

201420042A

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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26年度 総括・分担研究報告書

平成27 (2015) 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 26 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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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 26 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

吉岡 靖雄 大阪大学大学院薬学研究科
毒性学分野・准教授

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

西村 光広 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

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

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抗原産生系の構築 -----	3
森 康子	
2. HHV-6B構造タンパク質の免疫誘導能に関する研究 -----	6
森 康子	
3. HHV-6B構造タンパク質の構造解析に関する研究 -----	9
森 康子	
4. ワクチンアジュバントに関する研究 -----	11
吉岡 靖雄	
5. HHV-6B構造タンパク質の精製および立体構造解析に向けた研究 --	30
鶴田 宏樹	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	32
---------------------------	----

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：

ヒトヘルペスウイルス6B(HHV-6B)に対するワクチン原を作製するために HHV-6B 構造タンパク質の発現系およびその精製法を確立した。精製した HHV-6B タンパク質を免疫原としてマウスに免疫した。その結果、マウスの血清中に HHV-6B に対する中和抗体を誘導することができた。また HHV-6B 構造タンパク質の構造を決定するためにその結晶化条件を探索した。ワクチンアジュバントとしてナノシリカの有用性を見出した。さらにナノシリカの粒子サイズにより、サイトカイン産生が異なること、さらには、これまでに知られていなかった新たなメカニズムでサイトカインを産生し得る可能性を見出した。

A. 研究目的

現行の四種混合ワクチンにHHV-6Bワクチンを加えた利便性の高い五種混合ワクチン創生のために本年度はまずHHV-6Bワクチン開発のための研究を行った。

B. C. 研究方法および結果

HHV-6Bのワクチン原として候補としたのはHHV-6Bエンベロープ糖タンパク質複合体であるglycoprotein H (gH) /gL/gQ1/gQ2複合体である。本構造タンパク質のワクチンとしての有効性を検討するため本年度は以下を行った（詳細は分担研究報告に記載）。

1. HHV-6B構造タンパク質の恒常的発現系およびその精製法を確立した。
2. 精製されたHHV-6B構造タンパク質をマウスに免疫することによって構造タンパク質によって誘導される免疫能を解析した。
3. HHV-6B構造タンパク質の立体構造解析のための精製方法および結晶化条件を検討した。

4. ワクチンアジュバントとしてナノシリカの有用性を見出した。ナノシリカの粒子サイズにより、誘導されるサイトカイン産生が異なること、さらには、これまでに知られていなかった新たなメカニズムでサイトカインを産生し得る可能性を示唆した。

（倫理面への配慮）

本研究に関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。

また、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。

D. E. 結論、考察

1. HHV-6B構造タンパク質の発現系およびその精製系を確立することができた。今後は、ワクチンとして投与可能な構造タンパク質の発現系およびその精製法を検討していく必要がある。
2. 精製した構造タンパク質をマウスに免疫することによって中和抗体を誘導することができたことより、ワクチン原として使用できる可能性が見出された。今後は投与量や安全性について検討していく必要があると思われる。さらに安全かつ有効なアジュバントとの組み合わせを考えて、細胞性免疫の誘導についても検討していく必要があると思われる。
3. ナノシリカのサイトカイン産生のメカニズムを解析した。今後は安全性を明らかにし、HHV-6Bワクチンアジュバントとして有効であるかを解析する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

書籍

1. Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The absorption, distribution, metabolism, and excretion profile of nanoparticles., *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application.*, pp. 259-71, 2014.
2. Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Biocompatibility of nanomaterials., *Nanomaterials in Pharmacology.*, in press.

雑誌

3. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Recent topics on

development of nanomaterials and nano-safety science., *Yakugaku Zasshi.*, 134(6), 721-2, 2014.

4. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Nano-safety Science for Sustainable Nanotechnology., *Yakugaku Zasshi.*, 134(6), 737-42, 2014.
5. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Neutrophilia due to silica nanoparticles induces release of double-stranded DNA., *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology.*, 5(5):1000236, 2014.
6. Imai S., Yoshioka Y., Morishita Y., Yoshida T., Uji M., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Size and surface modification of amorphous silica particles determine their effects on the activity of human CYP3A4 in vitro., *Nanoscale Res Lett.*, 9(1):651, 2014.
7. Hata K., Higashisaka K., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Evaluation of silica nanoparticle binding to major human blood proteins., *Nanoscale Res Lett.*, in press.

