SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

# カイコから4種血清型デングウイルスに対応した4価ウイルス様粒子ワクチンの開発



| メタデータ | 言語: ja<br>出版者: 静岡大学<br>公開日: 2020-04-13<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 朴, 龍洙<br>メールアドレス:<br>所属: |
|---|---|
| URL | http://hdl.handle.net/10297/00027358 |

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：１３８０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１４９００

研究課題名（和文）カイコから４種血清型デングウイルスに対応した４価ウイルス様粒子ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of tetravalent virus-like particle vaccine corresponding to four serotype dengue virus from silkworm

研究代表者
朴　龍洙（PARK, Enoch Y.）

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：９０２３８２４６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：主に熱帯・亜熱帯地域を中心に年間約１億人がデング熱を発症する。2014年9月、東京代々木公園でもデングウイルス（DENV）が検出され、地球温暖化によるDENV北上の脅威が窺えるが、現在実用化されているワクチンはない。本研究では、カイコバクミド技術を用い、デングウイルスの血清型2と3のウイルス様粒子を発現・精製を行った。得られた粒子は、20～35nmの大きさでヘパリンとの結合が認められた。さらにデング熱患者の血清型1～4の混合血清との結合試験を行った結果、カイコから発現したデングウイルス様粒子はデング熱患者の血清と結合した。この結果は、カイコを宿主として、DENVワクチン作製の可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義
デングウイルスの分離から70年以上経過しているが、異なる血清型による合併症が危惧されるため、従来の手法ではデングウイルスワクチンの開発は困難であった。その一つの解決策として4血清型に対応したワクチン開発が求められている。本研究では、カイコを宿主として血清型2と3のデングウイルス様粒子の作製に成功し、ヘパリンやデング患者の血清と結合能を解析した。この結果からカイコの優れたタンパク質合成能力を活用すれば4血清型を持つウイルス様粒子の発現が可能であり、カイコは新興ウイルスや高病原性ウイルス等による感染症に対するワクチン開発に必要なツールとして、また医療用ワクチンの生産用宿主となる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：About 100 million people develop dengue fever annually, mainly in tropical and subtropical areas. In September 2014, dengue virus (DENV) was also detected in Tokyo Yoyogi Park, and moving up of DENV due to global warming is a growing threat, but there is no practical vaccine for treatment of DENV infection. In the present study, DENV serotypes 2 and 3 virus-like particles (VLPs) were expressed and purified in the silkworm expression system using bacmid technology. The obtained DENV serotypes 2 and 3 VLPs were at a size of 20 and 35 nm, respectively, and had binding ability to heparin. Furthermore, DENV serotypes 2 and 3 VLPs expressed in silkworms were also bound to mixed sera of serotypes 1-4 of dengue fever patients. This result suggests the possibility of producing DENV vaccine using silkworm as a host.

研究分野：生物工学

キーワード：デング熱　ウイルス様粒子　カイコ　バクミド　ウイルス

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

主に熱帯・亜熱帯地域を中心に全世界で年間約１億人がデング熱やデング出血熱を発症する。我が国でも 2014 年 9 月 4 日に、東京代々木公園で採取された蚊からデングウイルス（DENV）が検出され、国内感染が報告された。これは 1950 年代の発生以後初めてであり、地球温暖化による DENV 北上の脅威が窺える。DENV には 4 種の血清型（1 型から 4 型）が存在する。各血清型は、異なる血清型に対し感染防御能を示すが、その防御能は低く、数ヶ月で消滅する。また、２度目の感染で重度の合併症が起こる確率が高くなるという特徴がある（抗体依存性感染増強現象）。現在、４種の血清型に対して十分な防御免疫を誘導するため、DENV1 型～DENV4 型それぞれに効果を示す単価ワクチンを作製し、それらを混合したワクチンを作製する試みが行われているが実用化に至っていない。現時点において、全血清型に対する優れた防御能を示す４価ワクチンはおろか、１価混合ワクチンすら実用化されていないため、４価ワクチンの開発は学術的、社会的にも極めてインパクトは大きい。

