

厚生労働科学研究費 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

ワクチン効果の判定と解析

研究分担者：保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

粘膜より感染を示す病原体には粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。報告者らは既にヒト呼吸器に感染を示すヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(HPIV2)を用い呼吸器粘膜に抗原を伝達する手法において肺結核に対し、マウスにおいてワクチン効果があることを既に報告した。本研究ではこのワクチンがカニクイザルにおけるワクチン効果の検討と、従来までの抗原ではなく新たに4種類の抗原を組み込んだHPIV2による新規ワクチンの作製を行った。カニクイザルに結核抗原Ag85Bを組み込んだrHPIV2-Ag85Bを3~4回経鼻投与したところ、末梢血ならびに粘膜関連リンパ節、肺胞洗浄液にてAg85B特異的免疫反応が認められた。また、従来からワクチン効果があると報告されている抗原ESA-6、感染非発症個体で認識されている2種類の抗原(Latency 1、Latency 2)および高病原性変異時に発現する抗原(Resuscitation)の4種類を組み込んだrHPIV2-CRL2を作製しマウスに経鼻投与したところ特異的免疫を誘導し、その免疫反応は従来までのrHPIV2-Ag85Bと同時投与にて増強されていることが確認された。

以上の事からHPIV2を用いた経鼻結核ワクチンは新たなワクチンとなり得る可能性が示された。

A. 研究目的

エイズ、マラリア、結核(TB)は世界3大感染症と言われ、その中でも結核感染症は空気感染により伝搬することから感染防御が最も困難であると考えられている。更に、近年出現した多剤耐性結核菌(MDR-TB)超多剤耐性結核(XDR-TB)においては、その脅威は著しく増大している。TB予防ワクチンとしては世界中でBCGが使用されているが、成人の肺結核における予防効果が認められないために、現在の世界的な蔓延となっている。近年の免疫学の発展により、多くの感染症が成立する呼吸器や消化器等の粘膜での免疫反応は、生体の全身性の免疫反応と異なり、粘膜において免疫反応を誘導するためには粘膜面に直接抗原を運ぶ必要があることが判明した。このことから現在では肺結核予防のためには粘膜免疫誘導型ワクチンの開発

が必須であると考えられている。本研究ではパラインフルエンザ2型ウイルス(HPIV2)に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を目的とした。

B. 研究方法

1.挿入抗原の確認：リバーシジェネティクス法にて作製した結核抗原遺伝子組み込みHPIV2(rHPIV2-CRL2)をVero細胞に感染させ、mRNAの発現を確認した。
2. rHPIV2-CRL2免疫マウスにおける特異的免疫の誘導：BCG感作マウスにおける免疫反応の測定はマウスにBCGを投与し、6週間後からrHPIV2-CRL2を2週間隔で4回経鼻投与し、最終免疫から2週後に脾細胞において行った。BCG非感作マウスではrHPIV2-CRL2とrHPIV2-Ag85Bを混合して2週間隔で4回経鼻投与し、

最終免疫から 2 週後に脾細胞において特異的免疫反応を測定した (Fig. 1)

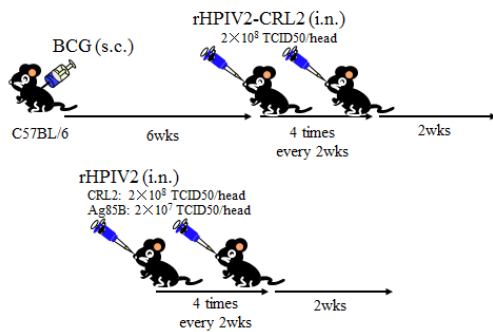


Fig. 1 rHPIV2-CRL2 および rHPIV2-Ag85B 投与スケジュール

3. カニクイザルにおける Ag85B 特異的免疫の誘導: rHPIV2-Ag85B を経鼻投与にてマウスに 2 週間隔 2 ないし 3 ~ 4 回投与した。末梢血、各種リンパ節および肺胞洗浄液を用いた Ag85B 特異的 IFN- γ 細胞を ELISPOT にて測定した。また、HPIV2 に対する抗体も測定した。(Fig. 3)

C. 研究結果

1. 挿入抗原 Ag85B の確認: 挿入抗原である ESAT-6、Latency 1 および Resuscitation の mRNA は rHPIV2-CRL2 感染 Vero 細胞において確認された (Fig. 2)