2. 学会発表

特記すべきことなし

G. 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

3. その他

特記すべきことなし

H. 健康危険情報

特記すべきことなし

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）

（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

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）

1. HHV-6B 抗原産生系の構築

研究代表者・森 康子

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究要旨：

HHV-6B のワクチン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 ワクチン抗原の大量生産方法の確立が不可欠だと考えられる。そこで、本研究では、ウイルス抗原産生細胞を樹立し、大量生産する技術の構築を試みた。

A. 研究目的

HHV-6B ワクチン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 ワクチン抗原の毒性や、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 ワクチンになりうる抗原である glycoprotein H (gH) /gL/gQ1/gQ2 複合体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

Fc タグおよびヒスチジンタグを付加した分泌型 gH および gL 遺伝子を同一の哺乳類細胞発現ベクターに挿入した。また、gQ1 および gQ2 遺

伝子も、同一の哺乳類細胞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 gH、gL 遺伝子発現ベクターおよび gQ1、gQ2 遺伝子発現ベクターを HEK293GnTI 細胞に導入し、ポジティブ細胞を選択した。

(3) gH、gL、gQ1、gQ2 ポジティブ細胞の培養法の確立

上記で作製した gH、gL、gQ1、gQ2 遺伝子を発現する細胞の培地を無血清培地に変更し、培養条件の検討を行った。

(4) gH、gL、gQ1、gQ2 タンパク質の分泌およびその機能の確認

上記の細胞の培養上清を回収し、ヒスチジンタグと結合する Ni-NTA を用いて、分泌されたタンパク質を精製した。精製したタンパク質をウェスタンブロットに供し、HHV-6B gH、gL、gQ1 および gQ2 タンパク質分泌の有無を検討した。また、分泌されたタンパク質と HHV-6B の宿主受容体である CD134 との結合をフローサイトメトリーにより調べた。

(倫理面への配慮)

本研究に参与する遺伝子組換え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の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) HHV-6B gH、gL 遺伝子発現ベクターおよび gQ1、gQ2 遺伝子発現ベクター (dual 発現ベクター) の作製に成功

我々の研究グループは HHV-6B の gH/gL/gQ1/gQ2 複合体を抗原としてワクチンの開発を行っており、それらの 4 つのタンパク質を 1 つの細胞で発現させなければいけないと考えられる。そこで、培養細胞に個々の遺伝子発現ベクターを導入することよりも、dual 発現ベクターを使用する方が、4 つの遺伝子を発現する細胞の作製が容易であると考えられたため、我々は gH、gL 遺伝子発現 dual ベクターおよび gQ1、gQ2 遺伝子発現 dual ベクターを作製した (図 1)。

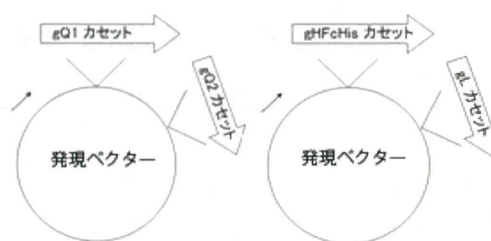


図 1 HHV-6B gQ1、gQ2 遺伝子 dual 発現ベクターおよび gH、gL 遺伝子 dual 発現ベクター

(2) 恒常的に HHV-6B gH、gL、gQ1、gQ2 遺伝子を発現する細胞の作製に成功

上記で作製した dual ベクターを HEK293GnTI 細胞に導入し、ベクターが導入された細胞を選択した。それらの細胞を用いて間接蛍光抗体法で確認したところ、高率に gH、gL、gQ1 および gQ2 遺伝子の発現が認められた (図 2)。

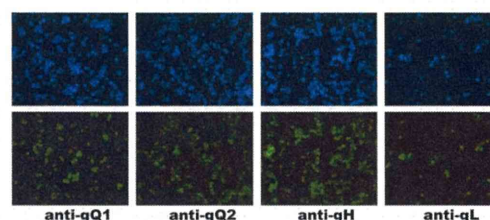


図 2 HHV-6B gQ1、gQ2、gH、gL 遺伝子を 恒常的に発現する細胞

(3) HHV-6B gH、gL、gQ1、gQ2 タンパク質の分泌の確認

上記で樹立した細胞の培地を無血清培地に変更し、その細胞の培地から Ni-NTA を用いてタンパク質を精製し、HHV-6B gH、gL、gQ1、gQ2 タンパク質の分泌をウェスタンブロットにより確認した。その結果、gH、gL、gQ1 および gQ2 タンパク質が培養上清中に分泌されていることが確認され (図 3; 図のうち gQ1FcHis/gQ2 は昨年度本研究で作製した gQ1/gQ2 複合体)、HHV-6B 抗