２．研究の目的

ウイルス様粒子（VLP）はウイルス本来の構造をとっているため抗原性を持ち、しかし遺伝物質を持たないため、感染性がない。本研究では、高い免疫獲得効果が期待される VLP をカイコで効率的に発現・精製する。これらの VLP の更なる高機能化を目指し、VLP の表面に DENV1～4 血清型の抗原を提示した４価 VLP ワクチン作製基盤構築を最終目的とした。

本研究では、独自に開発してきた先駆的バクミド技術を基盤とし、4 血清型に対するそれぞれのデングウイルス様粒子（DENV -LP）を開発し、抗ウイルス活性を確認する。これが成功したら、VLP の表面上に４種の抗原を提示させた４価 DENV-LP の作製に挑戦する。

３．研究の方法

(1) カイコを用いた DENV-LP の作製と発現：デング熱の被害が大きい DENV 血清型 2（DENV2）と血清型 3（DENV3）を中心に発現系を構築した。DENV-LP 形成に必要な Capsid（C）、PrM 及び E タンパク質を発現するために、DENV の RNA から逆転写反応で DNA を得た。DENV2 と DENV3 の C,PrM 及び E の配列を PCR で増幅し、ポリヘドロンプロモーター下流に分泌用 Bx シグナル配列、精製用タグである PA 或いは FLAG を連結し、pFastbac1 に挿入した。pFastbac1 を大腸菌 DH10Bac に形質転換し、組換え BmNPV バクミドを作製した。得られたバクミドは BmNPV/2CPrME、BmNPV/2E と BmNPV/3CPrME、/3PrME と命名した。組換え Bacmid を 5 鈴カイコに注射し、注射後のカイコ或いは蛹は 26℃、湿度 60%の飼育チャンバー内でシルクメイト 2S（Nosan Corporation、横浜 日本）を飼料として与えて飼育した。4～7 日飼育後、カイコから体液と脂肪体を回収し、タグ或いは DENV2 や DENV3 の抗 E 抗体を用いて発現確認を行った。

(2) カイコ体液からの DENV-LP 精製及び機能解析：回収した体液を 100 倍希釈した。なお、蛹の場合はバクミド注射 4 日後に回収してソニケーションをした。破砕後に遠心分離（15,000×g, 10 min）し、そのペレットを再びソニケーションした後に同じ条件で遠心分離を行い、上清を回収した。FLAG タグを融合した場合 DDDDK-tagged Protein PURIFICATION GEL（MBL, 3329, Nagoya, Japan）を、PA タグを融合した場合抗 PA 抗体アフィニティカラムを用いて精製した。精製済の DENV2 と DENV3 の CPrME はそれぞれの抗 E 抗体を用いてウエスタンブロットで確認した。

DENV はヘパリンと結合するためヘパリンとの結合能を ELISA で確認した。アビジンがコーティングされたプレートにビオチンが結合したヘパリン（Thermo fisher, Waltham, USA）をウェルごとに 6 ng/mL になるように固定化した。0.05% Tween 80 リン酸緩衝液で希釈した精製サンプルを、100 µL ずつプレートに加え室温で 1 時間静置した。その後リン酸緩衝液で 3 回洗浄し、発色基質 TMB（ナカライテスク）を反応させ、5 分後 10% $H_2SO_4$ 100 µL 加えて反応を停止させた。ウェルプレートはマイクロプレートリーダー（モデル 680, Bio-Rad, Hercules, USA）で 450 nm の吸光度を測定した。

(3) DENV-LP の形状解析：VLP の形状は透過型電子顕微鏡（JEM-1400, JEOL, Tokyo, Japan）を用いて観察した。精製した DENV-LP をカーボングリッドの上に乗せ乾燥した後、牛血清アルブミンでブロックした。陰性染色は、2% phosphotungstic acid を用いた。DENV-LP/2E と DENV-LP/3CPrME を対象に VLP の形状を調べた。

