

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

2022年9月

岩手大学大学院  
獣医学研究科共同獣医学専攻  
LENG DONGZE

# 目次

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 略語一覧.....                                                                 | i  |
| 緒論.....                                                                   | 1  |
| 第一章.....                                                                  | 9  |
| 牛ウイルス性下痢ウイルス E2 抗原を発現する DNA ワクチンベクターおよび CD40 発現ベクターの共投与における免疫誘導能の検討 ..... | 9  |
| 1. 緒言.....                                                                | 10 |
| 2. 材料と方法.....                                                             | 12 |
| 1) 細胞株およびウイルス .....                                                       | 12 |
| 2) DNA プラスミドの構築.....                                                      | 12 |
| 3) 大腸菌によるリコンビナント BVDV E2 タンパク質の発現.....                                    | 14 |
| 4) ハイブリドーマの作製.....                                                        | 14 |
| 5) プラスミド DNA の細胞への導入 .....                                                | 15 |
| 6) ウエスタンブロッティング .....                                                     | 15 |
| 7) 免疫組織化学染色.....                                                          | 16 |
| 8) マウスへの投与.....                                                           | 17 |
| 9) 液性免疫の評価（中和実験） .....                                                    | 17 |
| 10) 血清中 IgG1 と IgG2a の測定 .....                                            | 18 |
| 11) 細胞性免疫の測定.....                                                         | 18 |
| 12) 統計解析.....                                                             | 19 |
| 3. 結果.....                                                                | 20 |
| 1) pCD40 の構築 .....                                                        | 20 |
| 2) 哺乳類細胞でのタンパク質発現 .....                                                   | 20 |
| 3) 液性免疫.....                                                              | 20 |
| 4) BVDV 特異的脾臓細胞増殖と IFN- $\gamma$ 産生.....                                  | 21 |
| 4. 考察.....                                                                | 22 |
| 5. 結論.....                                                                | 24 |
| 第二章.....                                                                  | 32 |
| 牛ウイルス性下痢ウイルス E2 抗原を発現する DNA ワクチンベクターおよび CD63 発現ベクターの共投与における免疫誘導能の検討 ..... | 32 |
| 1. 緒言.....                                                                | 33 |
| 2. 材料と方法.....                                                             | 34 |
| 1) pCD63 DNA プラスミドの構築.....                                                | 34 |
| 2) マウス CD63 タンパク質の発現確認 .....                                              | 34 |
| 3) マウスへの投与.....                                                           | 35 |
| 4) 液性免疫の評価（中和実験），血清中の IgG1 と IgG2a の計測及び細胞免疫 .....                        | 35 |

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| 5) 統計解析.....                             | 36 |
| 3. 結 果.....                              | 37 |
| 1) pCD63 の構築.....                        | 37 |
| 2) 哺乳類細胞での遺伝子組換え CD63 蛋白質の発現確認.....      | 37 |
| 3) 液性免疫.....                             | 37 |
| 4) BVDV 特異的脾臓細胞増殖と IFN- $\gamma$ 産生..... | 38 |
| 4. 考 察.....                              | 39 |
| 5. 結 論.....                              | 41 |
| 謝 辞.....                                 | 51 |
| 引用文献.....                                | 53 |

## 略語一覧

CPE : 細胞変性効果 (Cytopathic Effect)

ELISA : 酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

PCR : ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction)

PBS : リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline)

RT-PCR : 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

TCID<sub>50</sub> : 50%組織培養感染量 (Median Tissue Culture Infective Dose)

INF- $\gamma$  : インターフェロンガンマ (Interferon gamma)

GM-CSF : 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

IL-2 : インターロイキン-2 (Interleukin-2)

IL-3 : インターロイキン-3 (Interleukin-3)

IL-4 : インターロイキン-4 (Interleukin-4)

IL-5 : インターロイキン-5 (Interleukin-5)

IgG : 免疫グロブリン G (Immunoglobulin G 免疫グロブリン G)

IgA : 免疫グロブリン A (Immunoglobulin G 免疫グロブリン A)

IgE : 免疫グロブリン E (Immunoglobulin G 免疫グロブリン E)

CCL21 : ケモカインリガンド 21 (Chemokine ligand 21)

CCL7 : ケモカインリガンド 7 (Chemokine ligand 7)

CCL20 : ケモカインリガンド 20 (Chemokine ligand 20)

CCL19 : ケモカインリガンド 19 (Chemokine ligand 19)

ConA : コンカナバリン A (Concanavalin A)

FBS : 血清 (Fetal bovine serum)

## 緒 論

牛ウイルス性下痢ウイルス (Bovine Viral Diarrhea Virus : 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 ウイルスである [Khodakaram-Tafti and Farjanikish, 2017, Ran et al., 2019, Simmonds et al., 2011]。BVDV のエンベロープには糖タンパク質 E<sup>ms</sup> (gp44/48) , E1 (gp33) および E2 (gp55) があり, E<sup>ms</sup> はホモダイマー, E1-E2 ヘテロダイマー, E2 はホモダイマーを構成する。E<sup>ms</sup> は RNase 活性を有する [Rümenapf et al., 1993, Simmonds et al., 2011]。E1 および E2 は細胞への感染に主要な役割を果たす。特に E1-E2 ヘテロダイマーは細胞への侵入に必須である一方で, E<sup>ms</sup> は細胞への侵入に必須ではない [Ronecker et al., 2008]。E<sup>ms</sup> の遺伝子配列は高度に保存されており, 通常の coding 遺伝子などにおける突然変異頻度と全く変わらなかった。免疫原性もあることから, ワクチンおよび免疫学的診断の候補抗原になっている [Gao et al., 2015, Gao et al., 2014, Zhao et al., 2015]。E2 は BVDV の主要な抗原であり, E2 に対する特異抗体は BVDV に対する中和活性を有する [Baxi et al., 2000, Bolin, 1993, Wang et al., 2020]。