原発現細胞の無血清培地での培養に成功した。また、その培養上清中には分泌されたタンパク質が複合体（gH/gL/gQ1/gQ2 複合体）として存在していることも示唆された。

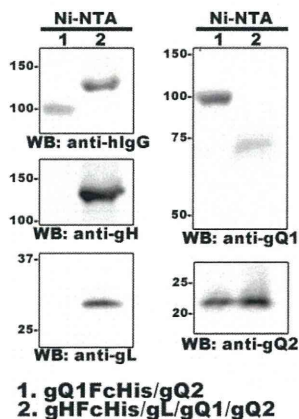


図 3 HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の分泌

(4) 分泌された HHV-6B gH、gL、gQ1、gQ2 タンパク質は 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 gH、gL、gQ1、gQ2 タンパク質が本来の機能を果たすか否かについて検討した。その結果分泌された gH、gL、gQ1、gQ2 タンパク質は CD134 と結合することが明らかとなった（図 4）。よって、分泌された HHV-6B gH、gL、gQ1、gQ2 は本来の機能を持つタンパク質であると考えられる。

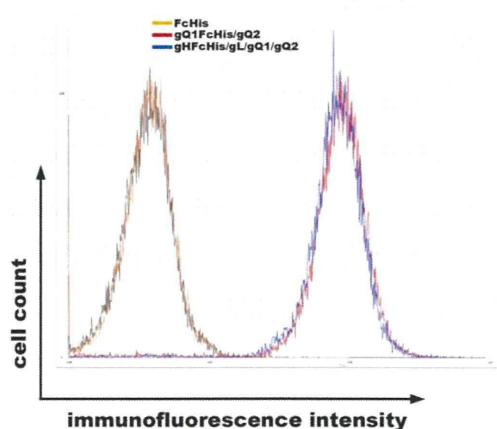


図 4 分泌された HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体は本来の機能を有する

D. 考察

今回、我々は HHV-6B のワクチン抗原になりうる gH/gL/gQ1/gQ2 複合体発現細胞の作製を試みた。本研究で作製した dual 発現ベクターにより、効率的に遺伝子発現が可能となった。また、本研究で確立した無血清培養法では、より精製度が高い抗原の作製が可能となり、これらの抗原のワクチンとしての毒性や免疫原性などのテストに寄与すると考えられる。

E. 結論

効率的な複数遺伝子の恒常発現系の構築に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表
特記すべきことなし
2. 学会発表
特記すべきことなし

G. 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
3. その他
特記すべきことなし

研究協力者: 湯 華民、河端 暁子、西村 光広、
村上 宏起
(神戸大学大学院医学研究科)

2. HHV-6B 構造タンパク質の免疫誘導能に関する研究

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：

HHV-6B glycoprotein H (gH) /gL/gQ1/gQ2 複合体を精製し、マウスへの接種を行い、HHV-6B に対する抗体が誘導されるか否かを検討した。その結果、これらのタンパク質複合体を接種したマウスの血清中に、HHV-6B に対する中和抗体の誘導を確認することができた。

A. 研究目的

現行の四種混合ワクチンに HHV-6B のワクチン抗原を加えて五種混合ワクチンとするために、HHV-6B の構造タンパク質 glycoprotein H (gH)/gL/gQ1/gQ2 複合体のワクチン効果を評価する必要がある。本研究では gH/gL/gQ1/gQ2 複合体を動物に接種し、免疫が誘導されるか否かを検討した。

B. 研究方法

(1) マウスへの HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の接種

精製した HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 構造タンパク質複合体 100 μ g とアジュバントとを混合し、マウスに皮下接種を行った。接種は 2 週間ごとに計 3 回行い、その後採血をして血清を分離した。Fc タンパク質 100 μ g 接種群をコントロールとした (図 1)。

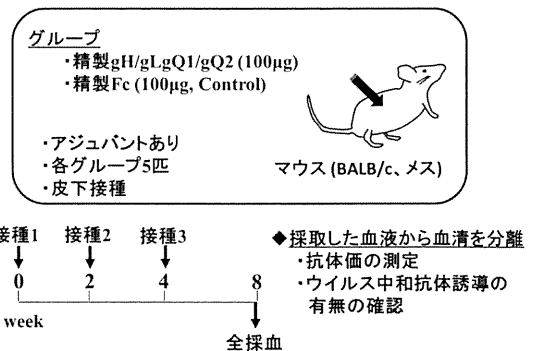


図 1 HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体のマウスへの接種

(2) 抗体価測定

得られた血清を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) により、抗体価の測定を行った。IFA には HHV-6B 感染細胞および HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 遺伝子発現細胞を用い、マウス血清を一次抗体として希釈系列を作製し、IFA で蛍光が観察できた血清の最大希釈倍率を抗体価とした。