(4) DENV-LP とデング熱患者由来血清との結合能の解析：デング熱患者から採取した血清と DENV-LP/3CPrME と DENV-LP/3PrME との結合実験を行った。用いた血清は、DENV1～4 の混合血清であり、インドネシア大学に保存されたものを用いた。陰性血清としてマウスの血清を用い、サンドイッチ ELISA と直接 ELISA を行った。

４．研究成果

(1) カイコでの DENV-LP/2CPrME 及び DENV-LP/3CPrME の作製と発現： DENV2 の CPrME はカイコの脂肪体（図 1A）と蛹（図 1B）で発現が確認出来た（分子量 55～60 kDa）。

DENV3 の CPrME と PrME の場合、DENV2 と同様脂肪体でそれぞれ分子量 85.9 kDa と 74.7 kDa 付近にバンドが確認出来た（図 2)。発現した DENV-LP/2PrME と DENV/3PrME の交差反応を調べたところ、DENV2 は抗 3 型 E 抗体とは反応せず、DENV3 は抗 2 型 E 抗体とは反応しなかった。

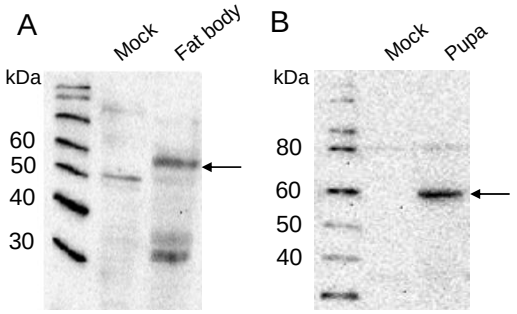



図 1. カイコ (A) と蛹 (B) で発現した DENV2 の CPrME のウエスタンブロット。抗 DENV2 –E 抗体を用いた。矢印は目的タンパク質を

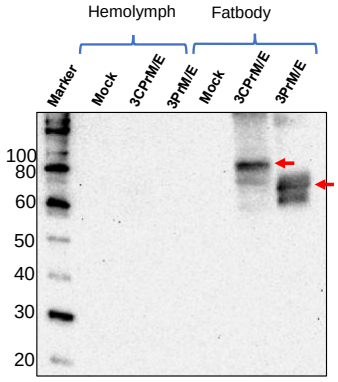



図 2. カイコで発現した DENV3 の CPrME と PrME のウエスタンブロット。抗 PA タグを用いて検出した。矢印は目的タンパク質を示す。

(2) カイコ体液からの DENV-LP 精製及び機能解析：DENV2 の粗精製結果、カイコ体液 1 mL から E タンパク質が 46 μg、CprME タンパク質が 15 μg であった。脂肪体から精製した場合、カイコ脂肪体 1 g から E タンパク質が 220 μg、CprME タンパク質が 300 μg であった。DENV3 の場合、脂肪体 1 g からそれぞれ CPrME、177.4 μg と PrME、187.2 μg を得た。ELISA のウェルに精製サンプル 0～20 μg/ml 入れヘパリン結合実験を行った結果、CPrME や PrME の濃度の変化に伴い、結合が強くなっていることが確認出来た。

DENV2 の E タンパク質の場合、4 μg で最大の結合（図 3A）が、DENV3 の場合 CPrME や PrME 両方とも濃度依存的に結合が増加した（図 3B)。これで DENV2 でも DENV3 でもヘパリンとの結合能が確認され、タンパク質として機能することが証明された。