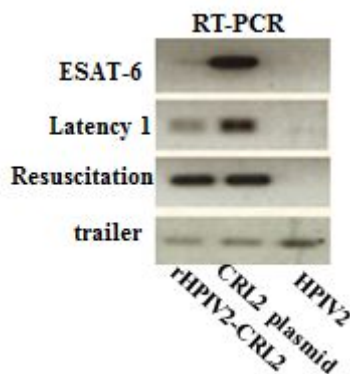


Fig. 2 各 CRL2 mRNA の発現確認

2. rHPIV2-CRL2 免疫マウスにおける特異的免疫の誘導: rHPIV2-CRL2 経鼻投与 BCG 感作マウスにおいて脾細胞の各抗

原特異的免疫反応を見たところ、BCG 単独に比較し、明らかに強い免疫反応が誘導されていた (Fig. 3A)。また、BCG 非感作マウスでは CRL2 各種抗原に対する特異的免疫反応は rHPIV2-CRL2 単独に比較し rHPIV2-Ag85B を混合投与することで増強されていた (Fig. 3B)

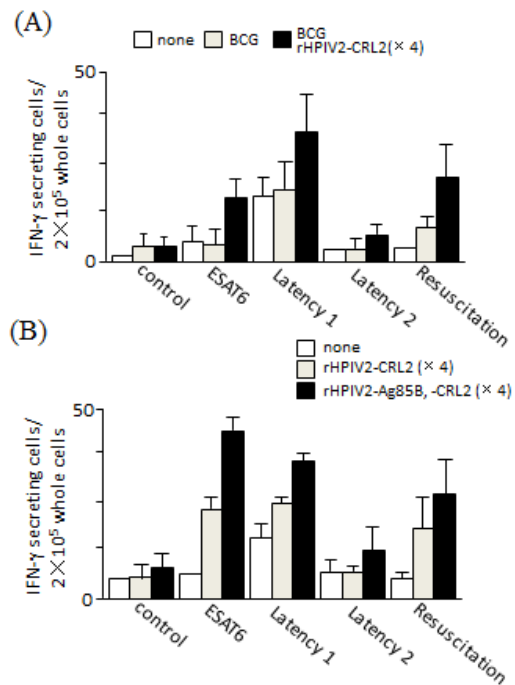


Fig. 3 マウスにおける新規ワクチンの免疫誘導効果

3. カニクイザルにおける Ag85B 特異的免疫と HPIV2 特異抗体の誘導: rHPIV2-Ag85B 免疫カニクイザルにおいて末梢血における Ag85B 特異的免疫反応と血漿中の HPIV2 特異抗体を測定したところ、1 回の免疫でどちらも誘導されていたが、HPIV2 特異抗体の誘導による Ag85B 特異的免疫反応の障害は認められなかった (Fig. 4)

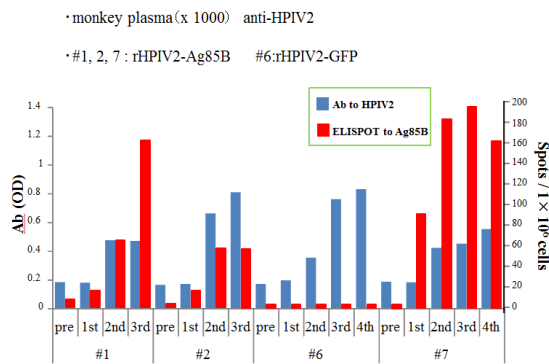


Fig. 4 rHPIV2-Ag85B 投与カニクイザルにおける Ag85B 特異的免疫反応と HPIV2 特異抗体の誘導

4. rHPIV2-Ag85B 経鼻投与カニクイザルにおけるリンパ節および肺胞洗浄液中細胞での Ag85B 特異的免疫反応：経鼻投与カニクイザルのリンパ節と肺胞洗浄液中細胞の Ag85B 特異的免疫反応を見たところ、肺胞リンパ節や腸間膜リンパ節等の粘膜に関わるリンパ節および肺胞洗浄液中細胞で認められた (Fig. 5)。また、リンパ節での反応は体表リンパ節等の粘膜以外の連覇節では認められなかった (data not shown)。

