

201447014A

厚生労働科学研究委託費
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

HTLV-1 予防ワクチンの開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

平成27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究委託費
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

HTLV-1 予防ワクチンの開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

平成27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（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）による委託業務として、長谷川 秀樹（受託者の名称）が実施した平成26年度「HTLV-1予防ワクチンの開発に関する研究（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

- HTLV-1 予防ワクチンの開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
長谷川 秀樹

II. 委託業務成果報告（業務項目）

- HTLV-1 感染阻止の為の粘膜免疫誘導に関わる研究開発・・・・・・・・・・ 13
—ワクチン抗原のデザインと作製—
長谷川 秀樹

- 高い HTLV-1 感染細胞傷害能を有する CTL 誘導に関わる研究開発・・・・・・・・ 21
俣野 哲朗

- プロテオミクス解析、バイオマーカー探索、薬剤スクリーニングに関わる
研究開発・・ 23
—無細胞蛋白質合成系を用いた HTLV-1 蛋白質の合成とワクチン開発への応用—
梁 明秀

- エピトープ解析、モデルマウスに関わる研究開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
—HTLV-1 の免疫病態、発症予防ワクチンの解析を目指したマウスモデルの作製—
外丸 詩野

- ヒト化マウスを用いた感染予防ワクチンの評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
—HTLV-1 感染モデルマウスを用いた抗 Tax ペプチドワクチンの評価—
田中 正和

III. 学会等発表実績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35

I. 委託業務成果報告(総括)

HTLV-1 予防ワクチンの開発に関する研究

業務主任者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長

研究要旨 HTLV-1 感染症にはいまだ有効なワクチンが存在せず、感染コントロールのために、HTLV-1 感染予防ワクチンの開発が求められている。そこで、本研究では、最も有力な感染防御抗原候補である Env タンパク質を抗原とした不活化ワクチン開発を目指し、実用的なワクチン抗原製造系として実績のある昆虫細胞タンパク質合成系を用いて Env タンパク質合成系の構築を試みた。また我々は、これまでにコムギ無細胞タンパク質合成系により作製した可溶化全長 HTLV-1 ウイルスタンパク質と簡便で迅速な検出が可能な化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ、アルファスクリーン法を用いた抗原抗体反応の検出系を構築し、HTLV-1 感染患者および ATL 患者の血清に含まれる抗 HTLV-1 ウイルスタンパク質抗体の検出を行なった。全長 Gag、Tax-1、Env に対する抗体が検出された患者血清を用いて、抗体認識部位の同定および HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける抗 HTLV-1 抗体の検出を試みた。同ヒト化マウスを用いて Tax ペプチドワクチンの経鼻および皮下投与による HTLV-1 感染細胞抑制効果の検討においては非投与マウス群は感染 8 週間後にほとんどのマウスが白血病死したのに対し、ワクチン投与マウス群は半数以上が長期に生存した。HTLV-1 感染予防ワクチンあるいは HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチンとして Tax ペプチドワクチンの皮下投与および鼻腔投与が有効であることが示された。HTLV-1 感染後の ATL 発症には免疫老化の関連が示唆されている。ワクチン効果を判定する目的、あるいは HTLV-1 関連疾患の免疫病態を解析する目的で、あらたなモデルである Tax/ β 5t ダブルトランスジェニックマウス (Tax/ β 5t-Tg) を作製し、解析を行い有用なモデル動物の開発を目指している。

担当責任者

侯野 哲朗

(国立感染症研究所エイズ研究センター・センター長)

梁 明秀

(横浜市立大学医学部微生物学・教授)

外丸 詩野

(北海道大学大学院医学研究科・准教授)

田中 正和 (関西医科大学微生物学・助教)

A. 研究目的

HTLV-1 キャリアに対する発症予防ならびに授乳による感染リスクを低減させる手段として、ワクチン接種が考えられている。現在までに実用化されたレトロウイルス感染症予防ワクチンは存在しないが、HTLV-1 の感染はウイルス表面の糖タンパク質である Env タンパク質に対する抗体により中和されることが知られていることから、Env タンパク質を主要抗原とする不活化ワクチンが感染予防ワクチンとして有望であると考えられる。一

一般的なウイルス感染症の不活化ワクチンは、感染性ウイルス粒子をホルマリンなどで不活化することにより作成するが、HTLV-1は、*In vitro*において、ウイルス粒子の産生が悪く従来のウイルス不活化ワクチンの製造方法では、HTLV-1ワクチンを製造することは極めて難しい。そこで、感染防御抗原である Env タンパク質を何らかの方法で発現および精製したリコンビナントワクチンを開発する必要がある。我々は、これまでコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した HTLV-1 Env 全長タンパク質を用いたリコンビナントワクチンの開発を進めたが、十分な免疫を誘導するのに多量の抗原を必要とすることから、製造コストなどを考慮すると実用化は非常に難しいと考えられた。また、哺乳類培養細胞系を用いて、細胞外ドメインに三量体化シグナルを融合した抗原タンパク質の発現系の構築を試みたが、発現レベルが低くワクチン実験の実施は困難であった。そこで、本研究では、実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、ワクチン抗原製造系として実績のある昆虫細胞タンパク質合成系のシステムを用いて HTLV-1 Env 抗原の合成を試みた。

また近年、ATL や HAM 発症患者における患者血清中の HTLV-1 特異的抗体のプロファイリングが報告され、発症患者血清中の抗体価と疾患発症の関連性が解明されつつある。しかしながら、報告されている手法は、培養細胞への遺伝子導入により合成したウイルスタンパク質を患者血清を用いて免疫沈降する方法であり、定量性に問題がある。また一般的に結合能の弱い抗体は検出できない。

我々は、これまでにコムギ無細胞系により作製した可溶性全長 HTLV-1 タンパク質とアルファスクリーン法を活用した抗体検出法により、HTLV-1 感染患者および ATL 患者の血清中に含まれる抗 HTLV-1 タンパク質抗体の検出を行なった。本年度は、全長 Gag、Tax-1、Env タンパク質に対する抗体が検出された患者血清を使って、抗体の認識部位の同定を試みた。

