

HTLV-1感染症予防ワクチンの開発 に関する研究

国立感染症研究所感染病理部
長谷川秀樹

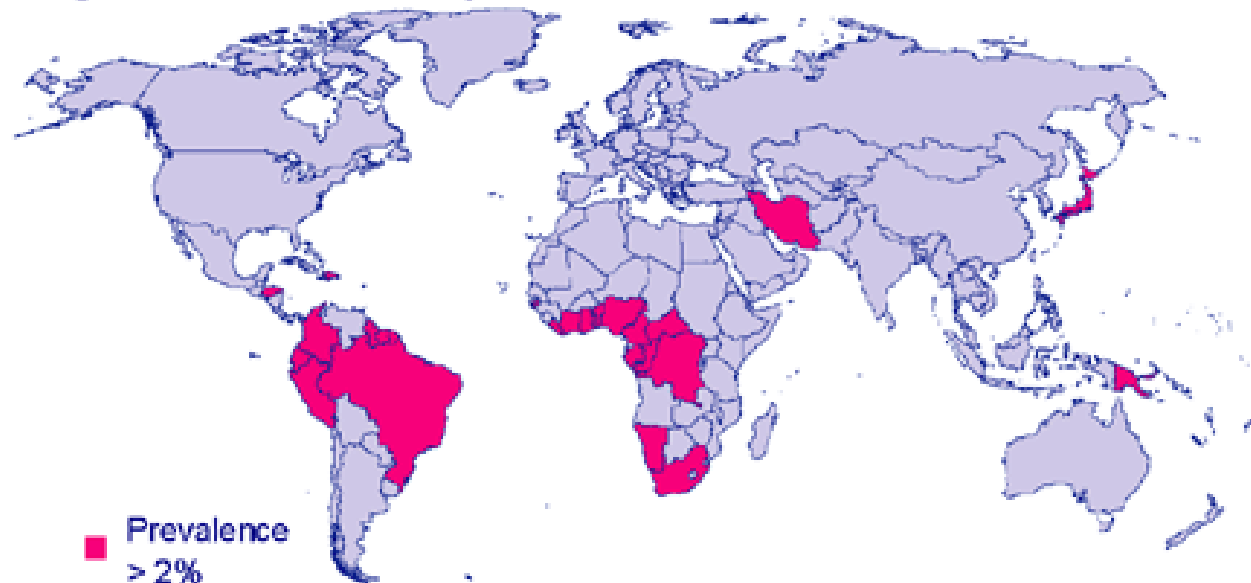
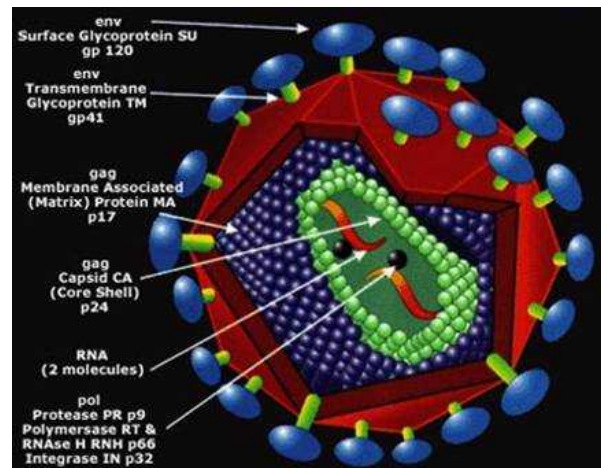
HTLV-I (ヒトT細胞指向性ウイルスタイプ1)