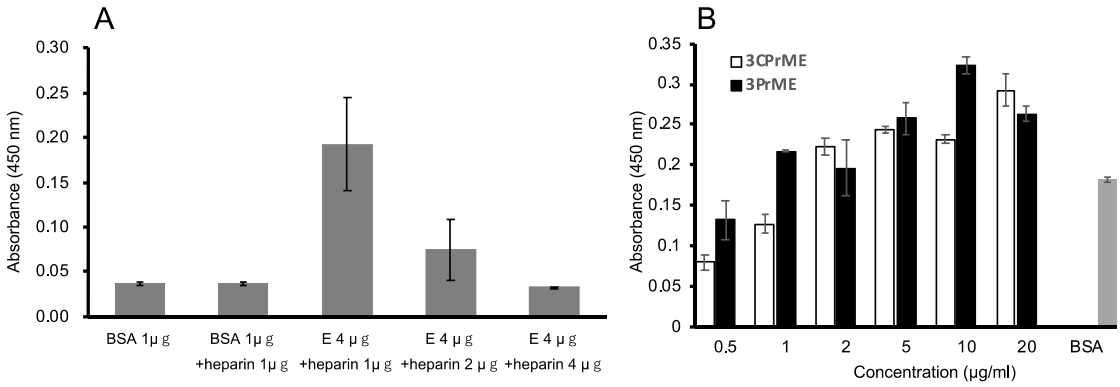



図 3. DENV2 の E タンパク質、DENV3 の CPrME や PrME とのヘパリンの結合

(3) DENV-LP の形状解析：DENV-LP/2E の VLP は約 20 nm の大きさ（図 4A）であったが、DENV3 の CPrME （DENV-VLP/3CPrME）は、35 nm 程度の大きさ（図 4B）であった。両方とも脂質 2 重膜のエンベロープで形成された VLP であることが認められた。

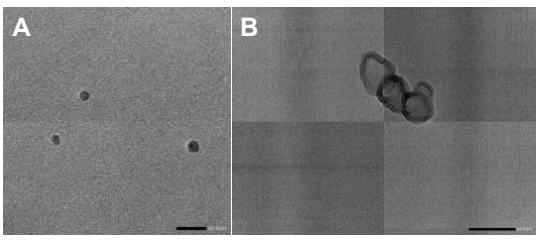



図 4. DENV-LP/2E（A）と DENV-VLP/3CPrME（B）の透過型電子顕微鏡イメージ。

(4) DENV-LP とデング熱患者由来血清との結合能の解析：4 血清型が混ざったデング熱患者からの混合血清と本研究で作製した DENV-LP/3CPrME と DENV-LP/3PrME との結合能を確認した。ELISA 法よりサンドイッチ ELISA の結果が低いバックグラウンドを示し、陰性より 2 倍近く高い値を得た（図 5)。陰性として用いたマウス血清との結合能は殆ど見られ無かった。この結果によって、本研究で作製した DENV-LP/3CPrME と DENV-LP/3PrME はデング熱血清との結合能が証明された。

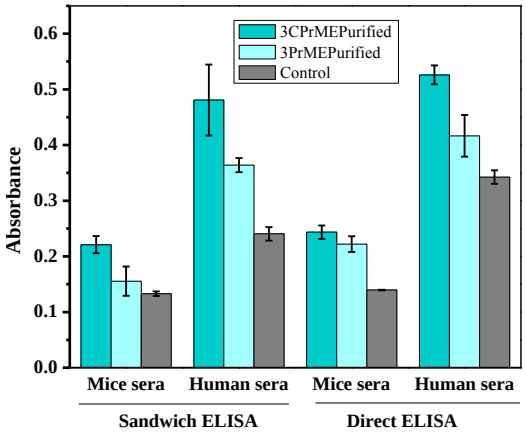



図 5. デング熱患者の血清と本 DENV-LP/3CPrME と DENV-LP/3PrME との結合能。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　6　件）

① Hamizah Suhaimi, Rikito Hiramatsu, Jian Xu, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Secretory nanoparticles of *Neospora caninum* profilin-fused with the transmembrane domain of GP64 from silkworm hemolymph, Nanomaterials, 9(4), 593 (2019). 査読有 DOI: 10.3390/nano9040593

② Robert Minkner, Enoch Y. Park, Purification of virus-like particles expressed in the silkworm *Bombyx mori*, Biotechnol. Lett., 40(4), 659-666 (2018). 査読有