牛ウイルス性下痢症 (BVD) は BVDV が原因による疾病である。BVDV は世界的に蔓延しており, 世界の畜産業界に莫大な経済的損失を与えている。その 1 頭あたりの損失は約 88 米ドルであると報告されている [Hessman et al., 2009]。BVDV は, 水牛, 鹿, 豚, 羊, 山羊, ヤク, 野生の反芻動物にも感染がみられる [Walz et al., 2010, World Organizaitn of Animal Health (OIE), 2018]。BVDV に感染した牛の鼻汁, 唾液, 尿, 糞便などには大量のウイルスが排出され, 非感染牛は, 感染牛の鼻, 口およびその他の粘膜ならびに排出物に触れることで新たな感染が成立する [World Organizaitn of Animal

Health (OIE), 2018]。死流産はほとんどの胎齢で発生し、妊娠初期の感染では胎子は免疫寛容となり持続感染 (Persistent Infection : PI) 牛の娩出がみられ終生ウイルスを排出する。また、妊娠初期から中期にかけての感染では、小脳低形成、白内障などの眼障害などの先天性奇形がみられ、胎齢 100 日以降の免疫機能が備わった後の感染では免疫応答でウイルスを排除し正常子牛が娩出される [Iotti et al., 2019, McClurkin et al., 1984]。

BVDV には 2 つの遺伝子型 (BVDV-1 および BVDV-2) が存在する。現在、BVDV-1 型は 17 の Subgenotype に分類され、BVDV-2 型は少なくとも 4 つの Subgenotype に分類されている [Yesilbag et al., 2017]。さらに、BVDV には非細胞病原性 (non-CPE; NCP) と細胞病原性 (CP) 型の 2 つの生物型 (Biotype) がある [Ridpath, 2013]。通常野外では NCP 株の感染がみられる。野外で NCP 株が妊娠牛に感染すると胎盤を介して胎子に感染することで PI 子牛が娩出され、PI 牛に感染している NCP 株が変異し CP 株が出現するか、または NCP 株と抗原性の同じ CP 株が重感染すると BVD を発症する [長井 誠, 2019]。牛群にとって PI 牛は BVDV の蔓延に関する重要要因であり、PI 牛再生産の原因であることから、牛群における PI 牛の摘発・排除は農場における BVDV の清浄化にとって重要である。BVDV は各種臓器、鼻汁、血液、乳汁、精液、尿などからウイルス分離が可能である。特に、洗浄白血球は血中抗体の影響を受けないためウイルス分離材料として最適であり、初乳を摂取した移行抗体を獲得した子牛においても有効である。血清やバルク乳を用いて抗原 ELISA または RT-PCR も用いられる [World Organizaitn of Animal Health (OIE), 2018]。ウイルス抗原が確認された牛は 2 週間または 3 週間後に同様の検査を実施し、再陽性となった牛を PI 牛と確定する。

BVD の治療法はないため、BVD ワクチンの接種が重要な予防法となる。日本においては、生ワクチン (Modified Live Vaccine : MLV) と不活化ワクチン (Killed Vaccine : KV) が市販されている [加藤肇 et al., 2010]。MLV はウイルスを組織培養や他の宿主

動物において繰り返し継代し、本来の宿主（牛）に対する毒性を弱めた株を生きたまま免疫に使用するワクチンである。MLVは感染細胞で増殖し、宿主のCD8+T細胞に対しウイルス抗原を提示できることから、細胞性免疫の活性化は可能である [本川賢司, 2009]。しかし、MLVは妊娠牛に接種すると垂直感染が生ずることがあり、それによってPI牛の産出可能性があることから、妊娠牛への接種は禁止されている。KVはウイルスをホルマリンや $\beta$ プロピオラクトン等で不活化処理し免疫に使用されるワクチンである。KVは妊娠牛接種しても胎子に感染しないが、細胞内で増殖しないためMLVより免疫原性は弱く、数回の投与が必要であり、また感染細胞上に抗原提示ができないため細胞性免疫の活性化能はMLVより低い [Chung et al., 2018, Platt et al., 2017, 本川賢司, 2009]。このように、現在使われている市販のBVDVワクチンは完璧ではなく、安全及び効果的なワクチンの開発が望まれている。

1990年代からDNAワクチンが広く注目されるようになった [Li et al., 2021, Silveira et al., 2021, Wolff et al., 1990]。DNAワクチンとはプラスミドDNAと呼ばれる細菌由来の環状DNAに抗原を発現する遺伝子を組み込んだものであり、動物に投与すると、DNAが細胞質から核へ移行し [Suschak et al., 2017], 強力な哺乳類発現プロモーター (CMV や CAG) の元で [Dou et al., 2021], 抗原タンパク質が細胞内に発現し、その抗原に特異的な液性および細胞免疫反応を誘導する。DNAワクチンは病原体の抗原性を有するが感染性がないため、従来のワクチンに比べて安全性が高い。また、DNAワクチンは感染防御抗原の変更が容易であることから、病原ウイルスの抗原変異に早期に対応可能である。さらに、極低温での輸送や保管が必要でないことから開発途上国での利用も期待されている。近年、アレルギー疾患や各種ガン、感染症などに対するワクチンとして研究され、その臨床応用が世界レベルで進んでおり、家畜への応用も進んでいる。2019年に発生した新型コロナウイルス感染症に対してもDNAワクチンの研究が行われ [Alamri et al., 2021, Tamming et al., 2022], インドではヒトの治験に使用された



[Khobragade et al., 2022]。動物用ワクチンとしては、犬 (Melanoma) , 豚 (Growth Hormone Releasing Hormone) , 馬 (West Nile Virus) , 魚 (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus) など、いくつかの DNA ワクチンが動物で認可されて臨床応用されている [Kutzler and Weiner, 2008]。