Deltaretrovirus: Human T-cell Lymphotropic Viruses

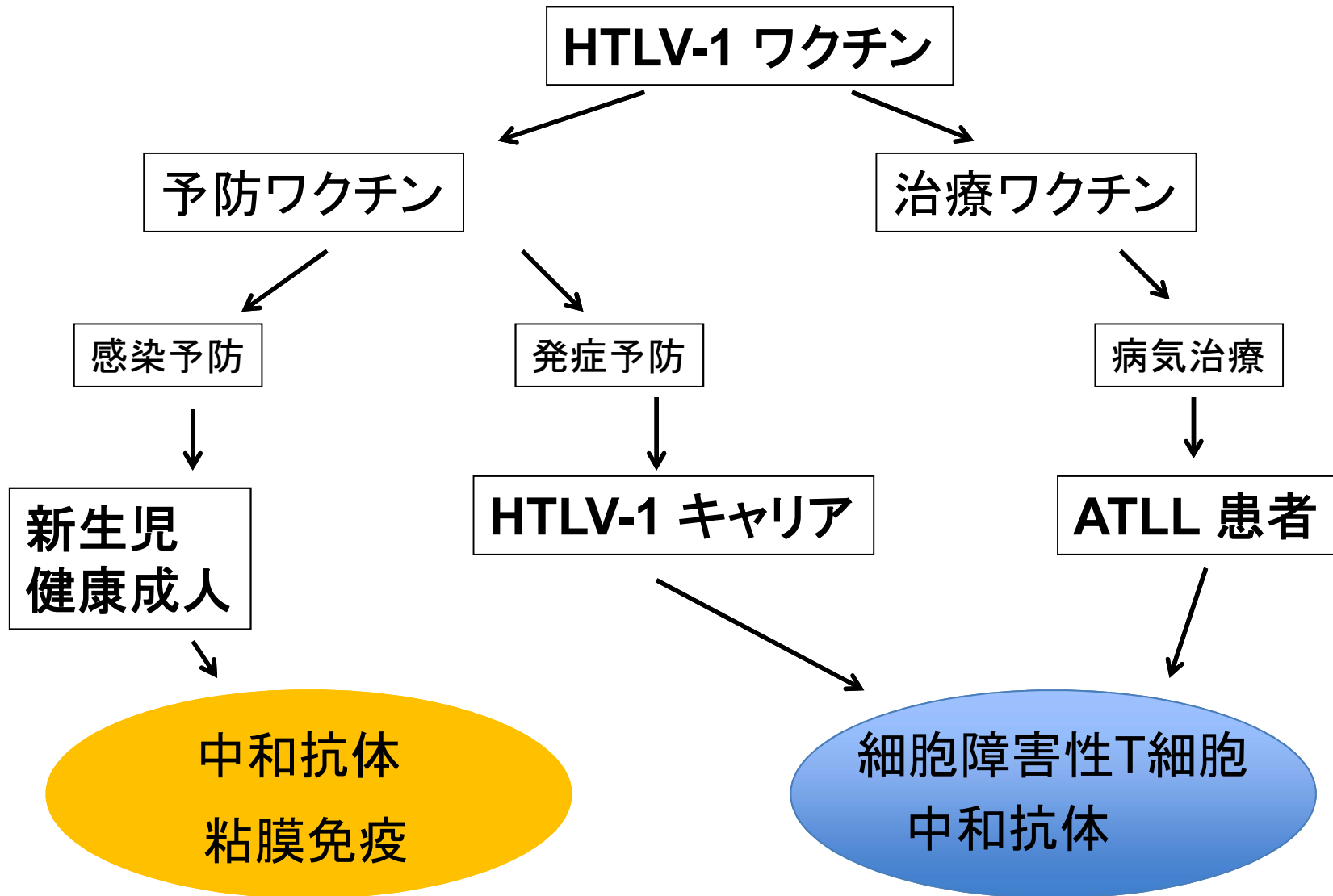
30,000,000人 世界での感染者数
1,080,000人 国内での感染者数
700人 毎年の成人T細胞白血病発生数

白血病リンパ腫(ATLL)・神経疾患(HAM)・ぶどう膜炎・リウマチ様疾患等の原因となる

Figure 2.1: HTLV1 prevalence



HTLV-1 ワクチンの標的



目的と背景

HTLV-1感染症を我が国をはじめとする流行地域から減少させる目的で感染阻止、HTLV-1関連疾患の発症阻止を目指したワクチン開発を目的とする。

- ✓ HTLV-1の主な感染経路は母乳を介した母子感染である。感染防御を目的として新生児の免疫獲得には工夫が必要である。粘膜を介して感染する感染症においては粘膜上で働く特異的IgA抗体に代表される粘膜免疫が重要な働きをする。IgA抗体は母乳中にも積極的に分泌される事が知らせている。血中IgG抗体に加えてIgA抗体が誘導される事により感染防御効果が高まる事が期待できる。
- ✓ また感染細胞を標的とした細胞障害性T細胞の誘導も発症予防の観点から重要である。
- ✓ 新生児へのワクチン接種は、免疫機構が未成熟であるため、有効な効果が期待できない。しかし、新生児の時こそHTLV-1に対する免疫が必要である。



HTLV-1の感染防御免疫の標的抗原の同定、
有効な免疫の検討、ワクチン投与ルート、
免疫方法の検討、アジュバントの検討、評価モデル動物の検討

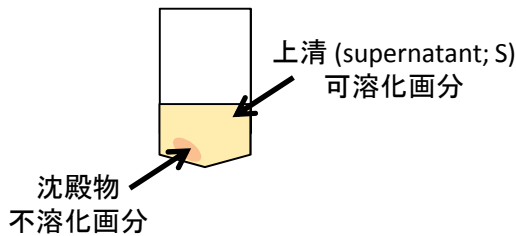
HTLV-1タンパク質の合成と可溶化

翻訳反応液
(total protein; T)