HTLV-1 感染キャリア個体内における HTLV-1 感

染細胞の制御には、Tax 特異的 CTL が主要な役割を果たしていることが、ATL の幹細胞移植治療後の寛解時に Tax 特異的 CTL の再構築が観察されることや、免疫不全ラットへの Tax 特異的 CTL の移植により HTLV-1 感染 T 細胞の腫瘍増殖が抑制されることなどから示されている。

我々は HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチンの開発とその評価を目的として、ヒトの造血・免疫系を持つ HTLV-1 感染ヒト化マウスの樹立を試み、ATL 様病態および抗 HTLV-1 宿主免疫の誘導を再現した。そこで本年度は、HTLV-1 感染ヒト化マウスの系を用いて、抗 Tax 細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導を介した抗 HTLV-1 ワクチンの有効性を検討した。

HTLV-1 関連疾患の免疫病態を解析する目的で、さらにワクチン効果を判定する目的で、あらたなモデルである Tax/ β 5t ダブルトランスジェニックマウス (Tax/ β 5t-Tg) を作製した。HTLV-1 関連疾患の免疫病態が明らかとなり、有効なワクチンが開発されることで、HTLV-1 関連疾患の発症予防が期待される。

B. 研究方法

1. 組換えバキュロウイルスの作製

本研究では、精製工程を簡略化しつつ感染性ウイルスの Env と同一の構造を呈したリコンビナント抗原を得るために HTLV-1 の Env の細胞外ドメインに、Fibritin trimerizing sequence 及びヒスチジンタグを融合した Env キメラ遺伝子を用いて組換えバキュロウイルスを作製した。まず、HTLV-1 Env キメラ遺伝子を組み込んだトランスファーベクター pVL1392-Env を作製した。その後、組換え体由来のプラーク単離を行った。

2. 組換えバキュロウイルスの増幅とスクリーニング

(1) ウイルス液の 1 継代目の調製

Sf9 細胞の生細胞密度が 1.7×10^6 cells/mL、生存率が 90%であることを確認し、ウイルス液添加 1 時間前に 25 cm² ベントキャップ付きフラスコに

0.2×10⁶ cells/mL で5 mL の Sf9 細胞を播種し、20 分間以上ベンチで静置した。その後、約 1 mL のプラーク純化アッセイで調製したウイルス液を添加し、28°C で5日間インキュベートした。インキュベートした培養液を1,000 rpm で10分間遠心し、上清をウイルス液1継代目 (vP1) とした。

(2) リコンビナントタンパク質発現の確認

培養上清回収後のチューブに残った細胞沈殿物を0.5 mL の PBS に再懸濁し、懸濁液に等量の2×DB 又は2×NDB を混和し、95°C で5分間加熱し試料とした。試料は SDS-PAGE および Western Blotting にて発現確認を行った。

(3) ウイルス液の2継代目の調製

ウイルス液播種前日に1.0×10⁶ cells/mL として250 mL スピナーフラスコ (培養液量100 mL) に細胞を調製した。培地は PSFM 培地とした。生細胞密度が1.73×10⁶ cells/mL 及び生存率が97.0%であることを確認し、1.0 mL のクローン番号018-#12 の vP1 ウイルス液を添加した。28°C で48時間インキュベートした。回転数は100 rpm とした。播種後0日から回収日まで培養液をサンプリングし、生死細胞数計測装置にて細胞パラメータを計測した。インキュベート後、培養上清を50 mL コニカルチューブに移し、1,000 xg (~1,500 rpm) で5分間遠心し、上清をウイルス液2継代目 (vP2)、ロット番号: YVHT032114 とした。遮光で4°C保管した。

(4) ウイルス液の3継代目の調製

ウイルス液播種前日に0.5~1.0×10⁶ cells/mL として3L スピナーフラスコ (培養液量500 mL) に細胞を調製した。培地は PSFM 培地とした。生細胞密度が1.77×10⁶ cells/mL 及び生存率が96.5%であることを確認し、1.5 mL の vP2 を添加した。28°C で72時間インキュベートした。回転数は100 rpm とした。播種後0日から回収日まで培養液をサンプリングし、生死細胞数計測装置にて細胞パラメータを計測した。インキュベート後、培養上清を無菌の500 mL 遠心チューブに移し、6,000 xg (~4,500 rpm)、4°C で15分間遠心した。上清を無

菌のプラスチックボトルに回収する。これをウイルス液3継代目 (vP3)、ロット番号: YVHT032414 とした。遮光で4°C保管した。

3. 発現培養

(1) 発現培養条件の検討

前日に1.0×10⁶ cells/mL として250 mL スピナーフラスコ (培養液量100 mL) に細胞を調製した。培地は PSFM 培地とした。生細胞密度が1.88×10⁶ cells/mL 及び生存率が97.3%であることを確認し、2 mL (培養液100 mL の2%容量) の vP3 (ロット番号: YVHT032414) を添加した。28°C で6日間インキュベートした。回転数は100 rpm とした。播種後0日から回収日まで培養液をサンプリングし、生死細胞数計測装置にて細胞パラメータを計測した。また、サンプリング試料のうち500 µL は、5,000 rpm で10分間遠心し、培養上清 (medium) と細胞画分に分けて回収して-80°C ですべての試料がサンプリングできるまで保管した。凍結した細胞画分を100 µL の0.5%トリトン X-100/PBS で再懸濁し、氷上で15分間静置した後、10,000 rpm で15分間遠心し、上清 (可溶画分、supernatant) と沈殿 (不溶画分、pellet) に分けて回収した。不溶画分は、回収した可溶画分と同量の0.5%トリトン X-100/PBS に再々懸濁した。培養上清、可溶画分及び不溶画分に5×DB 又は5×NDB を混和し、95°C で5分間加熱し試料として SDS-PAGE および Western Blotting に供した。

(2) 1 L スケールの発現培養

前日に1.0×10⁶ cells/mL として、2本の3L スピナーフラスコ (培養液量500 mL) に細胞を調製した。培地は PSFM 培地とした。生細胞密度が2.0×10⁶ cells/mL 及び生存率が97.1%であることを確認し10 mL (培養液500 mL の2%容量) の vP3 (ロット番号: YVHT032414) を添加した。発現培養時の温度は28°Cとし、スピナーフラスコの回転数は100 rpm とした。播種後0日から回収日まで毎日培養液をサンプリングし、生死細胞数計測装置にて細胞パラメータを計測した。播種後48時間