(3) ウイルス中和試験

HHV-6B に対する中和抗体価を測定するために、得られたマウス血清を段階希釈し、HHV-6B

と混合して反応させた後、それらを HHV-6B が感染可能な T 細胞と混合して感染させた。5 日後に細胞を回収し、IFA あるいはウェスタンブロットにより感染細胞におけるウイルスタンパク質の発現を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究に関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。

C. 研究結果

(1) 構造タンパク質免疫マウス血清における HHV-6B 抗体価上昇の確認

gH/gL/gQ1/gQ2 複合体を接種したマウスの血清を用いて IFA を行った結果、HHV-6B 感染細胞および gH/gL/gQ1/gQ2 発現細胞の両方において反応が認められ、抗体価の上昇が確認された (表 1)。

表 1 HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体接種マウスにおける抗体価

Fc 100 μ g		HHV-6B	gH/gL/gQ1/gQ2	gH/gL/gQ1/gQ2 100 μ g		HHV-6B	gH/gL/gQ1/gQ2
		感染細胞	発現細胞			感染細胞	発現細胞
Fc 100 μ g	1	<10	<10	gH/gL/gQ1/gQ2 100 μ g	1	160	1280
	2	<10	<10		2	320	640
	3	<10	<10		3	640	640
	4	<10	<10		4	160	640
	5	<10	<10		5	320	640

(2) ウイルス中和試験

得られた血清を用いて HHV-6B の中和試験を行った結果、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体を接種したマウスの血清中に、HHV-6B に対する中和抗体の誘導が確認できた (表 2)。

表 2 HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体接種マウスにおける中和抗体価

中和抗体価			中和抗体価		
Fc 100 μ g	1	<40	gH/gL/gQ1/gQ2 100 μ g	1	80
	2	<40		2	160
	3	<40		3	160
	4	<40		4	80
	5	<40		5	80

D. 考察

本研究において、HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体の接種によりウイルス中和抗体を誘導できることが明らかとなったため、この構造タンパク質は HHV-6B のワクチン抗原として有用であると考えられる。今後はこの構造タンパク質複合体が細胞性免疫を誘導するか否かの検討も行う必要がある。また、gH/gL/gQ1/gQ2 複合体を現行の四種混合ワクチンに添加し、五種混合ワクチンとしての有効性もさらに解析する予定である。

E. 結論

HHV-6B gH/gL/gQ1/gQ2 複合体を接種したマウスにおいて、HHV-6B に対する中和抗体の誘導が認められた。

F. 研究発表

- 論文発表
特記すべきことなし
- 学会発表
特記すべきことなし

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
特記すべきことなし
- 実用新案登録

特記すべきことなし

3.その他

特記すべきことなし

研究協力者:河端 暁子、湯 華民、西村 光広、
村上 宏起
(神戸大学大学院医学研究科)

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)

3. HHV-6B構造タンパク質の構造解析に関する研究

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:

本研究ではワクチン抗原の候補であるgH/gL/gQ1/gQ2複合体の立体構造を明らかとするためにX線結晶構造解析を行うべく、タンパク質精製法の確立、および結晶化条件の探索を行った。精製により均質なgH/gL/gQ1/gQ2複合体を得ることができ、これを用い約1400の結晶化条件を検討した。今後、条件探索の範囲を広げ継続的に結晶化実験を行うことで、X線結晶構造解析に用いる結晶を得ることが期待される。

A. 研究目的

ワクチン抗原として有効性が期待されるHHV-6Bの構造タンパク質 glycoprotein H (gH)/gL/gQ1/gQ2 複合体の立体構造を明らかとすることで、その免疫原性および中和エピートプに関する情報の基盤を得る。X線結晶構造解析を実施する上では、事実上試料の結晶化が律速であり、これを解決するためには高純度試料の大量調製法を確立する必要がある。本研究ではgH/gL/gQ1/gQ2複合体の構造解析に向けて精製法の最適化を検討し、結晶化実験を行った。

B. 研究方法

(1)gH/gL/gQ1/gQ2複合体の精製

HEK293GnTI細胞で恒常的にFcHis融合gH(gHFcHis)、gL、gQ1、gQ2遺伝子を共発現させた培養上清からgHFcHis/gL/gQ1/gQ2複合体の精製を行った。目的タンパク質をNi-NTAアガロース樹脂に結合させ、洗浄後、イミダゾールにより溶出した。PreScission Protease