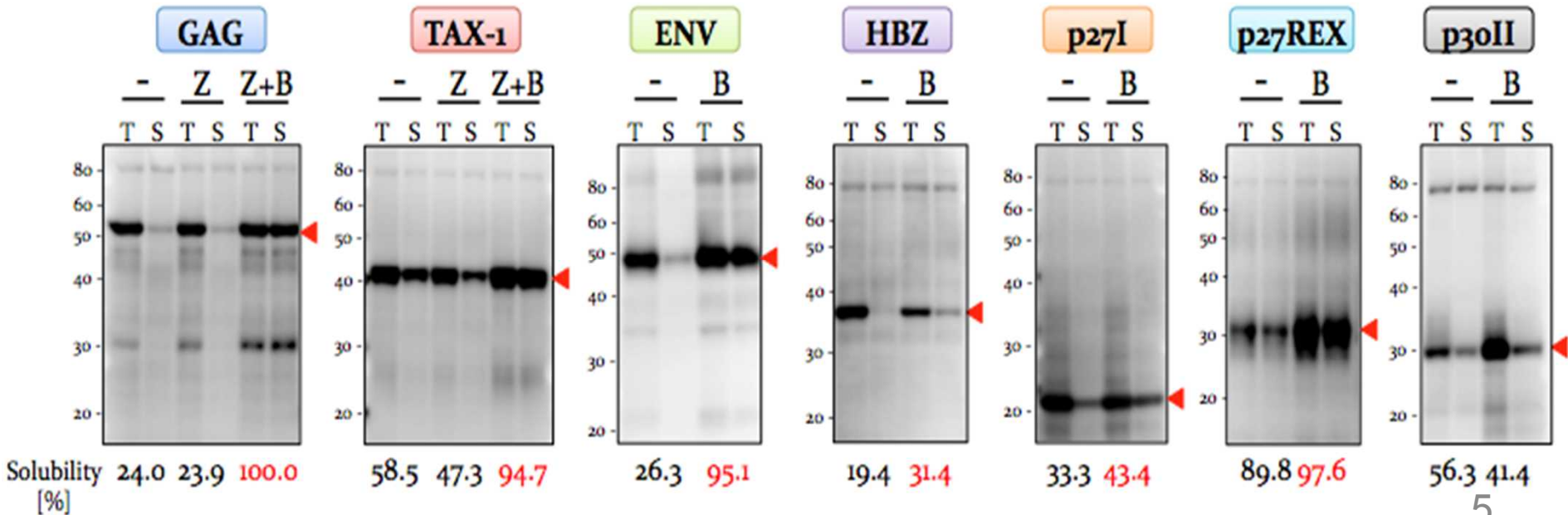
遠心; 15000rp., 4°C, 15min

western blot でのシグナル強度により
可溶化率を計算

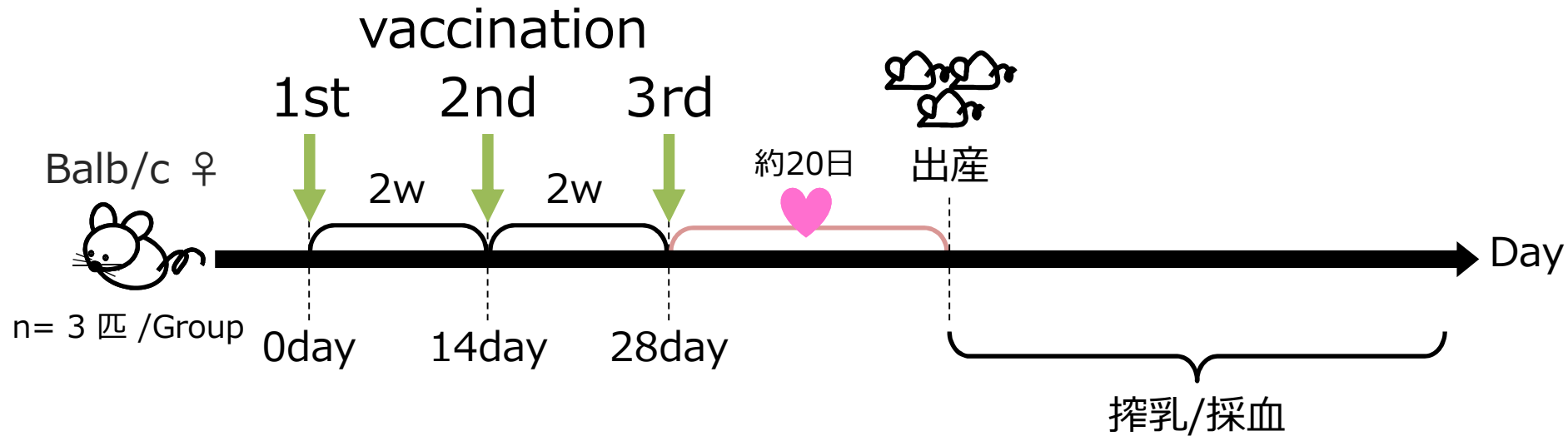
- Nomal (-)
- + Zn (Z)
- +Zn+Brij35 (Z+B)
or
+Brij 35 (B)