まで発現培養をおこない、発現培養液を遠心ボトルに回収した。5,000 xg で 10 分間の遠心をおこない、培養上清を回収した。発現培養期間中の培養液は毎日サンプリングし、総細胞密度、生細胞密度、及び生存率を測定した。また、サンプリング試料のうち 500 μ L は 5,000 xg で 10 分間遠心し、培養上清 (medium) と細胞画分に分けて回収して -80°C ですべての試料がサンプリングできるまで保管した。凍結した細胞画分に 100 μ L の 0.5% トリトン X-100/PBS に再懸濁し、氷上で 15 分間静置した後、10,000 rpm で 15 分間遠心し、上清 (可溶画分, supernatant) と沈殿 (不溶画分, pellet) に分けて回収した。不溶画分は回収した可溶画分と同量の 0.5% トリトン X-100/PBS に再々懸濁した。培養上清、可溶画分及び不溶画分に 5 \times DB 又は 5 \times NDB を混和し、 95°C で 5 分間加熱し試料として SDS-PAGE および Western Blotting に供した。

4. コムギ無細胞系による HTLV-1 Gag, Tax-1, Env 部分タンパク質の合成

HTLV-1 (strain Japan ATK-1 subtype A) がコードする全長 gag, env, tax-1 を挿入した無細胞タンパク質発現ベクター pEU-His-ORF-bls (bls; biotin ligation site GLNDIFEAKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS) を鋳型に、各々 Gag; p19, p24, p15, Tax-1; 1-115, 116-248, 249-353, Env; gp46, gp21 の deletion mutant タンパク質を発現するベクターを作製した。作製した pEU ベクターを鋳型に SPu primer 及び AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製し、SP6 polymerase を用いた転写反応により mRNA を合成、続いてコムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。合成時には界面活性剤である Brij35 や塩化亜鉛 ZnCl_2 の添加によりウイルスタンパク質の可溶化を亢進させた。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞系で合成した biotin ligase 1 μ l ($\sim 50\text{ng}/\mu\text{l}$) および終濃度 0.5 μM Biotin を加えることにより行った。

5. 化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ、アルファスクリーン法による患者血清中の抗体検出

C 末端をビオチン化した HTLV-1 全長タンパク質 Gag, Tax-1, Env の各 deletion mutant タンパク質を無細胞合成し、抗原特異的抗体または患者血清と混合後、Alphascreen 検出用ビーズを加えることで、抗原タンパク質の C 末端にストレプトアビジンコートされたドナービーズが結合し、抗原に結合した特異抗体にプロテイン G がコートされたアクセプタービーズが結合する。これら 2 つのビーズが近接した複合体を形成させた後、680 nm の励起光を照射することで、ドナービーズ周囲の酸素分子が一重項酸素に変換され 200 nm の範囲で溶液中を拡散し、アクセプタービーズを発光させシグナルとして検出される。特異的抗体が存在しない場合は、ビーズ同士が近接できないためシグナルが検出されないというアイデアに基づいている。

6. ヒト化マウスへの HTLV-1 感染

ヒト化マウスは γ 線全身照射 (5Gy) 処置した 6 週齢 NOG-SCID マウス下肢大腿骨骨髓内にヒト臍帯血由来 CD133 陽性造血幹細胞 (5 $\times 10^4$ 個) を注入・移植し作成した。骨髓移植 4 ヶ月時に、末梢血における CD3 陽性ヒト T リンパ球の発現を確認後、放射線照射 (10Gy) により増殖能を欠失させた HTLV-1 感染 Jurkat 細胞 (JEX 細胞) 5.0 $\times 10^6$ 個を腹腔内接種した。細胞接種後、2 週毎に末梢血から採血を行い、感染ヒト血球細胞の動態を FACS 解析にて、また HTLV-1 感染細胞数を定量的 PCR にて計測した。

7. ヒト化マウスへのワクチン接種

骨髓移植 4 ヶ月時のヒト化マウスに、経皮的あるいは経鼻的に Tax ペプチドワクチンを 7 日間隔で 3 回および 2 回それぞれ投与し、ワクチン最終投与 1 週間後に JEX 細胞を腹腔内接種することで、HTLV-1 を感染させた。Tax ペプチドワクチンは、

Tax 全アミノ酸配列 (353 a. a.) を 12 分割し、ペプチド間で 5~8 アミノ酸の重複を持った 40 アミノ酸長のロングペプチドを合成し、皮下投与では 1 匹につき 1 回あたり各 8 μ g、合計 96 μ g を使用し、鼻腔投与では 1 匹につき 1 回あたり各 0.5 μ g、合計 6 μ g を使用した。アジュバントとして、コレラ毒素 B サブユニット (CTB) [1 μ g] および TLR 7/8 アゴニスト (R848) [15 μ g] を使用、比較した。

8. FACS

蛍光標識された各種抗ヒト血球表面抗原抗体 (CD45、CD3、CD8、CD25) を用いてフローサイトメトリー (BD FACS Canto™II: BD) を行い、末梢血中の血球細胞の種類および表面抗原の発現変化を解析した。

9. 感染細胞の定量

分離された PBMC からゲノム DNA を分離し、HTLV-1 プロウイルス pX 領域を標的とした TaqMan Probe 法による定量的 PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。内部標準として human β -globin 遺伝子を標的とした定量的 PCR を行い、ヒト単核球画分における HTLV-1 感染細胞の比率を算出した。

10. サイトカインの測定

分離された PBMC から遠心法を用いて血清を調製し、Bio-Plex Human Cytokine 17-Plex Panel (Bio-Rad) を用いて計測した。

11. HTLV-1 Tax tetramer の測定

HTLV-1 Tax 特異的 CTL を測定するためにテトラマー試薬 (MBL 社) を用いた。

12. マウスモデルの作製

β 5t-Tg の作製には、発現プロモーター pCAGGS (CMV-IE、chicken β -actin、rabbit β -globin) を用い、C57BL/6N (B6) をバックグラウンドとして、マウス β 5t cDNA を全身発現するトランスジェニックマウスの作製をオリエンタル酵母 (株) に