(GE-Healthcare)によりgHFcHisからFcHis部を切断し、ゲルろ過カラム Superdex 200 pg (GE-Healthcare)によりgH/gL/gQ1/gQ2複合体を精製した。さらに陰イオン交換カラム Mono Q (GE-Healthcare)により精製を行った。

(2)gH/gL/gQ1/gQ2複合体の結晶化

精製したgH/gL/gQ1/gQ2複合体を限外ろ過法で濃縮し、結晶化試料とした。結晶化実験は市販の結晶化条件スクリーニングキット Crystal Screen I & II、Index HT、Crystal Screen Cryo (Hampton Research)、およびWizard I & II (Jena Bioscience)を用い、4°Cあるいは20°Cでシッティングドロップ蒸気拡散法によって行った。

(倫理面への配慮)

本研究では遺伝子組換え実験および動物実験の実施はなく、倫理面における問題はない。

C. 研究結果

(1) gH/gL/gQ1/gQ2複合体の精製

Ni-キレートカラムによる精製を行うことで、gHFcHis/gL/gQ1/gQ2複合体を精製し、培養上清 1 L 当たり約 500 μ g のタンパク質が得られた。PreScission Protease により FcHis を切断した後、ゲルろ過カラムによる精製を行ったところ、gH/gL/gQ1/gQ2複合体は1つのピークとして分離することが出来た (図1)。さらに陰イオン交換カラムにより精製を行い、高純度のgH/gL/gQ1/gQ2複合体を得ることができた (図2)。収量は培養上清1 L 当たり約 150 μ g であった。

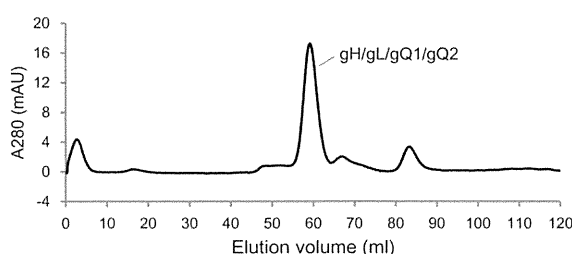


図1 gH/gL/gQ1/gQ2複合体のゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

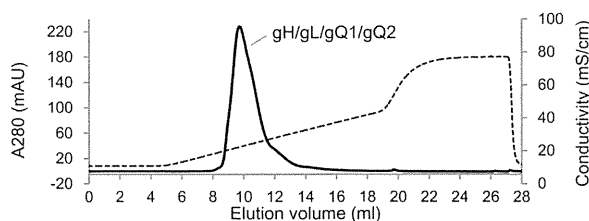


図2 gH/gL/gQ1/gQ2複合体の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製

(2) gH/gL/gQ1/gQ2複合体の結晶化

市販の結晶化溶液338条件に、タンパク質濃度を1から10 mg/ml、温度を4°Cあるいは20°Cとして、1400を超える条件で結晶化条件の探索を行った。引き続き経過観察が必要であるが、現在までにX線回折能を有する結晶は得られていない。

D. 考察

本研究では gH/gL/gQ1/gQ2複合体の X 線結晶構造解析を行うための準備段階であるタンパク質精製法の確立および結晶化条件の探索を行った。gH/gL/gQ1/gQ2複合体はゲルろ過カラムおよび

イオン交換カラムでの精製においても単一ピークとして精製されていることから、均質かつ安定な複合体が維持されていることが示唆される。このことは現在の精製法で結晶化に適した単分散の溶液状態をとる試料が得られている事を意味している。既に得られた試料によって結晶化実験に取り掛かっており、現在は順次経過を観察中である。10 mg/ml まで濃縮した高濃度試料を使った際に、比較的結晶に近い形状のものが得られていることから、今後さらに高濃度の条件で結晶化実験を行うことが有効であると考えられる。精製法の確立により結晶化試料の持続的な調製が可能となったことで、探索に用いる結晶化条件をより幅広くとることができるようになり、継続した実験により結晶が得られることが期待される。

E. 結論

X 線結晶構造解析の準備段階として gH/gL/gQ1/gQ2複合体の精製法を確立し、結晶化条件の探索を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

特記すべきことなし

2. 学会発表

特記すべきことなし

G. 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

3. その他

特記すべきことなし

研究協力者: 西村 光広、湯 華民

(神戸大学大学院医学研究科)