$$\text{Solubility} = \frac{\text{supernatant fraction}}{\text{total protein}}$$



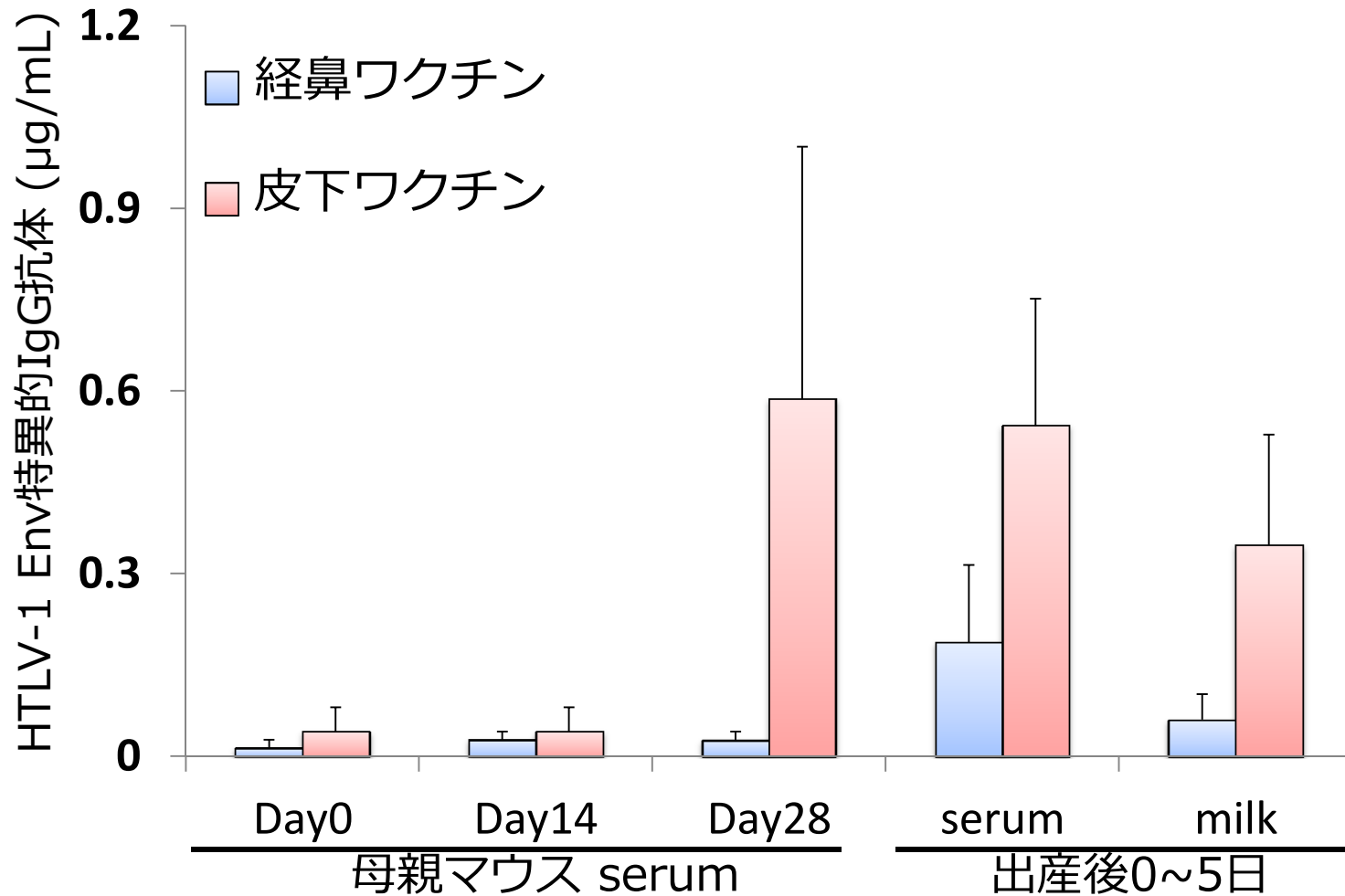
HTLV-1 Envを用いた感染予防ワクチンの開発



ワクチン抗原：コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製したHTLV-1全長Env

Group	route	volume (μL)	1st		2nd		3rd	
			HTLV-1 Env (μg)	Poly(I:C) (μg)	HTLV-1 Env (μg)	Poly(I:C) (μg)	HTLV-1 Env (μg)	Poly(I:C) (μg)
経鼻	i.n	15	10	10	10	10	10	10
皮下	s.c	50	10	10	10	10	10	10
コントロール	-	-	-	-	-	-	-	-

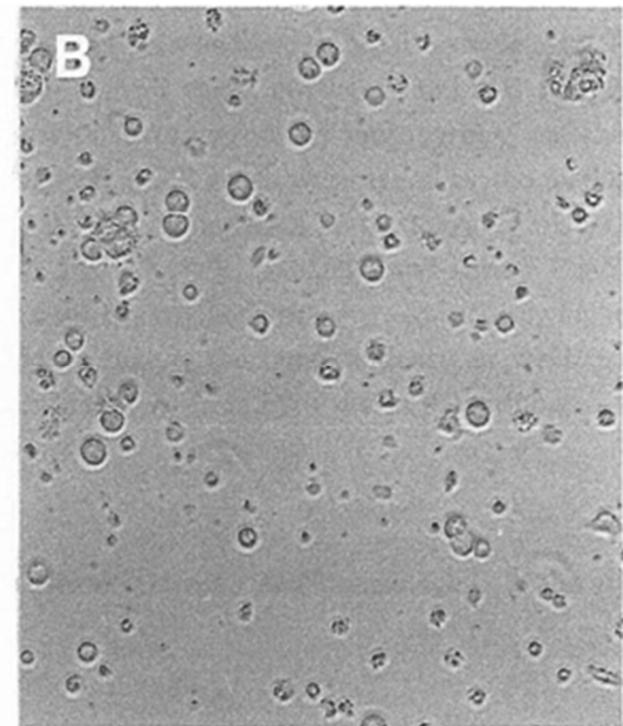
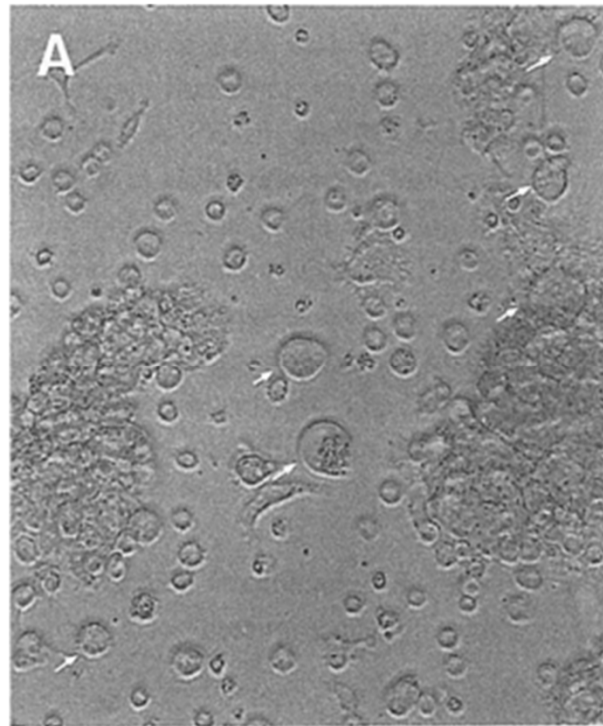
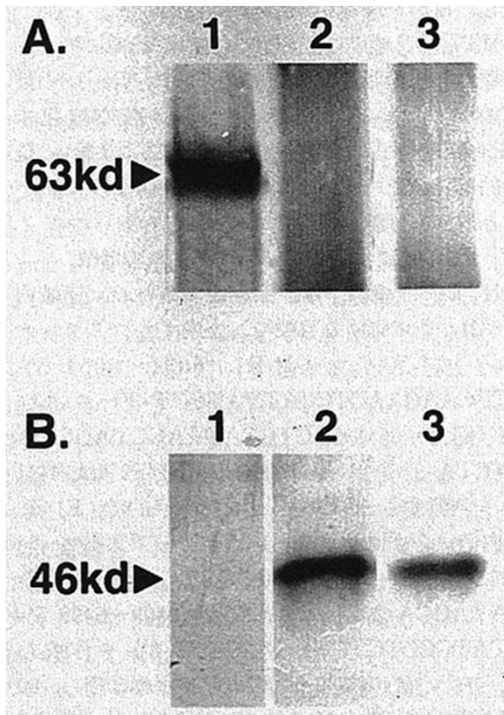
ワクチン接種後の血清、および母乳の抗体