DNA ワクチンは主に筋肉内または皮内接種によって [Pouriayevali et al., 2019, Zhang et al., 2017], 投与部位の細胞 (角質層細胞と筋肉細胞) [Lovas et al., 2014, Raz et al., 1994], ならびに樹状細胞 (Dendritic Cell : DC) [Akbari et al., 1999, Hobernik and Bros, 2018] に抗原が発現される。その後, 抗原タンパク質が細胞質外に放出されるか, または細胞がアポトーシスを起こした後, 抗原は樹状細胞またはマクロファージによって貪食され, その抗原情報が未成熟 B 細胞, CD4+T 細胞または CD8+T 細胞に提示される。また, DNA は血液とともに全身を循環し [Kim et al., 2020, Woo et al., 2011], 全身の免疫応答が引き起こされる。DNA の筋肉内接種 9 時間後に 98% の DNA が排除される [Levy et al., 1996]。エレクトロポレーションによる皮内接種では, 1 時間後に 55%, 12 時間後には 1% が接種部位に残ること, 肺, 肝臓, 心臓, 脳, 脾臓, 腎臓などの組織には接種 14 日後も DNA を検出できることが報告されている [Kim et al., 2020]。

DNA ワクチンは, 一般的に MLV に比較して免疫原性が低く, 効果を上げるためには KV と同様に数回の投与が必要になるなどのデメリットがあるため, その免疫効果を高めるためのアジュバントに関する研究が進められており, 分子アジュバントもその一つである。分子アジュバントについては以下のものがある (表 0-1) 。

**サイトカイン (Cytokine) :** ナイーブ Th 細胞 (Th0) 細胞は IFN- $\gamma$  や IL-4 などのサイトカインを分泌し, Th1, Th2 細胞の活性化を引き起こす [Fox, 1993, O' Connor et al., 2020]。一方で, Th1 細胞は GM-CSF, IL-2, IL-3 及び IFN- $\gamma$  などを分泌して, T 細胞増殖を誘導し, 細胞性免疫応答を誘導する。Th2 細胞は IL-4 や IL-5 などのサイトカ

インを分泌し、液体免疫に担う B 細胞を活性化させ、抗体を分泌する形質細胞へと分化させ、IgG, IgA, IgE 産生を誘導する [Stark et al., 2019]。

**ケモカイン (Chemokine)** : 炎症局所で産出される白血球に対して遊走活性を有する低分子量蛋白 (8~14 kDa) で [Bruserud and Kittang, 2010, Silva et al., 2020], リンパ系組織の形成や維持に必須の役割を果たす。樹状細胞 (DC) は T 細胞に抗原を提示して、体の免疫応答を引き起す。ケモカインは DC の発生と機能のいくつかの段階で重要な役割を果たすことができる [McColl, 2002]。CCL21, CCL7, CCL20 などのさまざまなケモカインは、炎症部位への未熟樹状細胞 (immature Dendritic Cell : iDC) の移動を引き起す。iDC が炎症または損傷した組織部位に到達すると、それらは抗原を獲得し、共刺激分子の発現が高まり、さらに成熟樹状細胞 (mature Dendritic Cell : mDC) に活性化することができる [Dieu et al., 1998]。CCL19 が mDC から分泌され、ナイーブ CD4+T 細胞の抗原応答とスキャン作用を増加させる効果がある [Kaiser et al., 2005]。

**共刺激因子 (Costimulatory factor)** : 樹状細胞や B 細胞などが T 細胞を活性化する際に必須となる補助的なシグナルを介在する分子のこと。副刺激因子, 副刺激分子, 共刺激分子とも呼ばれる。T 細胞を活性化する際は T 細胞上の T 細胞受容体が抗原ペプチドと主要組織適合抗原 (MHC) 複合体を認識し、主要なシグナルが入ることが必要になる。抗原に対する T 細胞応答の質は、T 細胞表面にも発現する一連の共刺激および共抑制受容体によるシグナル伝達に大きく依存する [Lafferty and Cunningham, 1975]。共刺激シグナルは、T 細胞の増殖, サイトカイン分泌, 細胞毒性機能, 記憶形成または生存を促進する [Chen and Flies, 2013]。補助的なシグナルを介在する共刺激因子として、抗原提示細胞上の CD80, CD86 が休止および活性化 T 細胞効用がある。シグナルにより IL-2 産生と CD4+T 細胞の増殖を促進する可能性がある [Weinkove et al., 2019]。

近年、多くの分子アジュバントが DNA ワクチンに検討されている (表 0-1)。BVD に

対する DNA ワクチンの研究として IL-2 および GM-CSF について分子アジュバントとして研究されており，マウスモデルにおいては液性免疫と細胞性免疫を同時に改善することができたとする報告がある [Nobiron et al., 2001]。しかし，他の分子アジュバントについては BVD・DNA ワクチンに応用可能かについて検討されていない。

CD40 は，TNF 受容体スーパーファミリーに属し，B 細胞，樹状細胞，マクロファージなどの抗原提示細胞に発現し，ヘルパーT 細胞上の CD40 ligand (CD40L) からのシグナルを抗原提示細胞に伝達する膜タンパク質として知られている [Jansen et al., 2016, Kooten and Banchereau, 1997]。抗原を取り込んだ樹状細胞等の抗原提示細胞が抗原を提示して T 細胞を活性化するためには共刺激シグナルが必須である。抗原提示細胞の CD40 等の共刺激分子が，ヘルパーT 細胞の CD40L 分子等と結合して，T 細胞の活性化と増殖を誘発する [鈴木元彦, 2017]。近年の研究において，CD40 は H5N1 亜型インフルエンザ DNA ワクチンの分子アジュバントとして免疫増強効果を示すことが報告されている [Chen et al., 2014]。

CD63 は，Lysosome-associated membrane glycoprotein 3 (LAMP3) とも呼ばれ，テトラスパンファミリー (TM4SF) に属する。ファミリーの多くは 4 つの疎水性ドメインが特徴の細胞表面タンパク質で，細胞発達，活性化，分化や運動性を制御するシグナル伝達を仲介する。CD63 は細胞表面にある糖タンパク質であり，インテグリンと複合体を形成し，エクソソームマーカーとして知られており，単球/マクロファージや T 細胞の細胞膜において発現する膜タンパク質である [Engering et al., 2003, Metzelaar et al., 1991, Petersen et al., 2011]。CD63 の活性化により持続的かつ効率的な T 細胞の活性化と増殖が促進される [Pfistershammer et al., 2004]。