委託した。また、Tax トランスジェニックマウスを国立感染症研究所より供与を受け、 β 5t-Tg と交配した。産出した仔マウスの尾組織より DNA を抽出し、 β 5t および Tax 遺伝子導入の状態を確認した。

13. 組織学的解析

Tax/ β 5t-Tg を 6 ヶ月の経過観察の後、犠牲死させ、組織を採取した。HE 染色標本、および末梢血の塗抹標本を作製し、ATL 発症の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可の下に適切な封じ込め設備を有した実験室内で実験が実施された。ヒト検体を使用した実験を実施しているが、臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則に則り、当該患者 (感染者) の同意を得た上で行った。ヒト臍帯血は日本赤十字近畿さい帯血バンクにおいて、提供者の同意の下に採取されたもののうち、移植に用いられないロットを研究内容および倫理項目を審査、許可された後に研究用として提供されている。

C. 研究結果

1. 組換えバキュロウイルスの作製

2 回のトランスファーベクター共移入試験より得たウイルスシード液を用いてプラークアッセイをおこなった。プラークにはいずれも封入体は見られなかったため、相同組換え体と判断した。共移入試験 1 回目より 10 個、共移入試験 2 回目より 10 個のプラークをピックアップし、ウイルス液 1 継代目を調製した。

2. ウイルス液 1 継代目の調製

ウイルス液を添加したフラスコの細胞は、添加

後3日目から細胞が浮遊し、細胞密度が上昇しなかった。陰性対照として、ウイルス液を添加しなかった細胞は、回収時にはフラスコ底面全面に細胞が付着しており、培養開始時と比して細胞密度が上昇した。ウイルス液1継代目を回収後の細胞残渣に、DB又はNDBを添加して試料を調製し、抗His-tag抗体によるウエスタンブロットを実施した。クローン番号018-#01~10番は、還元条件及び非還元条件のいずれにおいても、50 kDaと60 kDa付近に主たる2本のバンドを検出した。Envキメラタンパク質は、プロセスを受けて50 kDaを示すと考えられ、下のバンドがプロセス後のキメラタンパク質のバンドと考える。上のバンドはプロセス前、又は部分的プロセスを受けたキメラタンパク質と考えた。

3. ウイルス液2継代目の調製

ウイルス液2継代目の調製時の細胞形態の変化を示した。播種後25時間で総細胞密度及び生細胞密度は前日から倍化せず、増殖が鈍化した。細胞径も16.50 μm から18.84 μm に膨化した。顕微鏡により細胞の形態を観察したところ、播種後25時間でほぼすべての細胞でストローマ構造を観察した。以上の結果より、ウイルスが感染したことを確認した。播種後52時間において、増殖が停止した。細胞の形態も、ストローマ構造からフィブリラー構造へ変化を観察した。以上の結果を確認して、52時間でウイルス液2継代目(vP2)を回収した。

4. ウイルス液3継代目の調製

ウイルス液3継代目の調製時の細胞パラメータを示した。種後22時間で総細胞密度及び生細胞密度は前日から倍化せず、増殖が鈍化した。細胞径も16.72 μm から18.51 μm に膨化した。ウイルス液2継代目調製時と同様に、ほぼすべての細胞でストローマ構造を観察したことより、組換えバキュロウイルスが感染したことを確認した。播種後50時間において、増殖が完全に停止した。フィブ

リラー構造を持つ細胞が多くなったことより、感染が進行していることを確認した。播種後71時間において、死細胞が増えて生存率が低下し始めたことを確認して、ウイルス液3継代目を回収した。

5. 発現培養条件の検討

発現培養条件の検討時の細胞パラメータの変化を示した。播種後1日目で総細胞密度及び生細胞密度は前日から倍化せず、増殖が鈍化した。細胞径も16.16 μm から18.21 μm に膨化した。ほぼすべての細胞でストローマ構造を観察したことより、組換えバキュロウイルスが感染したことを確認した。播種後2日目において、増殖が完全に停止した。フィブリラー構造を持つ細胞が多くなったことより、感染が進行していることを確認した。播種後3日目で生存率が90%を下回り、感染が後期になったことを確認した。播種後4日目以降、顕微鏡観察で死細胞を多く見つけるようになり、播種後6日目ではほぼすべての細胞が死細胞とみられる。適切な試料の回収時期を決めるために、播種後1日目~6日目までの試料を培養上清と細胞画分(可溶画分及び不溶画分)に分けて回収し、ウエスタンブロット法によりEnvキメラタンパク質を検出した。細胞画分の可溶画分は、播種後1~3日目までは目的たん白質を検出した。播種後1日目はバンドが最も強く、2日目から3日目と経過するに従い、バンドは次第に薄くなり、播種後4日目以降は検出されなかった。一方、細胞画分の不溶画分は、播種後1日目よりバンドを検出し、2日目以降6日目まで強くバンドを検出した。培養上清の結果のコントラストを強調すると、2日目及び3日目で60 kDa付近にバンドを認めたことより、非常に少ない量の目的たん白質が培養上清中に分泌されていた。今回の結果を受けて、発現培養試料は播種後48時間、もしくは2日目で発現培養液を回収し、培養上清と細胞画分を分けて回収することとした。

6. Envキメラタンパク質の発現培養

Sf9 細胞及び無血清培地を用いて目的たん白質の発現培養をおこなった。ウイルス液は、発現培養条件の検討と同じロット番号の vP3 を使用した。発現培養液ロット番号：FU1301802S 及び FU1301803S のいずれにおいてもウイルス液播種後 24 時間で生細胞密度の増加が鈍化した。細胞径も 15.32 μm から 18.32 μm (FU1301802S)、15.78 μm ~18.23 μm (FU1301803S) へ膨化した。細胞の形態観察により、いずれの発現培養においてもすべての細胞にストローマ構造を認めたことより、組換えバキュロウイルスの感染が成立したと考えている。また、播種 48 時間では細胞増殖が完全に停止したことより、感染が継続していた。以上の結果より、FU1301802S 及び FU1301803S は発現培養条件の検討の結果の 2 dpi までの細胞パラメータの結果を再現したと判断した。