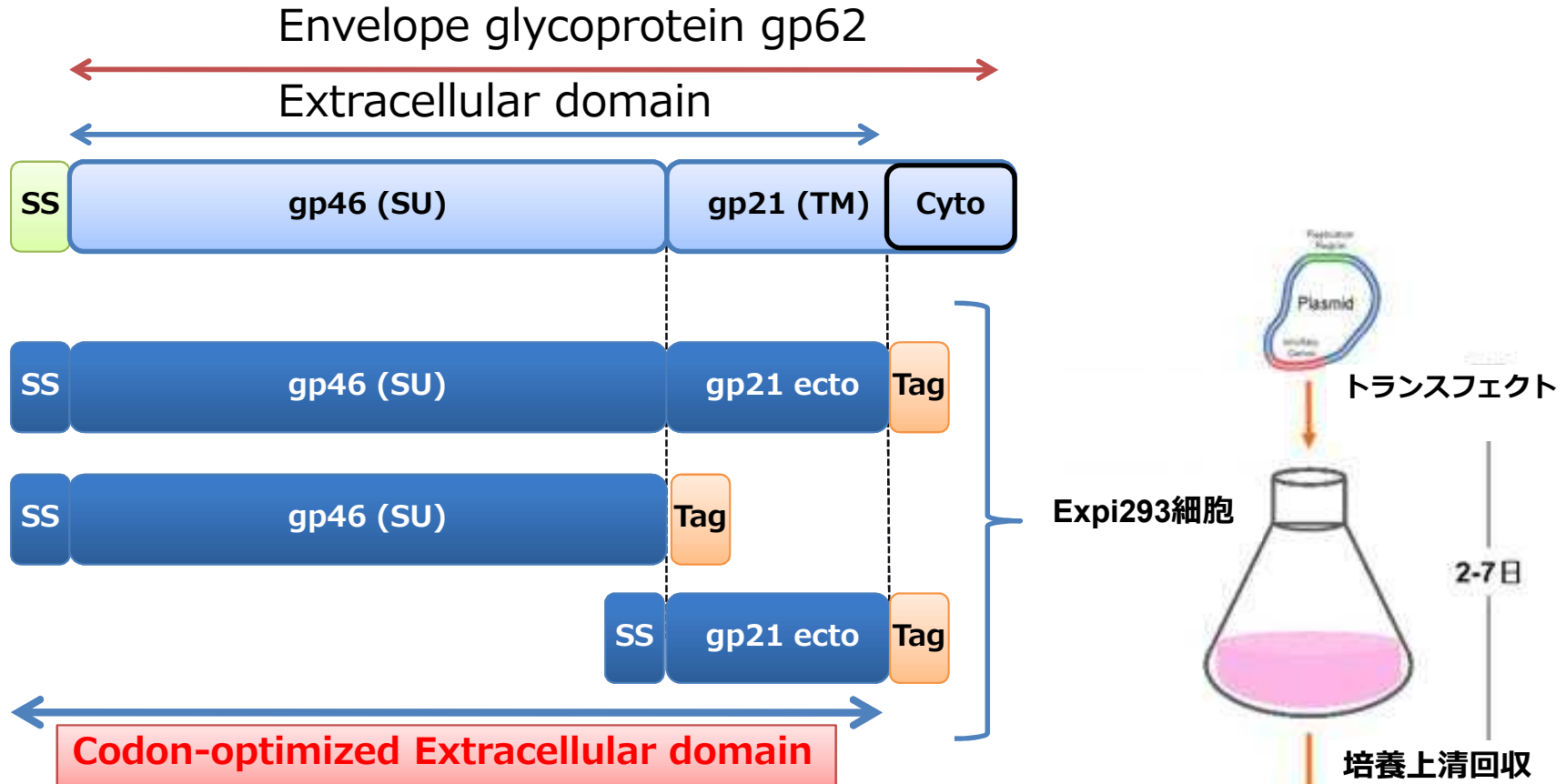
抗体誘導は確認できたが、抗原量10µg、3回免疫が必要であり、免疫原性が低い

インフルエンザHAワクチン（スプリットワクチン）では、抗原量0.1~1µg、2回免疫で十分

Antigen candidate for HTLV-1 Vaccine



哺乳類培養細胞タンパク質合成系による 可溶性HTLV-1 Envの合成



Env細胞外領域のみの発現

→精製工程の簡略化（界面活性剤による可溶化が必要ない）

WBレベルでも発現を確認できない
(野生型コドンのコンストラクトも発現せず)