本研究では，BVDV-E2 抗原を有する DNA ベクターとその免疫効果を増強させるための最適な分子を調査して，CD40 と CD63 分子に着目して研究を実施した。

初めに，第 1 章で BVD に対する DNA ワクチンに使用可能な BVDV E2 抗原を発現する

DNA ベクターを作製するとともに、CD40 分子を発現する DNA ベクターを構築し、E2 DNA ベクターと CD40 ベクターをマウスに共投与することにより、CD40 の免疫増強効果について検討した。さらに、第 2 章では CD63 分子を発現する DNA ベクターを作製し、第 1 章で作製した DNA ベクターとともにマウスに共投与し、その免疫増強効果について検討した。

表 0-1. 近年検討されている分子アジュバント (Suschak らの論文から引用) [Suschak et al., 2017]

| Molecular Adjuvant | Molecule Type  | Animal Model   | Adaptive Response Effect |
|--------------------|----------------|----------------|--------------------------|
| CD40L              | Co-Stimulatory | Mice           | Cellular                 |
| CD80/86            | Co-Stimulatory | Mice, NHP      | Cellular                 |
| GM-CSF             | Cytokine       | Mice           | Humoral                  |
| ICAM-1             | Co-Stimulatory | Mice           | Cellular                 |
| IFN-g              | Cytokine       | Mice, NHP      | Cellular                 |
| IL-2               | Cytokine       | Mice           | Cellular, Humoral        |
| IL-4               | Cytokine       | Mice, NHP      | Humoral                  |
| IL-7               | Cytokine       | Mice Cellular, | Humoral                  |
| IL-8               | Chemokine      | Mice           | Cellular, Humoral        |
| IL-10              | Cytokine       | Mice           | Cellular                 |
| IL-12              | Cytokine       | Mice, NHP      | Cellular                 |
| IL-15              | Cytokine       | Mice, NHP      | Cytokine                 |
| IL-18              | Cytokine       | Mice, NHP      | Cytokine                 |
| MCP-1              | Chemokine      | Mice           | Humoral                  |
| M-CSF              | Cytokine       | Mice           | Cellular                 |
| MIP-1a             | Chemokine      | Mice           | Humoral                  |
| RANTES             | Chemokine      | Mice           | Cellular                 |

## 第一章

牛ウイルス性下痢ウイルス E2 抗原を有する DNA ワクチンベクターおよび CD40 発現ベクターの共投与における免疫誘導能の検討

## 1. 緒言

DNA ワクチンは、一般的に生ワクチンに比較して免疫原性が低く、効果を上げるためには不活化ワクチンと同様に数回の投与が必要になるなどのデメリットがある。そのため、DNA ワクチンの免疫効果を高めるためのアジュバントに関する研究が進められており、分子アジュバントもその一つである。

共刺激分子 CD40 は、TNF 受容体スーパーファミリーに属し、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、内皮細胞など、多様な免疫・非免疫細胞の表面に発現しており [Peters et al., 2009]、ヘルパーT 細胞上の CD40L からのシグナルを抗原提示細胞に伝達する膜タンパク質として知られている [Jansen et al., 2016, Kooten and Banchereau, 1997]。CD40 は TNF 受容体関連因子 2 (TRAF2) , TRAF3, TRAF5, TRAF6 と直接結合し、TRAF1 とは間接的に結合している [Bishop, 2004]。CD40 は、主に TRAF タンパク質を介してシグナル伝達を仲介する。これは、細胞の種類に応じて、さまざまなシグナル伝達経路を活性化または阻害する可能性がある。抗原活性化 B 細胞の表面に発現する CD40 と活性化 CD4<sup>+</sup>T 細胞に発現する CD40L の結合は、液性免疫応答の開始と進行に不可欠である。CD40 は、B 細胞の細胞間接着、持続的な増殖、増殖、分化に関与している [Elgueta et al., 2009]。アゴニストである抗 CD40 抗体を投与すると、B 細胞や樹状細胞の CD40 に結合し、これらの細胞の CD40/CD40L シグナル伝達経路を活性化する。マウスモデルにおいては DNA ワクチンや合成ペプチドワクチンに対する免疫反応を増強することが確認されている [Barr et al., 2005, Carlring et al., 2004, Ninomiya, 2002, Tellander et al., 2000]。一方、CD40 をコードするプラスミドは、投与部位の樹状細胞にリコンビナント CD40 を発現させ、抗原提示時に樹状細胞やヘルパーT 細胞の CD40/CD40L シグナル伝達経路の活性化を促進させる。また、これらのプラスミドは、B 細胞上の CD40 に結合する抗 CD40 抗体を誘導する。その結果、CD40 をコードするプラ

スミドの同時投与により、DNA ワクチンに対する液性免疫応答が増強される [Chen et al., 2014, Sicard et al., 2020, Xu et al., 2010]。

近年、CD40 を H5N1 亜型インフルエンザ DNA ワクチンの分子アジュバントとして活用し、インフルエンザウイルスに対する免疫を増強させることが報告されている [Chen et al., 2014]。しかし、CD40 が BVDV DNA ワクチンについて免疫増強効果を示すかについては不明である。本研究では BVDV DNA ワクチンとして BVEV E2 を発現する DNA ベクターを構築するとともに、CD40 分子を発現する DNA ベクターと共投与することで、BVDV に対する免疫効果がみられるかについて検討した。



