

氏名	ろん どんざ LENG DONGZE
本籍（国籍）	中国
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣博第8号
学位授与年月日	令和4年9月26日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当 課程博士
研究科及び専攻	獣医学研究科 共同獣医学専攻
学位論文題目	牛ウイルス性下痢ウイルス表面蛋白抗原 E2 を有する DNA ベクターの免疫効果を増強させる分子アジュバントに関する研究
学位審査委員	主査 教授 寺嶋 淳 副査 准教授 大森 啓太郎 副査 教授 木崎 景一郎 副査 教授 彦野 弘一 副査 教授 村上 賢二

論文の内容の要旨

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）は、フラビウイルス科ペスチウイルス属に分類されるプラス1本鎖 RNA ウイルスであり、牛ウイルス性下痢症（BVD）の原因ウイルスである。BVDV が妊娠牛のある時期に感染すると胎仔は免疫寛容となり、持続感染（PI）牛として娩出されて終生ウイルスを排出する。したがって、BVD の清浄化には PI 牛の摘発・淘汰に加え、妊娠牛への定期的なワクチン接種による感染予防が有効であるが、市販の生ワクチンは妊娠牛への誤った接種で PI 牛の産出および流産のリスクを伴うこと、不活化ワクチンは安全性が高いものの複数回投与が必要なため労力とコストがかかり、生ワクチンに比べて細胞性免疫誘導能が低いといった問題があることから、安全で効果的なワクチン開発が望まれている。

DNA ワクチンは妊娠牛への接種による PI 牛産出および流産のリスクがなく、液性免疫に加え細胞性免疫も誘導できるといった利点を持つ。一方、現在まで BVD に対する免疫原性が高い DNA ワクチンの開発には至っていない。本研究は、BVDV-E2 抗原を有する DNA ワクチンをベースに免疫効果を増強させるために最適な分子アジュバントとして CD40 と CD63 分子に着目して研究を実施した。

第一章では、哺乳類細胞にて目的タンパク質を発現する BVDV E2 または CD40 発現ベクターの構築ならびにそれらのマウスへの投与を行いその効果を検討した。まず BVDV nose 株およびマウス脾臓細胞から RNA を抽出、逆転写後、PCR によって E2 遺伝子領域および CD40 遺伝子の増幅を行い、得られた遺伝子断片をタンパク発現 DNA ベクター（pUMVC4a）に挿入した（pE2, pCD40）。得られたプラスミドについて遺伝子配列を確認後、それぞれを 293T 細胞に導入し、ウエ

スタンブロットティング(WB)で、また、CHO-K1 細胞に導入し、BVDV E2 およびマウス CD40 特異的抗体を用いた免疫組織化学染色により発現を確認した。その後、pE2 (100 μ g) および pCD40 投与量を 12.5, 25, 50, 100 μ g として 6 ~ 8 週齢の BALB/c マウスに 3 週間後に 2 回皮内に共投与し、2 週間後に採血を行い抗 BVDV 中和抗体価を測定した。その結果、pCD40 接種量が 25 および 50 μ g の時に抗体価の増強が認められた。また pE2 のみ投与グループと pCD40 共投与グループ間で E2 特異的 IgG1, IgG2a 抗体価に有意差はみられなかった。脾臓細胞を回収し、BVDV 抗原刺激による細胞増殖能を調べたところ、pCD40 が 25 μ g の時に脾臓細胞が有意に増殖した。また脾臓細胞培養上清中 IFN- γ を ELISA で測定したところ、pCD40 投与量 12.5 μ g の時にウイルス刺激に伴う IFN- γ 分泌量が増加した。以上の結果から、CD40 は BVDV-E2 タンパク質をコードする DNA ワクチンに対して、体液性および細胞性免疫応答を増強できることを明らかにした。

第二章では哺乳類細胞にて発現する CD63 発現ベクターの構築および第一章で構築した pE2 とともにマウスへの投与を行いその効果を検討した。まずマウス腎臓細胞より RNA を抽出、逆転写後、PCR によりマウス CD63 遺伝子を増幅し、遺伝子断片を pUMVC4a に挿入した(pCD63)。pCD63 の遺伝子配列を確認後、293T 細胞に導入し、CD63 タンパク質の発現を WB で、また pCD63 を CHO-K1 細胞に導入し、抗 CD63 特異抗体を用いた免疫組織化学染色によりタンパク質の発現を確認した。その後、投与量を変えた pCD63 (12.5, 25, 50, 100 μ g) および pE2 (100 μ g) を第一章と同方法でマウスに投与し、2 週間後に採血を行い中和抗体価を測定した。その結果、pCD63 の低容量 (12.5 μ g) を接種した群では pE2 単独接種群よりも中和抗体価が高い傾向が見られたが有意差はみられなかった。一方、pCD63 12.5 μ g 投与では BVDV E2 特異 IgG2a 抗体の量が増加した。BVDV で刺激した脾臓細胞は、pCD63 25 μ g 投与群で有意な増殖がみられた。さらに細胞上清中 IFN- γ 量は、25 μ g 投与群で pE2 群よりも有意に多かった。以上の結果、CD63 は BVDV E2 をコードする DNA ワクチンとの共投与において、液性免疫は増強できなかったが、細胞性免疫応答を増強することを明らかにするとともに、BVD ワクチンにおいては、細胞性免疫の惹起力が弱い不活化ワクチン等との共投与においても、細胞性免疫も向上させる可能性が示された。