7. Env キメラタンパク質の発現解析

特異抗体を用いたウエスタンブロットより、試料中の Env キメラタンパク質の検出を試みた。原図のコントラストを強調したが、24 及び 48 hpi の培養上清のいずれにおいても 60 kDa 付近に主たるバンドは検出できなかった。次に試料を濃縮する目的で TCA 沈殿した試料を用いたウエスタンブロットでは、48 hpi の培養上清において 2 ロットともコントラストを強調せずに 60 kDa 付近の主たるバンドを確認した。一方、細胞画分では容易にバンドを検出した。可溶画分では 24 hpi から 48 hpi にかけて 60 kDa 付近の主たるバンドが薄くなった。代わって、不溶画分では 24 hpi から 48 hpi にかけて 60 kDa 付近の主たるバンドと HTLV-1 Env キメラタンパク質由来と考えるバンドが著しく増えた。以上の結果は発現培養条件の検討の結果を再現したものであり、狙い通りに試料を回収したことを確認した。

8. HTLV-1 タンパク質のコムギ無細胞タンパク合成系での合成

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製し

た HTLV-1 Gag, Tax-1, Env の deletion mutant タンパク質は、Brij 35 および ZnCl₂ 添加により可溶化タンパク質として合成が確認された。これらの全長タンパク質を活用し、血清中の微量抗体の測定を実施した。

9. アルファスクリーン法を用いた抗 HTLV-1 抗体の測定および抗体認識部位の同定

昨年度行なった全長タンパク質を用いたアッセイにおいて、抗体が検出された患者血清を Gag は 10 検体、Tax-1、Env は 7 検体ずつ選択した。抗原として 8. で作製した C 末端がビオチン標識された deletion mutant タンパク質を用い、上記のように選択した血清を用いて抗体のエピトープ解析を行なった。Gag に対するエピトープは、p19 もしくは p24 に対する抗体の産生がみられ、Tax に対するエピトープは、Tax-1 の N 末端側 (1-115) に対する抗体が産生されている傾向があった。

また、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける抗 HTLV-1 抗体の検出を試みた結果、7 匹中 2 匹の血清において Gag、Env および Tax に対する微量抗体が検出された。

10. HTLV-1 感染ヒト化マウス系を用いた Tax ペプチドワクチンの評価

骨髄移植 4 ヶ月時のヒト化マウスに皮下方法あるいは経鼻方法で各 2 回、12 種類の Tax ロングペプチド混合物を投与した後に経時的に感染ヒト T 細胞の動態を観察した。ワクチン非投与対照群では感染 2 ヶ月以内に末梢血中の HTLV-1 感染 T 細胞の数が一万倍近くまで増加し、白血病死したのに対し、ワクチンを皮下あるいは経鼻で投与した群では何れも 5 匹中 2 匹がウイルスロード数%から数十%に維持された持続感染の状態となった。また、ワクチン接種群での感染拡大は穏やかであり、ともに 5 匹中 3 匹がコントロールに遅れて死亡した。

ワクチン投与群で死亡した個体については、何れもコントロール群の 1/10~1/100 量のより少ない感染細胞数の状態で死亡しており、その原因を

探る目的で、各個体の末梢血における各種サイトカインの発現を測定した。その結果、感染細胞の数に関係なく、死亡する直前の感染マウスにおいては IL-6 の発現が上昇していた。

ワクチン接種後の末梢血における IL-12 発現量を測定したところ、その発現増大が確認され、Th1 の誘導を介した細胞性免疫の活性化が示唆された。さらに、HLA 拘束性 Tax tetramer を用いて CD8 細胞中の Tax 特異的 CTL の発現を解析したところ、ワクチン接種により発現の増加を認めた。以上の結果より、Tax ペプチドワクチンの接種によって Tax 特異的 CTL が誘導された結果、ヒト化マウス個体内での感染細胞の増殖が抑制された可能性が強く示された。

実際、末梢血中における感染細胞と CD8 T 細胞の比率を見ると、持続感染状態を維持している個体においては CD8T 細胞数が感染細胞数を上回るのに対し、CD8T 細胞数が感染細胞数を下回ったマウスは全て白血病死する結果となった。また、各リンパ系組織でのプロウイルスロードを調べたところ、ワクチン接種群においては末梢血と比較してウイルスロードが著しく低下しており、リンパ系組織における抗 HTLV-1 Tax CTL の機能が強く示唆された。

11. Tax/ β 5t-Tg マウスの作製

6 ヶ月齢の Tax/ β 5t-Tg では末梢血に核のくびれの目立つ異型リンパ球を少数観察したが、明らかな ATL の発症は認めなかった。引き続き、観察期間を延長し、表現型の解析を行う。

D. 考察

本研究では、主要な中和抗体誘導抗原として考えられている HTLV-1 のエンベロープである Env タンパク質の細胞外ドメインに三量体化シグナルを誘導し感染性ウイルスのエンベロープと同様の構造、抗原性を持つ Env キメラタンパク質をバキュロウイルス発現ベクターシステムにより製造することを目的とした。Env キメラタンパク質を、

ポリヘドリン遺伝子と相同組換えした組換えバキュロウイルスを作製し、特異抗体によるスクリーニングで Env キメラタンパク質を発現するクローンを得た。ウエスタンブロットにより 60 kDa 及び 50 kDa 付近に主たる 2 本のバンドとして検出された。当初計画では、培養上清への分泌を期待したが、発現培養条件の検討の結果、細胞画分の不溶画分に多く回収された。時間経過とともに不溶画分には 60 kDa 付近のバンドだけでなく、高分子から低分子まで複数のバンドが検出されることになった。これらのバンドは、Env キメラタンパク質由来と考えられる。60 kDa よりもサイズの小さいバンドは分解物と考えられ、サイズの大きなバンドは細胞内で強固な凝集体を形成し、SDS により可溶化できなかったものと考えている。播種後 48 時間の培養上清には、非常に弱いバンドであるが、目的タンパク質を検出したことより、目的タンパク質の一部は培養上清に分泌されていたと考えられた。今後、大量培養を行い、培養上清から目的タンパク質の精製を試みるが、発現効率自体の改善のために中和エпитープが集まる SU 以外を削っていくなど抗原設計の変更を考慮する必要があると考えられた。

