

# ヒトRSウイルスのワクチン開発のための基礎的研究

新開 大史 [National Institute of Allergy and Infectious Diseases / National Institutes of Health / (前 北海道大学大学院医学研究科感染症制御学分野 / 客員研究員)]

## 背景・目的

ヒトRespiratory Syncytial (RS)ウイルスは乳幼児の細気管支炎の病因の1つであり、慢性呼吸器疾患患者、年輩者の急性呼吸器不全の病因としても注目されている。しかし、有効な治療法がなく、感染病理の解明、有効なワクチンの開発が切望されている。ワクチンの成立しない理由の1つとして、ヒトRSウイルスに備わる免疫抑制能が上げられる。効果的な獲得免疫の成立には、抗原提示細胞における自然免疫の活性化が、重要かつ不可欠である。

本研究では、ヒトRSウイルスに対する自然免疫応答を足がかりに、獲得免疫の成立しにくいメカニズムを解明し、効果的なワクチン開発を目指す。

## 内容・方法

1) ヒトRSウイルスの抗原提示細胞へのToll-like receptorを介した自然免疫活性化能の検討

抗原提示細胞である樹状細胞がヒトRSウイルス感染において、どのような免疫応答をするのかを、ウイルス感染時の樹状細胞の成熟化、上清中へのTNF-alphaやType-I IFNなどのサイトカイン産生を検討した。

2) ヒトRSウイルスによる自然免疫抑制メカニズムの解明

当研究室では、すでにType-I IFN (IFN-beta) 誘導能が低いことを予備実験で明らかにしている。本研究では、ヒトRSウイルスのどの蛋白がIFN-beta産生を抑制しているのかを、ウイルスの各蛋白質を発現させることにより同定を試みる。また、このIFN-beta産生経路をウイルスがどのように抑制しているのかを、ELISAとHEK293細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイシステムを用いて解析した。

## 結果・成果

1) ヒトRSウイルスの樹状細胞での自然免疫活性化能の検討

TLR4はリガンド刺激により、NF-kappaBとIFN-betaのシグナルを伝達する。また、ヒトRSウイルスのエンペロブタンパク質の一つ(F蛋白質)がTLR4のリガンドであり、NF-kappaBのシグナルを伝達することが報告されている。我々はさらにIFN-betaへのシグナルを伝達するかどうかを、RSウイルス刺激による樹状細胞応答を調べることにより解析した。樹状細胞へのRSウイルス刺激(生ウイルス、またはUV不活化ウイルス)は樹状細胞の成熟化マーカー(CD80、CD83、CD86、HLA-DR、CD40)を上昇させた。また刺激24時間後の上清中のTNF-alphaはウイルスの

濃度依存的に上昇したが、IFN-betaは検出限界以下だった(ELISA)。

2) ヒトRSウイルスによるTLR/IFN-betaシグナルの抑制

上記の結果より、ウイルスの何らかの因子がIFN-betaシグナルを抑制している。この仮説を立て、RSウイルスによる抑制効果を確認した。TLR4/MD2/CD14またはTLR3発現HEK293細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイシステムを用い、(生、またはUV不活化)RSウイルス存在、または非存在化で、さらにそれぞれのリガンド(LPSまたはpoly I:C)で刺激した。予想通り、RSウイルスは濃度依存的にISREプロモーターによるルシフェラーゼ活性を抑制した。さらに、樹状細胞におけるIFN-beta産生も同様の結果を示した。

3) ヒトRSウイルスによるTLR/IFN-betaシグナル抑制因子の同定

RSウイルスのTLR/IFN-betaシグナル抑制因子を検索するため、各種RSウイルス蛋白の発現プラスミドを構築し、ウエスタンブロットにて発現を確認した。これらの発現プラスミドを用いて、ISREプロモーターによるルシフェラーゼアッセイとELISAを行った。その結果、RSウイルスのG蛋白が原因因子であることを突き止めた。さらに、F蛋白がTLR4のリガンドであるにもかかわらず、RSウイルス刺激によりIFN-betaが産生されない原因がG蛋白であることを証明するために、精製したF蛋白によるTLR4の刺激ではIFN-betaが産生されるのかどうかを調べた。予想通り、精製F蛋白でのTLR4の刺激で、NF-kappaBとIFN-betaの両方のシグナルが伝達されることが確認された。さらに、その活性はG蛋白の添加によりキャンセルされた。IFN-beta誘導分子の強制発現の実験より、これらの抑制はTICAM-1を介したシグナルを抑制していることを明らかにした。

以上の解析より、RSウイルスのG蛋白はTLR/TICAM-1経路を阻害することにより、IFN-betaの産生を抑制していることを明らかにした。

## 今後の展望

近年、マイナス鎖RNAウイルスのリーバースジェネティクス法の確立により、麻疹ウイルスやヒトRSウイルスの組み換えリコンビナントウイルスが容易に作成できるようになった。本研究で得られた知見より、自然免疫抑制能が少なく、効率の良い樹状細胞応答を誘起しうるヒトRSウイルスワクチンの設計図がある程度、想定できたとと思われる(例えば、抑制活性のないG蛋白を作成し、置き換える)。この設計図をもとに遺伝子操作によるリコンビナントヒトRSウイルスを作製し、より効果的で安全なワクチンの開発を目指す。