

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和2年5月25日

採択番号	2019-共同-4		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	高免疫応答型多価ウイルス様粒子を用いた原虫感染症治療用ワクチン 開発基盤技術の構築		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ぼく よんす 朴 龍洙	静岡大学・グリーン科学技術研究所教授	
研究分担者	じょ けん 徐 剣	静岡大学・グリーン科学技術研究所学術研究員 (<i>N. caninum</i> の抗原提示 VLP の作製)	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2019年5月9日 ～ 2020年3月31日		
目的・趣旨	<p>ウイルス様粒子(virus-like particle, VLP)は、近年有望なワクチン素材として期待されている。本申請者は、これまで、カイコを用いてウイルスと同様の構造を持つ VLP の作製に成功した(Deo et al., J. Biotechnol., 165, 69–75, 2013; Tsuji et al., J. Biotechnol., 155, 185–192, 2011)。既に原虫による感染症のモデルとして、ネオスポラ原虫を研究対象にして3種類の抗原を同定し(Otsuki et al., Vet. Parasitol., 192: 284–287, 2013)、バキュロウイルスへの提示に成功した(Kato et al., Mol. Biotechnol., 57, 145–154, 2015)。本研究では、ウシネオスポラ症をターゲットとして、多価 VLP ワクチンを作製し、感染症防御試験により実証する。最終的には、鶏卵を用いるワクチン製造法では不可能であった高免疫応答型 VLP ワクチンをカイコで大量かつ安価に製造する基盤を世界に先駆けて確立することを目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>1.VLP の作製(静岡大学):VLP の骨格として、<i>Canine parvovirus</i> の構造タンパク質 Viral Protein 2 (VP2)を用いた。VP2 は、カイコで発現し、精製すると直径 20–25 nm の VLP を形成する(透過型電子顕微鏡による検証済)。VLP 上への抗原提示には <i>Streptococcus pyogenes</i> が持つフィブロネクチン結合タンパク質から発見された SpyTag (ST) /SpyCatcher (SC) 共有結合システムを利用した(Xu et al., Int. J. Mol. Sci., 20, e4228, 2019)。本研究では、分泌タンパク質 Profilin (PROF)(Suhaimi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 522, 8–13, 2020) 及び、<i>Neospora caninum</i> の近縁種である <i>Toxoplasma gondii</i> の同ファミリーに属する <i>N. caninum</i> 由来の Toxofilin (TOXO)を VLP の表面に提示する抗原の候補とし、ST/SC 共有結合システムが高免疫応答型 VLP ワクチンとしての可能性を検証した。</p>		

	<p>2.マウスで感染阻害試験におけるネオスポラ症に対するワクチンとしての評価(原虫病研究センター西川教授との共同研究): 動物実験は、対照群(PBSと提示無しのVLP)とワクチン接種群を分けて、6週齢のBALB/cマウスで行った。腹腔内にワクチン約100 µgを接種し、2週目の計2回接種した。体液性免疫の誘導について、3週目にそれぞれの試験群から採血した。4週目に<i>N. caninum</i>原虫による攻撃実験を行い、9週目に採血(特異抗体の生産)、脳の摘出(Real-time PCR法より原虫の増幅)、並びに臨床観察(体重や生存率)を行い、ワクチンとしての効果をそれぞれ検証し、原虫の侵入を効果的に防御できるかどうかを定量化した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>カイコで作製したVLPは、透過型電子顕微鏡及び動的光散乱による解析の結果、ST-VP2は自己集合により直径20–45 nmの円形のVLPを形成した。免疫電研の解析ではVLP表面の一部でSTの提示が確認できた。PROFとTOXOは、ST-VP2との共有結合により、分子量のシフトが確認され、VLP表面への提示を示唆した。</p> <p>動物試験において、抗原を注射後3週目に回収したマウス血清からそれぞれの抗原に対する特異的抗体反応が確認され、抗原に対する免疫は誘導された。</p> <p><i>N. caninum</i>原虫による攻撃実験の結果、マウスの生存率は、対照群では100%に対し、PROF群では67%、TOXO群では83%であった。抗原提示しなかったVLP群の場合、67%が死亡した。原虫攻撃試験後の臨床観察結果、対照群に比べワクチン接種群では、明らかに体重減少や臨床症状の悪化が見られた。</p> <p>マウス脳内原虫量をRT-PCRで調べたところ、対照群とワクチン接種群とで脳内原虫量に有意差が見られなかった。</p> <p>以上のことから、ST/SC共有結合システムによるPROFとTOXOの提示VLPは、免疫誘導は可能であり、ある程度ネオスポラ症に対する防御効果が見られたものの、対処群との差がなく、更なる検証が必要である。今後、ネオスポラ感受性マウスの使用や接種サンプルを再度調整し、動物実験の見直しを検討する必要がある。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>関口智史、徐剣、西川義文、Abdou Ahmed、朴龍洙、<i>Neospora caninum</i>由来のToxofilinタンパク質のワクチン効能に関する研究、第88回日本寄生虫学会大会(2P-23)、2020年5月30–31日、帯広畜産大学原虫病研究センター。</p>