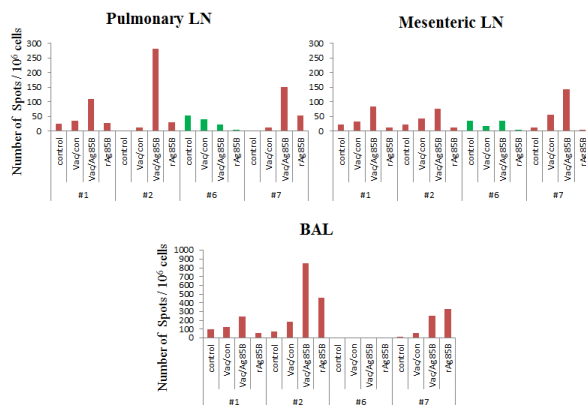


Fig. 5 rHPIV2-Ag85B 経鼻投与カニクイザルにおけるリンパ節および肺胞洗浄液中細胞での Ag85B 特異的免疫反応

D. 考 察

肺結核の予防には呼吸器における粘膜免疫の誘導が必要である。現在用いられている結核の唯一のワクチンである BCG

は、小児の結核性髄膜炎並びに粟粒結核に対しては 80% の防御効果を示すが、成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務であり、我が国はもとより、世界的に見ても重要な課題である。現在、臨床治験進行中および計画をされている結核ワクチンは主に世界的に結核ワクチン開発を行っている国際 NPO 法人 AERAS により示されている (<http://www.aeras.org/candidate>)。それによると臨床治験進行中のものは 7 件、臨床治験準備中のもの 7 件である。その中でウイルスベクターを用いたものは臨床治験に入っているものではアデノウイルス (Ad35)、高度弱毒化改変ワクシニアウイルス Ankara (MVA)、準備中のものではアデノウイルスの血清型の違うもの (Ad4 および ChAd63)、MVA、サイトメガロウイルス (CMV) および我々が開発中のパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) が示されている。しかしながら本研究で目標としている粘膜免疫の誘導を主眼としたものはない。

粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。つまり、肺結核の防御には適切な手法を用いてワクチン抗原を粘膜面へ投与することが重要である。HPIV2 は、ヒトの呼吸器粘膜に感染する病原性の低いウイルスであり、リバーシジェネティック法での作製に成功し、安全なウイルスベクターになり得ることが示された。本ワクチンの特徴としてベクターウイルス抗原より大量かつ早期に挿入抗原が発現することから他のウイルスベクターと異なり、頻回投与が可能であると考えられる。本研究結果でも HPIV2 に対する抗体が誘導されている状態でも、挿入抗原特異的免疫反応の誘導には影響はな

かった。また、本研究では HPIV2 を用いて現在までにワクチン効果の報告の無い非発症個体が認識している抗原および高病原性獲得時に発現する抗原を組み込んだ rHPIV2 も作製した。このことはベクターのみが新規ではなく抗原そのものも世界的に見られないものである。

以上本研究で用いた HPIV2 をベクターとして用いた結核ワクチンは新たなワクチンとしての可能性が示唆された。

E. 結 論

HPIV2 ベクターを用いた結核ワクチンの開発に向けて多様な知見が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park EJ., Fujihashi K., Briles DE., Yasutomi Y., Tsukada H., Akiyoshi K. and Kiyono H. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunology* 2015 E-pub

2. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y., Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GAB β generation in nonhuman primates *PLoS One in press*

3. Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y., Wijaya E|, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A|, Standley DM|, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen *J. Immunol.* 2015 *in press*

4. Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 2014;32:1727-1735.

5. Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014;111:3086-3091.

6. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. *PLoS One* 2014;9: E-pub

7. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. *Mol Ther. Nucleic Acids* 2014:E-pub

8. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y., Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. *J.Am.Heart Assoc.* 2014 E-pub

9. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y., Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. *Parasitol. Int.* 2014 E-pub

2.学会発表

1.加藤 誠一、岡村 智崇、張 險峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏

BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価

第 62 回 日本ウイルス学会学術集会

2014 年 11 月 10 日～12 日パシフィコ横浜会議センター

2.Tsujimura Yusuke, Yasutomi Yasuhiro :

Suppressive effect of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to innate immune response is depending on the interaction with

RIG-I.第 43 回日本免疫学会総会

2014 年 12 月 10 日～12 月 12 日、京都国際会議場

3.藤城（伊藤）康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系としてのカニクイザル MSC を用いた細胞標識の解析。第 61 回日本実験動物学会学術総会。2014 年 5 月 15-17 日。北海道、札幌市

4.塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：新規実験動物としての *Tupaia Belangeri* の飼育および繁殖について 第 157 回 日本獣医学会学術集会 平成 26 年 9 月 9 日～9 月 12 日

北海道、札幌

5.塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：C 型肝炎ウイルスに対する DNA ワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いた Prime/Boost 法による肝炎ウイルス特異的免疫賦活化効果の検討第 18 回 日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日～12 月 7 日 福岡国際会議場

G.知的所有権の出願・取得状況

1. 2014 年 11 月 6 日

「 NOVEL RECOMBINANT BCG VACCINE」

出願番号: 12832210.4

2. 2014 年 11 月 13 日

特許出願 : 特願 2014-229283

発明の名称：C 型肝炎の治療及び / 又は予防用医薬組成物