③ Robert Minkner, Rina Baba, Yae Kurosawa, Shinichiro Suzuki, Tatsuya Kato, Shintaro Kobayashi, Enoch Y. Park, Purification of human papillomavirus-like particles expressed in silkworm using a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus bacmid expression system, J. Chromatogra. B, 1096, 39-47 (2018). 査読有

④ Tatsuya Kato, Moeko Hasegawa, Takeshi Yamamoto, Takatsugu Miyazaki, Ryosuke Suzuki, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Enoch Y. Park, Expression of a functional intrabody against hepatitis C virus core protein in *Escherichia coli* and silkworm pupae, Protein Expr. Purif., 150, 61-66 (2018). 査読有

⑤ Tatsuya Kato, Kohei Itagaki, Mai Yoshimoto, Rikito Hiramatsu, Hamizah Suhaimi, Tetsuya Kohsaka, Enoch Y. Park, Transduction of a *Neospora caninum* antigen gene into mammalian cells using a modified *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus for antibody production, J. Biosci. Bioeng., 124(6), 606-610 (2017). 査読有

⑥ Kenshin Takemura, Oluwasesan Adegoke, Naoto Takahashi, Tatsuya Kato, Tian-Cheng Li, Noritoshi Kitamoto, Tomoyuki Tanaka, Tetsuro Suzuki, and Enoch Y. Park, Versatility of a localized surface plasmon resonance-based gold nanoparticle-alloyed quantum dot nanobiosensor for immunofluorescence detection of viruses, Biosens. Bioelectron., 89, 998-1005 (2017). 査読有

〔学会発表〕（計　7　件）

① Doddy Irawan Setyo Utomo, Tatsuya Kato, and Enoch Y Park, Characterization of Dengue Virus Serotype 3 Structural Proteins Expressed in Silkworm Expression System, The 5th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University 2019, 2019 年、静岡大学

② Jian Xu, Hamizah Suhaimi, Mikiko Hayashidani, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Development of antigen-displaying virus-like particle vaccines by SpyTag/SpyCatcher superglue in the silkworm-bacmid expression system, 日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年、東京農業大学。

③ 朴　龍洙、Challenge of dengue virus serotype detection with Serotype Identification Ability Using functionalized hybrid nanocomposites, 6th Biennial International Conference on Drug Discovery from Natural Products and Traditional Medicines, 2018年、National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER), India

④ Doddy Irawan Setyo Utomo, Fithriyah Sjatha, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Expression of Structural Protein of Dengue Virus serotype 3 using Silkworm Expression System, 日本農芸化学会2018年度大会、2018年、名城大学。

⑤ 市川博野,加藤竜也、朴　龍洙、カイコとカイコ細胞を用いたデングウイルス2型由来構造タンパク質の発現、日本農芸化学会2018年度大会、2018年、名城大学。

⑥ Doddy Irawan Setyo Utomo,Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Expression and Purification of Pre-Membrane Envelope (PrME) of Dengue Virus serotype 3 using Silkworm Expression System, International postgraduate Symposium in Biotechnology 2017, 2017年、マレーシア工科大学。

⑦ 朴　龍洙、Potential application of virus-like particles on vaccine preparation, Seminar National Biotechnology IV University Gadjah Mada, 2016年、Yogyakarta, Indonesia.

〔図書〕（計　2　件）

① Enoch Y. Park and K. Maenaka, “Silkworm Biofactory - Silk to Biology”, Edited by Enoch Y. Park and K. Maenaka, pp.300, CRC Press Taylor & Francis Group, December 2019. ISBN: 978-1-138-32812-9

② 朴　龍洙、4種血清型デングウイルスに対応した4価デングワクチン開発の動向、別冊BIO Clinica 慢性炎症と疾患第6巻第2号、森屋 恭爾編集、pp114～119、北隆館、2017年05月28日。

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biotech/

６．研究組織

(1) 研究分担者　なし

(2) 研究協力者　なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。