HTLV-1 感染患者および ATL 発症患者血清中に存在する抗 HTLV-1 抗体のエピトープに違いがあることが予想された。今後は本アッセイの結果と臨床背景との関連を検討し、症例数を増やしてデータを集積することで、患者抗体レパートリーによる ATL の発症予測に結びつく可能性がある。

HTLV-1 感染ヒト化マウスの系において、Tax ペプチドワクチンの皮下および経鼻投与で、いずれも感染細胞の増殖抑制効果が認められた。今後、この抑制が感染の抑制によるものか、あるいは感染細胞の増殖抑制によるものかを明らかにすることが必要である。

死亡する直前の感染マウスでは、感染細胞の数に関係なく IL-6 の発現が上昇していることから、マクロファージや樹状細胞の過剰な活性化が想定され、今後、アジュバントの選定を含め、ワクチ

ンの投与方法を検討する上で重要な指標となると考えられた。

また、生存マウスに関しては、プロウイルスロードが数%に維持され、感染キャリアの状態を再現していることから、ATL 発症予防法の開発を考える上で、ワクチンの追加投与あるいは抗 HTLV-1 薬の投与効果に興味を持たれる。さらに、ペプチドワクチンの鼻腔投与でも皮下と同等の効果が確認されたことから、ウイルスエンベロープ蛋白等、感染予防ワクチンの標的候補探索への応用が期待される。

ATL は数十年の長い潜伏期間の後に発症するが、加齢による免疫応答の減弱がウイルス感染細胞の増加の原因となり、ATL の発症につながる可能性が指摘されている。また、発症予防ワクチンの接種対象者には、成年期以降のキャリアが多く含まれるが、小児と成人や老年者ではワクチン効果に相違が見られることがしばしば遭遇され、HTLV-1 関連疾患のワクチン制御には免疫応答の年齢による変化とワクチン誘導に対して有効なウイルス抗原の網羅的解析が必要となる。作製した Tax/ β 5t-Tg マウスは、6 ヶ月の観察で明らかな ATL の発症は認めなかったが、引き続き、観察期間を延長し、表現型の解析を行う。また、プロテアソーム遺伝子改変マウスへの ATL 細胞株の移入実験を推進し、有用なモデル動物の開発を目指す計画である。

E. 結論

HTLV-1 感染予防ワクチンの開発のために最も有力な感染防御抗原候補である Env タンパク質抗原を実用的なワクチン抗原製造系として実績のある昆虫細胞タンパク質合成系を用いて Env タンパク質合成系の構築を試みた。目的のタンパク質合成に成功したが、その収量は多くなく、今後さらなる改良が必要と考えられた。

これまでに開発したコムギ無細胞系とアルファスクリーン法を組み合わせた抗体検出系を用い、HTLV-1 Gag, Tax-1, Env に関して抗体が検出され

た患者血清に含まれる抗 HTLV-1 抗体の認識部位を同定した。また、モデル動物において誘導された微量抗 HTLV-1 抗体の検出にも成功した。今後は本法を用いて、HTLV-1 感染に伴う抗体誘導の詳細な解析を行う予定である。HTLV-1 感染ヒト化マウスの系で、Tax ペプチドワクチンの皮下および経鼻投与により感染細胞の増殖抑制効果が認められ、ヒト免疫系を基盤とした HTLV-1 発症予防ワクチン開発での有用な評価系を提供出来るマウスモデルであることが示された。

更に HTLV-1 関連疾患の免疫病態、発症予防ワクチンの解析に有用なマウスモデルの作製を目指し、引き続き Tax/ β 5t-Tg マウスの解析、新たなモデルの作製を推進する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) El Hajj H, Khalil B, Ghandour B, Nasr R, Shahine S, Ghantous A, Abdel-Samad R, Sinjab A, Hasegawa H, Jabbour M, Hall WW, Zaatari G, Dbaibo G, Pisano C, Bazarbachi A, Darwiche N. Preclinical efficacy of the synthetic retinoid ST1926 for treating adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2014 Sep 25;124(13):2072-80.
- 2) Hasegawa H, van Reit E, Kida H. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:371-80.
- 3) Terahara K, Ishii H, Nomura T, Takahashi N, Takeda A, Shiino T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano, T. Vaccine-induced CD107a⁺ CD4⁺ T cells are resistant to depletion following AIDS virus infection. *J Virol* 88:14232-14240, 2014.
- 4) Zhang LF, Tan DQ, Jeyasekharan AD, Hsieh

- WS, Ho AS, Ichiyama K, Ye M, Pang B, Ohba K, Liu X, de Mel S, Cuong BK, Chng WJ, Ryo A, Suzuki Y, Yeoh KG, Toan NL, Yamamoto N. Combination of vaccine-strain measles and mumps virus synergistically kills a wide range of human hematological cancer cells: Special focus on acute myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 2014, 354(2):272-80.
- 5) Furukawa A, Sugase K, Morishita R, Nagata T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Katahira M. Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014, 53(9):2349-52.
- 6) Matsunaga S, Kawakami S, Matsuo I, Okayama A, Tsukagoshi H, Kudoh A, Matsushima Y, Shimizu H, Okabe N, Hirano H, Yamamoto N, Kimura H, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3 for generation and characterization of monoclonal antibody. *Front Microbiol.* 2014, 5:208.
- 7) Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, Yamagishi M, Mukaida N. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol.* 2014, 44(4):1005-15.
- 8) Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin Exp Rheumatol.* 32(1):149-150, 2014
- 9) Sato T, Yamano Y, Tomaru U, Shimizu Y, Ando H, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Mod Rheumatol.* 24(1):129-36, 2014
- 10) Ströbel P, Hartmann E, Rosenwald A, Kalla J, Ott G, Friedel G, Schalke B, Kasahara M, Tomaru U, Marx A. Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology.* 64(4):557-66, 2014
- 11) Matsui Y, Tomaru U, Miyoshi A, Ito T, Fukaya S, Miyoshi H, Atsumi T, Ishizu A. Overexpression of TNF- α converting enzyme promotes adipose tissue inflammation and fibrosis induced by high fat diet. *Exp Mol Pathol.* 2014, 97(3):354-8.
- 12) Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Enhanced Formation and Disordered Regulation of NETs in Myeloperoxidase-ANCA-Associated Microscopic Polyangiitis. *J Am Soc Nephrol.* 2014, 25(5):990-7.
- 13) Ando R, Noda K, Tomaru U, Kamoshita M, Ozawa Y, Notomi S, Hisatomi T, Noda M, Kanda A, Ishibashi T, Kasahara M, Ishida S. Decreased proteasomal activity causes photoreceptor degeneration in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 3:55(7):4682-90.
- 14) Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A,

