 DMEM 中で混合し、室温で 20 分放置した。その後、26 ml の DMEM を加え (終濃度 2%血清含)、80 cm² フラスコで培養した HEK293S GnTI⁻細胞に添加して、一晚培養した。翌日、トリパンブルーあるいは β -Gal Staining Kit (Invitrogen) を用いて細胞を染色し、生存率とトランスフェクション効率を測定した。

(2) 培地中のタンパク質精製法の検討

低血清 (2%) 含有 DMEM 中に含まれる組換えタンパク質を精製する方法として、His タグアフィニティークロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーが有効であるかを検討した。上述 (1) の方法で HEK293S GnTI⁻細胞をトランスフェクションし、3 日間培養した。その後、培地を回収して Tris-HCl バッファーで透析し、遠心分離にて細胞残渣を除き、ニッケルを結合させた HiTrap Chelating HP カラム (GE ヘルスケア) あるいは Resource Q カラム (GE ヘルスケア) に供試した。

(3) SPring-8 ビームタイムの確保