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）

（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

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）

4. ワクチンアジュバントに関する研究

研究分担者・吉岡 靖雄

大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野・准教授

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、ワクチン効果を高め得る抗原送達キャリアやアジュバントの創製や、起炎性やアナフィラキシー惹起といった安全性評価、さらには、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。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を示した。さらに、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。平成 26 年度は、ナノシリカが優れた抗原送達キャリア・アジュバントになり得るという平成 25 年度の成果を基盤として、サイトカイン産生を指標として、アジュバント作用発揮メカニズムの解明を図った。その結果、ナノシリカの粒子サイズにより、サイトカイン産生が異なること、さらには、これまでに知られていなかった新たなメカニズムでサイトカインを産生し得る可能性を見出した。平成 27 年度には、現在開発を進めている生分解性ナノ粒子を用いて、抗原送達キャリアおよびアジュバント送達キャリアの創製を図る予定である。

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。本観点から現在、病原体そのものではなく、病原体由来の蛋白質やペプチドを抗原として使い、有効性と安全性が高度に担保されたワクチンの開発に期待が寄せ

られている。しかし現状では、①免疫担当細胞への抗原送達効率が極めて乏しいこと[適切な抗原送達キャリアが無い]、②病原体に対する防御免疫を効果的に誘導し得るアジュバントが少ないことが決定的な問題となっている。即ち、「抗原送達法とアジュバントの開発、そして安全・安心の確保」が、ワクチン創製に向けた今後の鍵と言える。

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、ワクチン効果を如何に高めるかといった抗原送達キャリアやアジュバントの創製や、起炎性やアナフィラキシー惹起といった安全性評価、さらには、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。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を示した。さらに、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。平成 26 年度は、ナノシリカが優れた抗原送達キャリアになり得るという平成 25 年度の成果を基盤として、サイトカイン産生を指標として、そのメカニズム解明を図った。

B. 研究方法

非晶質シリカ粒子

非晶質シリカ粒子(SP)は、Micromod

Partikeltechnologie (Rostock/Warnemünde, Germany)から購入した。粒子サイズについては、10、30、50、70、100、300、1000 nm(nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000)を用いた。非晶質シリカ溶液は室温で保存し、使用する前に 5 分、400 W、室温でソニケーションし、1 分間ボルテックスした後に使用した。

試薬

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、Polyinosinic acid potassium salt (Poly I)、CytochalasinD、BafilomycinA1、BMS345541、Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate(ATP)は Sigma Aldrich(St. Louis, MO)から購入した。zYVAD-fmk、UNC569 は Merck (Darmstadt, Germany)より購入した。Anti-human CD204 monoclonal antibody、recombinant human IL-1RA は、R&D systems (Minneapolis, MN, USA)から、mouse IgG1 isotype control は Biolegend(Sandiego, CA)から購入した。

細胞

ヒト単球細胞株である THP-1 細胞は、American Type Culture Collection(ATCC; VA, USA)より購入した。10% FBS、1% Ab、0.05 mM メルカプトエタノール含有 RPMI1640 を用い、37°C、飽和蒸気圧、5%CO₂ 条件下で培養した。また、全てのアッセイは、THP-1 細胞を PMA 0.5 μM 入りの培地で 24 時間培養し、マクロファージ様細胞に分化させた後に行った。

LDH アッセイによる細胞傷害性評価

96 穴プレート(nunc)に 3.0×10⁴ cells/100 μl/well で THP-1 細胞を播種し、37°C、飽和蒸

気圧、5% CO₂ 条件下で分化させた後、各粒子サイズの非晶質シリカ、結晶質シリカ、ATP を 10% FBS、1% Ab、5mM メルカプトエタノール含有 RPMI1640 で各濃度に希釈し、培養上清を捨てた後、200 μ l/well ずつ加えた。6、12、24 時間後、培養上清中の LDH 活性を指標として、LDH-Cytotoxic Test (Wako) のプロトコールに準じて、細胞傷害性を評価した。

ELISAによるIL-1 β 、TNF- α 、IL-8、IL-1RA 産生量の測定

96 穴プレート (nunc) に 3.0×10^4 cells/100 μ l/well で THP-1 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で PMA 0.5 μ M を含む培養液を使用し、24 時間培養することで、マクロファージ様細胞に分化させた。各粒子サイズの非晶質シリカ、結晶質シリカ、ATP を 10% FBS、1% Ab、5 mM メルカプトエタノール含有 RPMI で各濃度に希釈し、200 μ l/well ずつ加えた。阻害剤、中和抗体を用いた検討については、阻害剤、中和抗体を 100 μ l ずつ添加しておき、30 分後、非晶質シリカ、結晶質シリカ、ATP を 100 μ l ずつ添加した。6、12、24 時間後、培養上清中の IL-1 β 量を BD OptEIA ELISA kit のプロトコールに準じて、TNF- α 、IL-8、IL-1RA 産生量を eBioscience ELISA Kit のプロトコールに準じて測定した。