- Jacobson S, Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*. 2014 124(8):3431-42.
- 15) Iinuma C, Waki M, Kawakami A, Yamaguchi M, Tomaru U, Sasaki N, Masuda S, Matsui Y, Iwasaki S, Baba T, Kasahara M, Yoshiki T, Paletta D, Herrmann T, Ishizu A. Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis. *Int Immunol*. 2014, 27(2):105-14.
- 16) Tomaru U, Tsuji T, Kiuchi S, Ishizu A, Suzuki A, Otsuka N, Ito T, Ikeda H, Fukasawa Y, Kasahara M. Decreased expression of a thymus-specific proteasome subunit b5t in Down syndrome patients. *Histopathology*. 2015, in press.
- 17) Tsuchisaka A, Kaneko S, Imaoka K, Ota M, Kishimoto K, Tomaru U, Kasahara M, Ohata C, Furumura M, Takamori S, Morita E, Hashimoto T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in thymoma associated with a pemphigus foliaceus patient. *Br J Dermatology* 2015, in press.
- 18) Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S, Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, Dosaka-Akita H. Expression of Fucosyltransferase 8 Is Associated with an Unfavorable Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancers. *Oncology*. 2015, in press.
- 19) Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N, Fujisawa J. An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. *Blood*. 123(3): 346-55. 2014.
2. 学会発表
- 1) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：抗 HIV 薬投与下の治療ワクチン接種により誘導される CD8 陽性 T 細胞の HIV 複製抑制能の解析. 第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月
- 2) 木内静香、外丸詩野、紺野沙織、石津明洋、宮島祥太、平川彩香、笠原正典：胸腺におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの発現と T 細胞選択 第 103 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月
- 3) 伊藤智樹、外丸詩野、大村優、石津明洋、笠原正典：プロテアソーム機能異常と脳機能の低下 第 103 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月
- 4) 竹中淳規、大塚紀幸、藤田裕美、中馬誠、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：高齢男性でみられた EBV 陽性肝脾 $\gamma \delta$ T 細胞リンパ腫の一例 第 103 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月
- 5) 三次有奈、山田真衣、館山ゆう、楠由宏、志田玄貴、中沢大悟、外丸詩野、三好秀明、渥美達也、石津明洋：高血糖による好中球細胞トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) の形成亢進 第 47 回北海道病理談話会(病理分科会)、旭川、2014 年 10 月
- 6) 志田玄貴、中沢大悟、館山ゆう、山田真衣、楠由宏、三次有奈、外丸詩野、渥美達也、石津明洋：抗ラクトフェリン抗体の病原性 第 47 回北海道病理談話会(病理分科会)、旭川、2014 年 10 月
- 7) 伊藤智樹、外丸詩野、大村優、戸松留花、石津明洋、笠原正典：プロテアソーム機能低下モデルマウスにおける脳機能障害の解析 第 47 回北海道病理談話会(病理分科会)、旭川、2014 年 10 月

- 8) Shizuka Kiuchi, Utano Tomaru, Saori Konno, Shota Miyajima, Akihiro Ishizu, Masanori Kasahara : Aberrant expression of proteasomal $\beta 5$ subunit affects T cell repertoires in the thymus. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2014 年 12 月
- 9) 竹之内徳博、上野孝治、手塚健太、田中正和、藤澤順一：樹状細胞を介した HTLV-1 感染モデルの構築 第 55 回日本神経学会学術大会、福岡、2014 年 5 月
- 10) 田中正和、李成一、荀潤澤、姚錦春、藤澤順一：ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染防御ワクチンの開発 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014 年 8 月
- 11) 竹之内徳博、上野孝治、荀潤澤、田中正和、藤澤順一：樹状細胞を介した HTLV-1 感染モデルの構築と薬剤スクリーニングへの応用 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会、金沢、2014 年 9 月
- 12) 田中正和、李成一、荀潤澤、姚錦春、藤澤順一：ヒト化マウスモデルに Tax ロングペプチドワクチン投与を行うことで HTLV-1 感染細胞の増殖を抑えることが出来た 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月
- 13) 藤澤順一、田中正和、上野孝治、荀潤澤、姚錦春、李成一：ATL のマウスモデル 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月
- 14) 田中正和、李成一、荀潤澤、姚錦春、藤澤順一：Tax ロングペプチドワクチンのヒト化マウス鼻腔投与による HTLV-1 感染抑制 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 (出願)

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 委託業務成果報告(業務項目)

HTLV-1 感染阻止の為の粘膜免疫誘導に関わる研究開発

—ワクチン抗原のデザインと作製—

担当責任者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長
研究協力者 鈴木 忠樹 国立感染症研究所感染病理部 室長

研究要旨 HTLV-1 感染症のコントロールのために、HTLV-1 感染予防ワクチンの開発が求められている。そこで、本研究では最も有力な感染防御抗原候補である Env タンパク質を抗原とした不活化ワクチン開発を目指し、実用的なワクチン抗原製造系として実績のある昆虫細胞タンパク質合成系を用いて Env タンパク質合成系の構築を試みた。