## 2. 材料と方法

### 1) 細胞株およびウイルス

Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) および Human Embryonic Kidney (HEK-293T) 細胞を Dulbecco の最小必須培地 (Dulbecco's Minimal Essential Medium: DMEM; Nissui, Tokyo, Japan) で培養した。初代ウシ胎子筋 (Bovine Fetal Muscle: BFM) 細胞を作製し [Shimizu and Satou, 1987], 10%トリプトースリン酸ブロス (Tryptose Phosphate Broth: TPB) 加イーグル最小必須培地 (Eagle's Minimal Essential Medium: EMEM; Nissui) で培養した。これらの培地に, 5%の非働化胎子ウシ血清 (Fetal Bovine Serum: FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 units/ml のペニシリン (Nacalai Tesqu, Kyoto, Japan), 100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン (Nacalai Tesqu) および 2 mM の L-glutamine (Thermo Fisher Scientific) を添加した。細胞を 5%CO<sub>2</sub> および 95%の空気を含有する湿潤培養器で, 37°Cで培養した。FBS は, BVDV I 型 (Nose 株) を指示ウイルスとしたウイルス中和試験によって, 抗 BVDV 抗体を含まないことを確認した。BVDV-1-NOSE 株 ([Kodama, 1974], GenBank アクセッション番号: AB078951) を M. O. I : 0.1~0.01 で MDBK 細胞に摂取後 5 日間増殖させた。その後, 細胞を凍結・融解を 3 回行い, 4°Cで 15 分間, 1,710×g (Kubota 5500, Kubota, Tokyo, Japan) での遠心分離により細胞碎片を除去した。ウイルス力価は, 96-well plate 上に培養した BFM 細胞を用いて測定した。ウイルスの TCID<sub>50</sub> は Reed-Muench 法によって算出した [Elikaei et al., 2017, Shimizu and Satou, 1987]。ウイルスを使用するまで-70°Cで保存した。

### 2) DNA プラスミドの構築

マウス CD40 をコードするプラスミド (pCD40) の構築のために, TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて, BALB/c マウスの脾臓細胞から total RNA を抽出した。

BVDV E2 タンパク質をコードするプラスミド (pE2) の構築には、TRIzol-LS 試薬

(Thermo Fisher Scientific) を用いて、BVDV 1 Nose 株を感染させた MDBK 細胞の培養上清から全 RNA を抽出して用いた。mRNA またはウイルス RNA ゲノムの逆転写には、PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ, 日本, 滋賀) を使用した。T100 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) で 37°C 15 分, 85°C 5 秒インキュベートすることにより, cDNA を合成した。

マウス CD40 遺伝子のコード配列は, 特異的プライマーセットを用いた PCR により増幅した。プライマー配列は表 1-1 の通りである (制限酵素部位には下線を付した)。反応混合物は, 40ng/1  $\mu$ l の cDNA, 10  $\mu$ M のフォワードおよびリバースプライマー各 1  $\mu$ l, KOD One (Toyobo, Osaka, Japan) 5  $\mu$ l, 滅菌超純水 2  $\mu$ l から構成された。PCR 増幅は以下の条件で行った: 94°C で 2 分間の初期変性, 98°C で 10 秒間の変性, 60°C で 5 秒間のアニーリング, 68°C で 25 秒間の伸長を 30 サイクル行った。

BVDV E2 遺伝子は, 他グループの先行研究に基づき, E2 タンパク質の分泌型として 3' 末端に位置する膜貫通領域を欠いた部分 E2 フラグメント (33 アミノ酸) を増幅するように設計した特異的プライマーセットを用いて PCR 増幅した [Nobiron et al., 2000, Nobiron et al., 2001]。さらに, フォワードプライマーは糖タンパク質 E1 の C 末端疎水性領域に配置し, リーダーペプチドとして 10 アミノ酸残基を含むコンストラクトを作成した。使用したプライマーの配列は表 1-1 に示す。PCR 増幅は, KOD One PCR Master Mix (Toyobo) を用いて行った。反応混合物は, 40ng/1  $\mu$ l の cDNA, 10  $\mu$ M のフォワードプライマーとリバースプライマー各 1  $\mu$ l, KOD One (Toyobo) 5  $\mu$ l, 滅菌超純水 2  $\mu$ l から構成された。増幅は以下の条件で行った: 94°C で 2 分間の初期変性, 98°C で 10 秒間の変性, 63°C で 5 秒間のアニーリング, 68°C で 25 秒間の伸長を 30 サイクル行った。増幅された各 DNA 断片を制限酵素で消化し, pUMVC4a 発現ベクター

(Aldevron, South Fargo, ND, USA) に挿入して pE2 または pCD40 を得た。プラスミド

の DNA 配列は 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いたシーケンス解析により確認した。プラスミドは大腸菌 DH5  $\alpha$  細胞で増幅し、GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いてキットの指示書に従い精製した。プラスミドを滅菌超純水で溶出し、 $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度に希釈した。

### 3) 大腸菌によるリコンビナント BVDV E2 タンパク質の発現

BVDV 1 Nose 株の N-末端および C-末端に  $6 \times$  Histidine タグを持つ部分 E2 遺伝子 (N-末端 164 アミノ酸に相当する 492 bp) をコドン最適化を行い合成した (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan)。この部分 E2 断片を制限酵素で消化し、pET-41a 発現ベクター (Merck, Darmstadt, Germany) に挿入した。得られたプラスミド pET-41a/E2 を用いて大腸菌 BL21 (DE3) 細胞 (メルク社製) を形質転換した。組換え BVDV E2 タンパク質 (rE2) の発現を誘導するために、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (最終濃度, 1.0 mM) を培養液に加え、 $30^\circ\text{C}$  で 6 時間インキュベーションを行った。rE2 を含む封入体を超音波処理し、タンパク質変性剤 (8 M 尿素と 10 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール) を含むリン酸緩衝食塩水 (Phosphate-Buffered Saline: PBS) 中で可溶化した。rE2 は、製造元の指示書に従い、変性条件下で  $\text{Co}^{2+}$  チャージ TALON 樹脂 (Takara-Bio) 上でアフィニティ精製した。この後、バッファ交換で変性物質を除去した。得られた rE2 タンパク質を抗原として、ELISA やモノクローナル抗体 (mAb) の作製に使用した。