哺乳類培養細胞タンパク質合成系による 可溶性三量体型HTLV-1 Envの合成

HIV ENV = 三量体

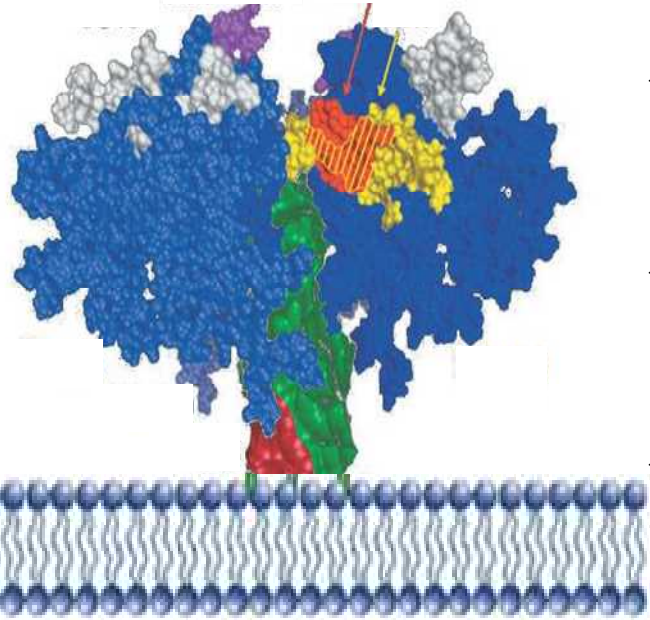
✓ HTLV-1 Envも三量体を形成

✓ 膜貫通領域を除いたENVは、三量体を形成できない??

✓ 三量体を形成できない単量体型ENVでは正しいフォールディングが出来ず分解されている??