A. 研究目的

HTLV-1 キャリアに対する発症予防ならびに授乳による感染リスクを低減させる手段として、ワクチン接種が考えられている。現在までに実用化されたレトロウイルス感染症予防ワクチンは存在しないが、HTLV-1 の感染はウイルス表面の糖タンパク質である Env タンパク質に対する抗体により中和されることが知られていることから、Env タンパク質を主要抗原とする不活化ワクチンが感染予防ワクチンとして有望であると考えられる。一般的なウイルス感染症の不活化ワクチンは、感染性ウイルス粒子をホルマリンなどで不活化することにより作成するが、HTLV-1 は、*In vitro*において、ウイルス粒子の産生が悪く従来のウイルス不活化ワクチンの製造方法では、HTLV-1 ワクチンを製造することは極めて難しい。そこで、感染防御抗原である Env タンパク質を何らかの方法で発現および精製したリコンビナントワクチンを開発する必要がある。我々は、これまでコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した HTLV-1 Env 全長タンパク質を用いたリコンビナントワクチンの開

発を進めたが、同抗原はマウスを用いた動物実験において免疫原性が低く、十分な免疫を誘導するのに多量の抗原を必要とすることから、製造コストなどを考慮すると実用化は非常に難しいと考えられた。また、哺乳類培養細胞系を用いて、細胞外ドメインに三量体化シグナルを融合した抗原タンパク質の発現系の構築を試みたが、発現レベルが低くワクチン実験の実施は困難であった。そこで、本研究では、実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、ワクチン抗原製造系として実績のある昆虫細胞タンパク質合成系のシステムを用いて HTLV-1 Env 抗原の合成を試みた。

B. 研究方法

1. 組換えバキュロウイルスの作製

本研究では、精製工程を簡略化しつつ感染性ウイルスの Env と同一の構造を呈したリコンビナント抗原を得るために HTLV-1 の Env の細胞外ドメインに、Fibritin trimerizing sequence 及びヒスチジンタグを融合した Env キメラ遺伝子を用いて組換えバキュロウイルスを作製した。まず、

HTLV1Env キメラ遺伝子を組み込んだトランスフォーマクターpVL1392-Env を作製した。その後、組換え体由来のプラーク単離を行った。

2. 組換えバキュロウイルスの増幅とスクリーニング

(1) ウイルス液の1継代目の調製

Sf9 細胞の生細胞密度が 1.7×10^6 cells/mL、生存率が 90%であることを確認し、ウイルス液添加1時間前に 25 cm² ベントキャップ付きフラスコに 0.2×10^6 cells/mL で 5 mL の Sf9 細胞を播種し、20 分間以上ベンチで静置した。その後、約 1 mL のプラーク純化アッセイで調製したウイルス液を添加し、28°C で 5 日間インキュベートした。インキュベートした培養液を 1,000 rpm で 10 分間遠心し、上清をウイルス液1継代目 (vP1) とした。

(2) リコンビナントタンパク質発現の確認

培養上清回収後のチューブに残った細胞沈殿物を 0.5 mL の PBS に再懸濁し、懸濁液に等量の 2×DB 又は 2×NDB を混和し、95°C で 5 分間加熱し試料とした。試料は SDS-PAGE および Western Blotting にて発現確認を行った。

(3) ウイルス液の2継代目の調製

ウイルス液播種前日に 1.0×10^6 cells/mL として 250 mL スピナーフラスコ (培養液量 100 mL) に細胞を調製した。培地は PSFM 培地とした。生細胞密度が 1.73×10^6 cells/mL 及び生存率が 97.0%であることを確認し、1.0 mL のクローン番号 018-#12 の vP1 ウイルス液を添加した。28°C で 48 時間インキュベートした。回転数は 100 rpm とした。播種後 0 日から回収日まで培養液をサンプリングし、生死細胞数計測装置にて細胞パラメータを計測した。インキュベート後、培養上清を 50 mL コニカルチューブに移し、1,000 xg (～1,500 rpm) で 5 分間遠心し、上清をウイルス液2継代目 (vP2)、ロット番号: YVHT032114 とした。遮光で 4°C 保管した。

(4) ウイルス液の3継代目の調製

ウイルス液播種前日に $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/mL

として 3L スピナーフラスコ (培養液量 500 mL) に細胞を調製した。培地は PSFM 培地とした。生細胞密度が 1.77×10^6 cells/mL 及び生存率が 96.5%であることを確認し、1.5 mL の vP2 を添加した。28°C で 72 時間インキュベートした。回転数は 100 rpm とした。播種後 0 日から回収日まで培養液をサンプリングし、生死細胞数計測装置にて細胞パラメータを計測した。インキュベート後、培養上清を無菌の 500 mL 遠心チューブに移し、6,000 xg (～4,500 rpm), 4°C で 15 分間遠心した。上清を無菌のプラスチックボトルに回収する。これをウイルス液3継代目 (vP3)、ロット番号: YVHT032414 とした。遮光で 4°C 保管した。

3. 発現培養

(1) 発現培養条件の検討

前日に 1.0×10^6 cells/mL として 250 mL スピナーフラスコ (培養液量 100 mL) に細胞を調製した。培地は PSFM 培地とした。生細胞密度が 1.88×10^6 cells/mL 及び生存率が 97.3%であることを確認し、2 mL (培養液 100 mL の 2%容量) の vP3 (ロット番号: YVHT032414) を添加した。28°C で 6 日間インキュベートした。回転数は 100 rpm とした。播種後 0 日から回収日まで培養液をサンプリングし、生死細胞数計測装置にて細胞パラメータを計測した。また、サンプリング試料のうち 500 μL は、5,000 rpm で 10 分間遠心し、培養上清 (medium) と細胞画分に分けて回収して -80°C ですべての試料がサンプリングできるまで保管した。凍結した細胞画分を 100 μL の 0.5%トリトン X-100/PBS で再懸濁し、氷上で 15 分間静置した後、10,000 rpm で 15 分間遠心し、上清 (可溶画分、supernatant) と沈殿 (不溶画分、pellet) に分けて回収した。不溶画分は、回収した可溶画分と同量の 0.5%トリトン X-100/PBS に再々懸濁した。培養上清、可溶画分及び不溶画分に 5×DB 又は 5×NDB を混和し、95°C で 5 分間加熱し試料として SDS-PAGE および Western Blotting に供した。

(2) 1 L スケールの発現培養