### 4) ハイブリドーマの作製

BALB/c マウスに rE2 ( $100 \mu\text{g}/\text{dose}$ ) を腹腔内注射した; アジュバントとして Imject Alum (Thermo Fisher Scientific) を使用した。1 週間間隔で 3 回ブースター免

疫した後、脾臓細胞を採取し、PEG1500 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) を用いて P3U1 細胞と融合させた。得られたハイブリドーマは、10%FBS およびヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン選択培地サプリメント (Thermo Fisher Scientific) を添加した RPMI 1640 培地で増殖させた。ハイブリドーマは、その培養上清の ELISA における rE2 に対する反応性に基づいて選択し、E2-1a-1 と E2-1a-6 の2つのハイブリドーマクローンを確立した。これらの mAb の抗原に対する反応性は、ウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色によって確認した。Hybridoma-SFM 培地 (Thermo Fisher Scientific) で培養したハイブリドーマの上清から mAb を精製するために、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Cytiva, Marlborough, MA, USA) を用いた。

## 5) プラスミド DNA の細胞への導入

構築した pCD40 プラスミドの動物細胞内での CD40 の発現を確認するために、プラスミド DNA を 6 Well plate に培養した HEK-293T 細胞に Transfection した。細胞は 5% FBS (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) , L-グルタミン (Gibco, Thermo Fisher Scientific) 100 units/ml penicillin (Nacalai Tesque), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Nacalai Tesque) を添加した DMEM (Nissui) で培養した。HEK-293T 細胞は 80% の confluent になる時、PEI MAX (Polysciences, Warrington , PA, USA) を用いて、10  $\mu$ g の PEI MAX と 3  $\mu$ g の pCD40 を混合し、30 分間室温におき、混合試薬を細胞に添加した。37°C で 48 時間、5%CO<sub>2</sub> 環境で培養した。

## 6) ウェスタンブロッティング

HEK-293T 細胞にプラスミド pE2 または pCD40 をトランスフェクションしてから 48 時間後に、細胞ライセートと培養上清を採取した。それらを SDS サンプルバッファー

(BioRad) で煮沸し、10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、分離されたタンパク質をポリビニリデン・ジフルオリド (PVDF) 膜 (Merck) に転写した。転写膜は5%スキムミルクを含むPBSでブロックした後、 $0.1\mu\text{g/ml}$ の抗BVDV E2 mAb (クローンE2-1a-1; この研究で作製したもの)、 $0.1\mu\text{g/ml}$ の抗CD40 mAb (クローンG-12; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) または $0.1\mu\text{g/ml}$ の抗 $\beta$ -アクチン mAb (クローンAC-15; Sigma-Aldrich) を第1抗体希釈液 (Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1, Toyobo) で希釈し、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。その後、第2抗体希釈液 (Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2, Toyobo) でペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGまたは抗ラットIgG抗体 (1:10,000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, ME, USA) を希釈し、室温で1時間インキュベートした。膜はECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva) を反応させ、ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System (BioRad) を用いて抗体との特異結合を確認した。

## 7) 免疫組織化学染色

プラスミドpE2またはpCD40をPolyethylenimine Max (Polysciences) を使用してChinese Hamster Ovary (CHO)-K1細胞にトランスフェクションし、24時間後、単層細胞をLab-Tek Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific, Inc) 中で20分間 $-30^{\circ}\text{C}$ 氷冷メタノールで固定した。0.2% BSA 含むPBSでブロッキングして、1次抗体: $1\mu\text{g/ml}$ の抗BVDV E2 mAb (clone E2-1a-6; 本研究作製) または $1\mu\text{g/ml}$ のanti-CD40 mAb (clone G-12; Santa Cruz Biotechnology) を、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。2次抗体はFITC-conjugated anti-mouse IgG (1:200 希釈; Jackson ImmunoResarch) で反応させた後、DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) を細胞に滴下し、暗所、室温で15分間核染色を行った。次に、Slidesを緩衝グリセロールで封入し、蛍光顕微鏡 (IX73, Olympus, 東

京，日本)で観察した。

## 8) マウスへの投与

特定の病原体を含まない，週齢 (6~8 週) の雌の BALB/c マウスを日本 SLC (静岡，日本) から購入し，標準的な条件下で飼育した。マウスは麻酔薬 (0.3 mg/kg メデトミジン，4.0 mg/kg ミダゾラム，5.0 mg/kg ブトルファノール) を腹腔内投与して麻酔をかけた。ワクチン接種群の詳細を表 1-2 に示す。1 ml の注射器と 27 ゲージの注射針を用いて，100  $\mu$ g の pE2 と 12.5，25，50，100  $\mu$ g の pCD40 を含むプラスミド溶液 100  $\mu$ l を尾部の遠位 1-2 cm に皮内投与した (2 箇所各 50  $\mu$ l ずつ投与) [Pertmer et al., 1995, Raz et al., 1994]。初回免疫から 3 週間後にブースター免疫を行い，ブースター免疫の 2 週間後に採血を行い，血清中の液性免疫反応を解析した。また，同時に脾臓細胞を採取し，BVDV E2 抗原特異的細胞増殖および IFN- $\gamma$  産生を評価した。動物実験は，岩手大学動物実験倫理委員会 (番号 : A201909) によって承認を受けた。

## 9) 液性免疫の評価 (中和実験)

免疫したマウスの心臓から採血し，得られた血清を 56°C，30 分間非動化処理した。96 well plate の中に血清を 2 倍段階希釈し，200 TCID<sub>50</sub>/25  $\mu$ l を含有する等容量の BVDV-1 (Nose 株) 懸濁液と混合し，5%CO<sub>2</sub>，37°C の環境で 60 分間インキュベートした後，10<sup>5</sup> 個/well の BFM 細胞を添加した。また定法に従い，使用したウイルス液を 400 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l に調整後，10 倍段階希釈して BFM 細胞に添加し，バックタイトレーションを行った。5 日間細胞状態を観察し，Cytopathic Effect (CPE) を抑制した血清の最高希釈の逆数を中和抗体価とした。本試験は 2 つの独立した実験を行い，成績を評価した。