本研究において CD40 または CD63 は、BVDV E2 タンパク質に液性および細胞性免疫応答を増強する重要な成績が得られた。さらに、この分子アジュバントプラスミドは、BVDV だけでなく、他の感染症、がん治療、アレルギー、自己免疫など、さまざまな用途において、DNA ワクチンの弱い免疫原性を補う可能性があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は、牛ウイルス性下痢症 (BVD) の原因ウイルスで

ある。BVDV が妊娠牛のある時期に胎子に感染すると持続感染 (PI) 牛が娩出され終生ウイルスを排出する。したがって、BVD 清浄化には PI 牛の摘発・淘汰に加え、妊娠牛への適切なワクチン接種による感染予防が有効である。しかし、市販の生ワクチンは妊娠牛への誤った接種で PI 牛の産出および流産のリスクがあること、不活化ワクチンは安全性が高いものの労力とコストが高く、生ワクチンに比べて細胞性免疫誘導能が低いことから、安全で効果的なワクチン開発が望まれている。本研究では、BVDV の主免疫抗原 E2 を有する DNA ベクターを構築し、免疫効果を増強させるための分子アジュバントとして CD40 と CD63 分子に着目して研究を実施した。

第一章では哺乳類細胞にて E2 または CD40 を発現するベクターの構築ならびにマウスへの投与を行いその効果を検討した。BVDV nose 株およびマウス脾臓細胞から RNA を抽出、逆転写後、PCR によって E2 遺伝子および CD40 遺伝子の増幅を行い、得られた遺伝子断片をタンパク発現ベクターに挿入した (pE2, pCD40)。得られたプラスミドの遺伝子配列および哺乳類細胞にて目的タンパク発現を確認した。その後、pE2 (100 μ g) および pCD40 投与量を 12.5, 25, 50, 100 μ g として 6~8 週齢の BALB/c マウスに皮内投与し、3 週間後に追加投与、2 週間後に採血し液性および細胞性免疫を測定した。その結果、pCD40 25 および 50 μ g 群で中和抗体価の増強が認められた。BVDV 抗原刺激による脾臓細胞増殖能を調べたところ、25 μ g 群で有意に増殖した。脾臓細胞培養上清中 IFN- γ 産生量は 12.5 μ g 群で増加した。以上の結果から、CD40 は pE2 との共投与で液性および細胞性免疫を増強できることを明らかにした。

第二章では、CD63 発現ベクターの構築および pE2 とともにマウスへの皮内投与を行いその効果を検討した。マウス腎臓細胞より RNA を抽出、第一章と同様に CD63 遺伝子を増幅し pCD63 を構築した。pCD63 の遺伝子配列および哺乳類細胞における目的タンパク発現を確認後、pE2 および pCD63 (12.5, 25, 50, 100 μ g) を第一章と同方法でマウスに投与・採材した。その結果、pCD63 (12.5 μ g) 群で pE2 単独投与群よりも中和抗体価が高い傾向が見られ、同投与群では E2 特異的 IgG2a 抗体量が増加した。BVDV 刺激脾臓細胞は 25 μ g 群で有意な増殖がみられた。脾臓細胞上清中 IFN- γ 量は、25 μ g 群で pE2 群よりも有意に増加した。以上の結果、CD63 は pE2 との共投与において、液性免疫は有意に増強できなかったが、細胞性免疫を増強することを明らかにするとともに、細胞性免疫惹起力が弱い BVD 不活化ワクチン等との共投与において細胞性免疫を向上させる可能性を示した。

以上のように本研究で検討された分子アジュバントは、BVDV に対する液性および細胞性免疫を増強する可能性を示し、今後の BVD-DNA ワクチンの開発に寄与するものと期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岩手大学大学院獣医学研究科共同獣医学専攻の学位論文として十分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 著者名 Leng, D., Yamada, S., Chiba, Y., Yoneyama, S., Sakai, Y., Hikono, H. Murakami, K.
発行年 2022 年
題目 Co-administration of a plasmid encoding CD40 or CD63 enhances the immune responses to a DNA vaccine against bovine viral diarrhea virus in mice

學術雜誌名 The Journal of Veterinary Medical Science
(卷・号・頁) 84・9・ (in press)