フローサイトメトリーを用いたファゴソーム開裂の評価

6 穴プレート (nunc) に 9.0×10^5 cells/3.0 ml/well で THP-1 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で PMA 0.5 μ M を含む培養液を使用し、24 時間培養することで、マクロファージ様細胞株に分化させた。各粒子サイズの非晶質シリカを 10% FBS、1% Ab、5 mM メルカプトエタノール含有 RPMI1640 で各濃度に希釈し、3

ml/well ずつ加えた。6、12、24 時間後、上清をアスピレートし、PBS で 1 回 wash した後、0.2 μ g/ml アクリジンオレンジを含む PBS を 1 ml 添加し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 15 分培養した。その後、PBS で 2 回 wash した後、トリプシンを用いて細胞を 1.5 ml の遮光エッペンに回収し、4°C、400 g、5 分で遠心分離した後、2% FBS、0.05% アジ化ナトリウム入りの PBS に細胞を懸濁し、LSR FACS fortessa を用い、アクリジンオレンジ陰性の領域を解析した。レーザーは付属の Per CP Cy5-5 を用いた。

フローサイトメトリーを用いた caspase-1 の活性評価

6 穴プレート (nunc) に 9.0×10^5 cells/3.0 ml/well で THP-1 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で PMA 0.5 μ M を含む培養液を使用し、24 時間培養することで、マクロファージ様細胞株に分化させた。各粒子サイズの非晶質シリカを 10% FBS、1% Ab、5 mM メルカプトエタノール含有 RPMI1640 で各濃度に希釈し、3 ml/well ずつ加えた。caspase-1 の活性化は Green FAM FLICA Caspase-1 assay kit (ICT; MN, USA) を用い、そのプロトコールに準じて行った。

Western blotting を用いた細胞内 pro-IL-1 β 、上清中 IL-1 β の検出

6 穴プレート (nunc) に 9.0×10^5 cells/3.0 ml/well で THP-1 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で PMA 0.5 μ M を含む培養液を使用し、24 時間培養することで、マクロファージ様細胞株に分化させた。各粒子サイズの非晶質シリカ、結晶質シリカ、ATP を 10% FBS、1% Ab、50 μ M メルカプトエタノール含有 RPMI1640 で各濃度に希釈し、3 ml/well ずつ加えた。6、12、24 時間後、培養上清を回収した後、PBS で 2 回

wash し、Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) を 500 μ l ずつ加え、常温で 5 分間振盪した後に、1.5ml エッペンに回収した。タンパク量は BCA assay (Pierce) のプロトコールに準じて評価した。24 時間後の培養上清はメタノール-クロロホルム法を用いて濃縮した。回収した上清と等量のメタノール、四分の一量のクロロホルムを加え、ボルテックスした後、4°C、20000g で 10 分遠心分離した。上清を捨てた後、500 μ l のメタノールを加え、さらに 4°C、20000g、10 分で遠心分離した。上清を捨てた後、室温で乾燥させ、滅菌水 20 μ l に溶解した。細胞溶解液、濃縮した培養上清共に 5% 2-mercaptoethanol (Nacalai tesque; Kyoto, Japan) 含有 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) を等量混合し、95°C で 5 分処理した後、各サンプルを 10-20% e-PAGE (Atto; Tokyo, Japan) に添加した。Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) は、ゲル 1 枚当たり 14 mA で 10 分間電気泳動した後、40 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。なお、分子量マーカーとして Precision Plus Protein Kaleidoscope molecular weight markers (Bio-Rad Laboratories)、および MagicMark Western Standard (Invitrogen; Carlsbad, CA) を用いた。電気泳動後のゲルを PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA) に、ゲル 1 枚当たり 50 mA の定電流で 1.5 時間転写し、1% BSA/PBST (0.1% Tween 20 を含む Phosphate Buffered Saline) を添加して 2 時間ブロッキングした。1% BSA/PBST で 500 倍希釈した monoclonal antibody to human IL-1 β /IL-1F2 (R&D systems) を添加し、緩やかに振盪させながら室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、1% BSA/PBST で 50000 倍希釈した HRP/anti-mouse IgG (Sigma) を添加し、振