## 10) 血清中 IgG1 と IgG2a の測定

抗原となる E2 タンパク質は  $1\mu\text{g/ml}$  の濃度で Nunc Maxisorp 96 well immunoplates (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、 $37^{\circ}\text{C}$ 、60 分間固相化した。その後、5% スキムミルク含 PBS でブロッキング処理を行い、免疫マウス血清 (1:200)、HRP 標識抗マウス IgG1 (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology) または IgG2a (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology) 共にインキュベートした。発色反応は、1-Step Ultra TMB-ELISA

(Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて行い、Infinite 200 PRO multimode plate reader (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland) を用いて、450nm の吸光度を測定した。これらの反応は、50  $\mu\text{l}$  の総サンプル量を使用して  $37^{\circ}\text{C}$  で行った。本試験は2つの独立した実験を行い、成績を評価した。

## 11) 細胞性免疫の測定

免疫したマウスより、脾細胞を採取し、脾細胞  $10^6$  個/well に、 $10^{4.5}\text{TCID}_{50}$  の BVDV-1-NOSE を E2 特異性抗原として添加し 96 well plate で 48 時間培養後、WST-8 アッセイ (Cell Counting Kit; Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて細胞増殖能を測定した。吸光度 450nm の測定には Infinite 200 PRO multimode plate reader を用いた。

BVDV-E2 特異性抗原的 IFN- $\gamma$  の産生能については、上と同じ条件で脾細胞および BVDV-1 (Nose 株) を 72 時間培養後、培養上清を収集し実験まで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。製造業者のプロトコルに従って、上清中の IFN- $\gamma$  の濃度を、マウス IFN- $\gamma$  の ELISA キット (ThermoFisher Scientific) を用いて測定した。吸光度 450 nm は Infinite 200 PRO multimode plate reader (Tecan) にて測定した。本試験は2つの独立した実験を行い、成績を評価した。

## 12) 統計解析

中和抗体価は幾何平均として示した。E2 特異的 ELISA 抗体価，脾細胞増殖実験および INF- $\gamma$  濃度は平均値として示した。すべてのデータは，One way analysis of variance (ANOVA) ，Bonferroni の多重比較検定，または Kruskal-Wallis test 検定，Dunn の多重比較検定を用いた。統計解析は GraphPad Prism 9 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) を用い， $P < 0.05$  未満を統計的な有意差として判定した。



### 3. 結果

#### 1) pCD40 の構築

得られた CD40 配列 (870 bp) は、相同性検索の結果からマウス CD40 遺伝子 (Sequence ID: NM\_011611.2) と 100% に一致していることがわかった。プラスミドに挿入された配列の位置は予想と同じで、Snap gene viewer (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA) で作成したベクターマップを図 1-1 に示す。

#### 2) 哺乳類細胞でのタンパク質発現

pE2, pCD40 による組換えタンパク質は、BVDV E2, CD40 の特異的 mAb を使用したウエスタンブロッティングで検出された (図 1-2A)。部分的な E2 遺伝子には疎水性の膜貫通領域が含まれていないため、組換え E2 タンパク質が pE2 をトランスフェクションした 293T 細胞の培養上清中に分泌タンパク質として検出された (図 1-2B)。また、pE2, pCD40 を CHO-K1 細胞にトランスフェクションしてから、BVDV E2, CD40 の特異的 mAb を使用した免疫組織化学染色を行った (図 1-3)。これらの結果は、pE2 および pCD40 がそれぞれ動物細胞で組換え BVDV E2 および CD40 タンパク質を発現できることを示していた。

#### 3) 液性免疫

pCD40 の BVDV E2 DNA ワクチンに対する、液性免疫応答に及ぼす影響を調査するために、pE2 のみを投与したマウスと pE2 及び pCD40 とともに投与したマウスとの間でウイルス中和抗体価を比較した。Mock を除くすべてのグループで中和抗体が検出された (図 1-4A)。中和抗体価は、25 または 50  $\mu$ g の pCD40 を含む pE2 を投与されたグループにお

いて、pE2のみを投与されたグループよりも有意に高かった ( $P < 0.01$ )。BVDV E2に対する特異的 IgG1 および IgG2a 抗体価を ELISA で測定した。pE2のみを投与したマウス及び、pCD40 と pE2 を共投与したマウスとを比較した。E2 特異的 IgG1 抗体は、Mock 群を除く、すべての群で検出された (図 1-4B)。pE2のみを投与されたグループと pCD40 と pE2 を共投与されたグループの間で E2 特異的 IgG1 抗体価に有意差はなかった。同様に、pE2のみを投与されたグループと pCD40 と pE2 を共投与されたグループの間で E2 特異的 IgG2a 抗体価にも有意差はなかった (図 1-4C)。pE2のみを投与されたグループと pCD40, pE2 を共投与されたグループとの間で IgG2/IgG1 比に有意差は観察されなかった (図 1-4D)。

#### 4) BVDV 特異的脾臓細胞増殖と IFN- $\gamma$ 産生

BVDV E2 DNA ワクチンの細胞性免疫応答に対する CD40 の影響を調査するために、pE2のみを投与されたマウスと pE2 を pCD40 とともに投与されたマウスとの間で BVDV 特異的リンパ球増殖を比較した。BVDV 特異的リンパ球増殖は、Mock 群よりすべての群が有意に高かった (図 1-5A)。BVDV 特異的増殖は、25  $\mu$ g の pCD40 を含む pE2 を投与されたグループでは、pE2のみを投与されたグループよりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