✓ 三量体型ENVの方がNativeの構造を維持しており、中和エпитープが保持されている

→ **ワクチン抗原として好ましい。**

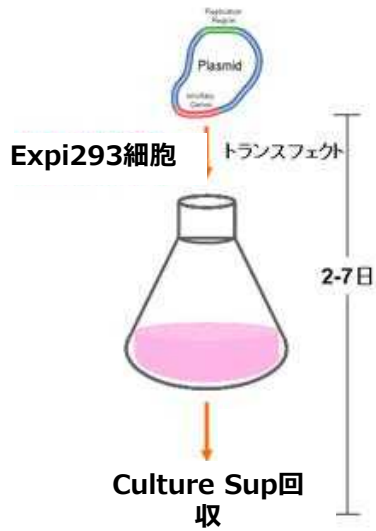


三量体型HTLV-1 Env

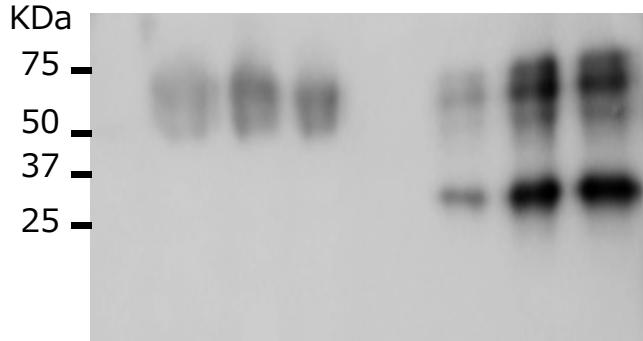


Foldon: 三量体形成ドメイン (29aa; T4バクテリオファージfibrinのC末領域)
この配列は精製後にプロテアーゼ処理により除去可能

哺乳類培養細胞タンパク合成系による 可溶性三量体型HTLV-1 Envの発現と精製



Cell lysate Culture Sup
(-) 1 2 3 (-) 1 2 3



IB: αHis / Reduced

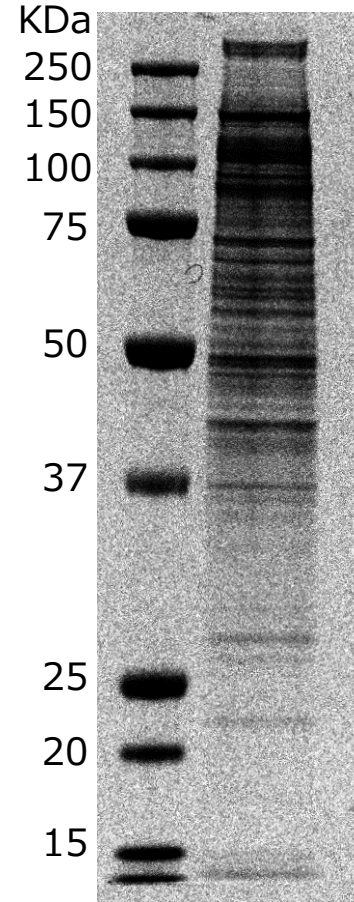
WBレベルでの発現を確認

Culture Sup

Ni-NTA アフィニティーカラム

Ni-NTA 担体カラム溶出タンパク質

Ni-NTA 担体カラム溶出タンパク質

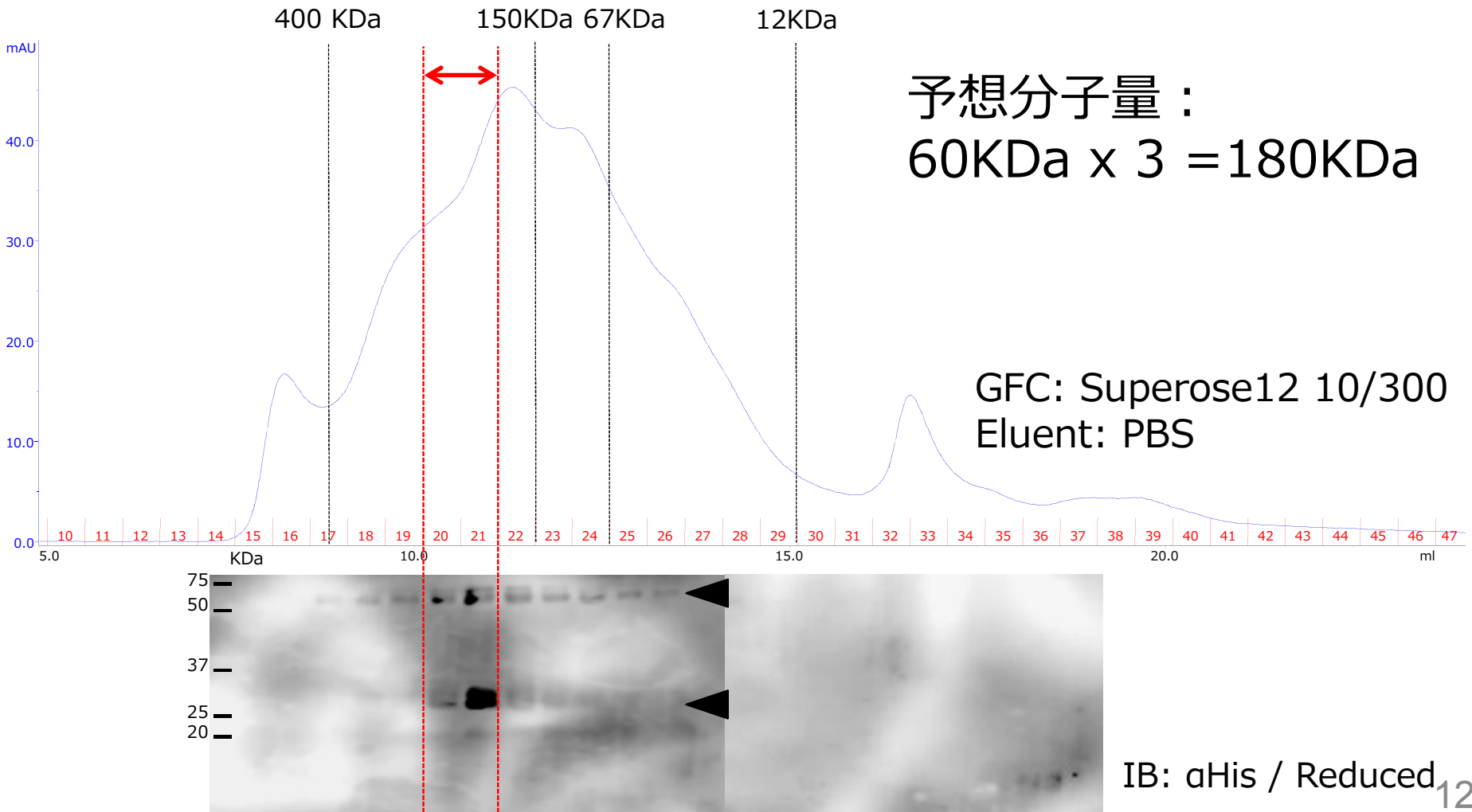


CBB / Reduced

IB: αHis / Reduced

アフィニティー精製では夾雑物が多い

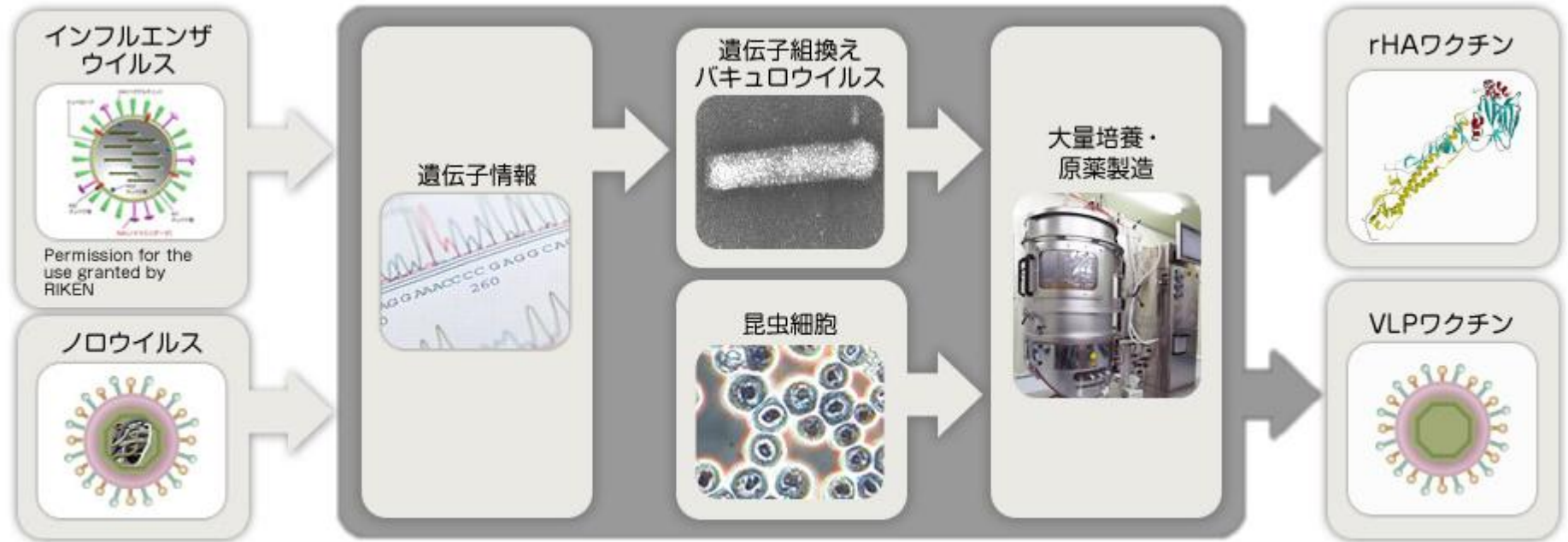
ゲル濾過による可溶性Env三量体化の確認



Envは、150KDa以上の分画に溶出されており、三量体を形

昆虫細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型 HTLV-1 Envの合成

昆虫細胞系を用いたタンパク発現技術 (Baculovirus Expression Vector System: BEVS)



BEVSによるワクチンの製造

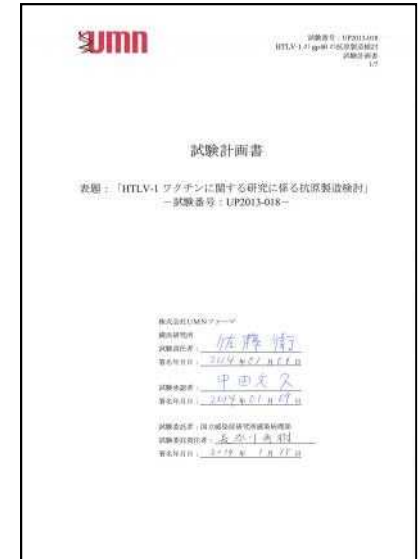
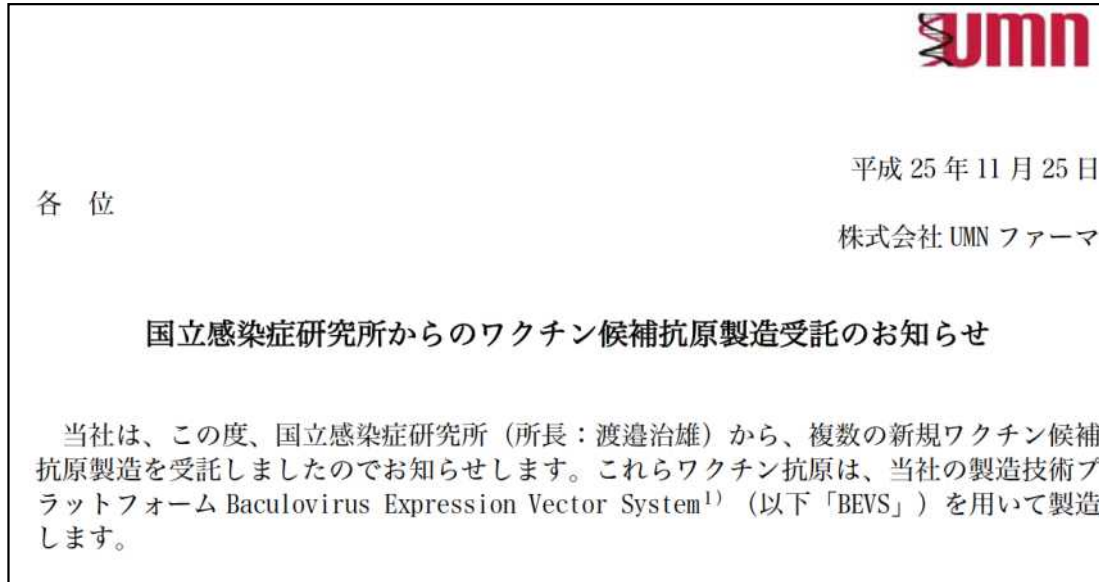