盪させながら室温で 1 時間反応させた。洗浄後、PVDF 膜を SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific; Hudson, NH) で処理し、発光像を ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) により撮影した。なお、内在性コントロールとして、 β -Actin の発現を評価した。 β -Actin の発現評価には、一次抗体として Monoclonal Anti- β -Actin antibody (sigma aldrich)、二次抗体として HRP/anti-mouse IgG (Sigma) を用いた。

統計解析

個々の実験ごとに、多重比較検定 (Williams 法) を行うことにより、コントロールとなる non treat 群に対するシリカ添加群の統計学的有意差を検定した。なお、解析ソフト (エクセル統計 2008, SSRI, Japan) を用い、統計学的有意差は $p < 0.05$ の場合を有意であるとした。

(倫理面への配慮)

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

粒子サイズと起炎性の連関

本検討では、粒子径 10、30、50、70、100、300、

1000 nm の非晶質シリカ粒子 (nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000) を用い、粒子サイズとサイトカイン産生の連関を解析した。本検討では、ワクチン効果への関与には諸説あるものの、微粒子状物質により誘導される IL-1 β 産生を指標に評価した。また、ポジティブコントロールとして、NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 β 産生を誘導することが知られる結晶質シリカ、ATP を用いた。まず、ヒト単球細胞株 (THP-1 細胞) を PMA によってヒト単球マクロファージ様細胞株 (THP-1 細胞) に分化し、各粒子サイズの非晶質シリカ粒子を添加し、6、12、24 時間後の細胞傷害性を LDH assay 法、培養上清中の IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 量を ELISA 法によって測定した。その結果、本検討における非晶質シリカ添加濃度域では、全ての粒子サイズで 90% 以上の細胞生存率であり、ATP では概ね 100%、結晶質シリカに関しては 80% 以上であった。IL-1 β 産生量については、結晶質シリカ、ATP 添加群においては、添加後 6 時間から IL-1 β が検出された。一方で、非晶質シリカ粒子添加群では、6、12 時間において IL-1 β が検出されたものの、粒子サイズ間に顕著な差は観察されなかった。一方で 24 時間において、1000 nm から 50 nm にかけては、粒子サイズの減少に伴って IL-1 β 産生量が増大し、50 nm から 10 nm にかけては減弱した (Fig. 1A)。即ち、ベルシェイプ型のサイトカイン産生応答が引き起こされることが示唆された

IL-1 β は、細胞内酵素である caspase-1 により、生理活性を持たない pro IL-1 β の前駆体部分が除去されることによって、生理活性を持つ成熟型として細胞外に分泌される。ELISA 法では、IL-1 β と同時に、培養上清中に漏れ出した pro IL-1 β を検出してしまうことが懸念される。そこで、培養上清中に成熟型の IL-1 β が産生されている

ことを、western blotting 法を用いて確認した。その結果、少なくとも結晶質シリカ、ATP、nSP50 添加群の上清において、成熟型の IL-1 β が検出された (Fig. 1B)。また、TNF- α については、シリカ添加後 6、12 時間において、nSP100、mSP1000 添加群で微量に産生されたものの、他の粒子径を添加した群では検出されなかった。一方で、24 時間においては、非晶質シリカ粒子添加群において産生されており、IL-1 β 産生と同様の、nSP50 を極大とする傾向が認められた (Fig. 2)。

以上の検討より、特定の粒子サイズで強くサイトカイン産生が誘導される、粒子サイズ特異的な炎症応答の存在が示された。本結果より、ワクチンキャリアの開発においては、キャリア自身の免疫誘導活性をも期待する場合、粒子サイズを十分考慮する必要があることが示された。

微粒子による、既存の IL-1 β 産生経路と粒子サイズの関係

NLRP3 を介して IL-1 β が産生されるためには、その前段階として、I. 核内移行因子である NF- κ B の活性化を介して、IL-1 β の前駆体であり、生理活性を持たない pro IL-1 β が細胞質に誘導されること、II. caspase-1 の活性化により、pro IL-1 β の前駆体部分が切断され、成熟型 IL-1 β が生成されること、の二つの過程が必須である。このうち、一般的に微粒子は、II の経路を活性化することで、IL-1 β の産生を引き起こすと考えられている。そこで、各粒子サイズの非晶質シリカ粒子による IL-1 β の産生誘導が、既存の報告と同様の機序によって誘導されているかを検証した。

最初に、上記の過程である粒子の取り込みと IL-1 β 産生の関連に関して、アクチン重合阻害によって、ファゴサイトーシスを阻害する