BEVSによるワクチンの製造

- ◇ ヒトパピローマウイルスワクチン「サーバリックス」 (GSK)
- ◇ 組換えインフルエンザHAワクチン (UMNファーマ、臨床第三相)

既にヒトにおいて広く使用されているワクチン抗原製造系

GMPグレード昆虫細胞タンパク質合成系による 可溶性三量体型HTLV-1 Envの合成

実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、日本国内でGMPグレードの昆虫細胞タンパク質合成系を有する（株）UMNファーマによる三量体型HTLV-1 Envの合成



平成25年度内に合成系の構築を行い、数L単位で試験製造の予定。感染研にて精製系の初期検討および合成物の抗原性を検討する。また、より良い抗原設計やエピトープ解析のための基礎情報となるHTLV-1 Env立体構造の解明をX線結晶構造解析により試みる¹⁴

結語

HTLV-1感染症予防ワクチン開発のために感染防御抗原として機能することが知られているEnv抗原をコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて全長Envタンパク質として作製した。

コムギ無細胞タンパク質合成系で作製した全長Envは抗体誘導能を有していたが、抗原性が低かった。

哺乳類培養細胞タンパク質合成系を用いて可溶性Env抗原の作製を試みたところ、単量体型Envは発現しなかったが、三量体化させることにより可溶性三量体型Env抗原の合成に成功した。

哺乳類培養細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型Env抗原合成は収率と精製度が悪く、ワクチン抗原製造系として適さないと考えられた。

今後、実用的なクチンを作製するために昆虫細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型Env抗原の作製を（株）UMNファーマと共同で進め承認に向けた非臨床試験行う。