BVDV 特異的 IFN- $\gamma$  産生を pE2のみを投与されたマウスと pCD40, pE2 を投与されたマウスの間でも比較した。pE2のみを投与されたグループと Mock グループの間で IFN- $\gamma$  産生に有意差はなかった。pE2のみを投与されたグループよりも 12.5  $\mu$ g の pCD40 を投与されたグループで有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (図 1-5B)。

## 4. 考 察

BVDV-DNA ワクチンに対して、CD40 の分子アジュバントとして効果を調べるために、マウス CD40 分子を発現するプラスミド (pCD40) を構築した。BVDV E2 を発現するプラスミド (pE2) と pCD40 を細胞にトランスフェクション後、ウエスタンブロットおよび免疫蛍光染色によって E2 と CD40 のタンパク質発現を確認した。BALB/c マウスへの投与試験では、pE2 単独よりも pCD40 と共投与した方が、BVDV に対して有意に高い抗体応答を誘導できた。また、抗原特異的な脾臓細胞増殖および INF- $\gamma$  産生も増強することができたことから、pE2 と pCD40 との共投与が pE2 に対する液性および細胞性免疫応答を増強することを示している。これらの結果は、以前の研究である、CD40 をコードするプラスミドが口蹄疫に対する DNA ワクチンに液性および T 細胞の免疫応答を増強することが示された報告 [Xu et al., 2010], ならびに CD40 をコードするプラスミドが 2 型ヘルパー T (Th2) サイトカインの産生と、H5N1 高病原性鳥インフルエンザに対する DNA ワクチンに抗体反応を増強する [Chen et al., 2014] という報告と一致している。以上の結果は、CD40 をコードするプラスミドの同時投与が、DNA ワクチンに対する液性および細胞性免疫応答を増強することを示唆している。

pCD40 は pE2 に対する中和抗体の産生を増強することが明らかになった。他のグループによる先行研究でも見られるように [Chen et al., 2014, Sicard et al., 2020, Xu et al., 2010], pCD40 は、投与部位の樹状細胞に CD40 を発現させ、抗原提示時に樹状細胞やヘルパー T 細胞の CD40/CD40L シグナル伝達経路の活性化を促進させたと考えられる。また、pCD40 は B 細胞上の CD40 に結合するアゴニスト的な抗 CD40 抗体を誘導していると思われた。

今回の研究では、pCD40 のアジュバント効果に用量依存性は認められなかった。例えば、最高用量 (100  $\mu$ g) の pCD40 はいずれも pE2 に対する免疫反応を増強せず、25 ま

たは 50  $\mu$ g の pCD40 で最大の中和抗体を誘導した。pCD40 の最大用量がなぜ最大の免疫応答を誘導できなかったかは不明である。予備的な *in vitro* 実験では、100  $\mu$ g の pE2 と 100  $\mu$ g の pCD40 を共導入した 293T 細胞の培養上清における E2 タンパク質の発現は、100  $\mu$ g の pE2 を単独で導入した 293T 細胞の培養上清における発現より低かった（データ未提示）。このことから、過剰量の pCD40 の共投与は、*in vivo* において pE2 からの E2 発現を競合的に減少させた可能性がある。また、プラスミドの過剰投与が外来遺伝子の発現量を低下させるというこれまでの報告と同様に、pCD40 の過剰投与が CD40 の発現を妨げた可能性もある [Gómez-Chiarri et al., 1996, Schulte et al., 1998]。今後、DNA ワクチンの分子アジュバントとして使用する pCD40 の最適な用量は、対象となる動物種で検討する必要がある。

本研究で作製した分泌型 BVDV E2 タンパク質をコードする pE2 を皮内投与すると、IgG1 抗体反応が誘導され、pCD40 を同時投与しても IgG2a : IgG1 比に大きな変化はなかった。一方、他のグループの先行研究においては、BVDV E2 の分泌型をコードするプラスミドを筋肉内に投与すると優位に IgG2a 抗体反応が誘導された [Nobiron et al., 2000, Nobiron et al., 2001]。この明らかな不一致の理由は不明である。DNA ワクチンがコードする抗原の細胞局在は Th1/Th2 バイアスに影響することが知られており、分泌抗原をコードするプラスミドの投与は IgG1 応答を誘発し、細胞質抗原をコードするプラスミドの投与は IgG2a 応答を誘発する [Haddad et al., 1998, Rush et al., 2002]。また、DNA ワクチンの投与経路も Th1/Th2 バイアスに影響する。DNA ワクチンの皮内投与は IgG1 反応を誘発するのに対し、筋肉内投与は IgG2a 反応を誘導する [McCluskie et al., 1999, Pertmer et al., 1996]。したがって、本研究において分泌型 E2 タンパク質をコードする pE2 を皮内投与することにより IgG1 抗体が多く誘導されたことは、これらの先行研究の結果と一致している。

## 5. 結 論

この研究で提示された結果は、CD40 をコードするプラスミドの同時投与が BVDV-E2 タンパク質をコードする DNA ワクチンに対して、液性および細胞性免疫応答を増強することを示している。さらに、このプラスミドが、BVDV だけでなく、他の感染症、癌の治療、アレルギー、自己免疫などのさまざまな用途に対する DNA ワクチンの弱い免疫原性の欠点を補う可能性があることを示唆している。

表 1-1 pCD40 プラスミド構築に使用したプライマー

| プライマー        | 配列                                                   |
|--------------|------------------------------------------------------|
| E2_F_ApaI+E1 | 5' -GTGGGCC <u>CC</u> ACCATGGTACAGGGCATCCTATGGCTA-3' |
| E2_R_KpnI+E2 | 5' -ACGGTACCTCAAGCGAAGTAATCCCGGT-3'                  |
| mCD40F_ApaI  | 5' -GTAGGGCC <u>CC</u> CGATGGTGTCTTTGCCTCGGCTGTG-3'  |
| mCD40R_XbaI  | 5' -GCTCTAGAGCTCAGACCAGGGGCCTCAAGG-3'                |

下線は制限酵素サイト

表 1-2 DNA プラスミド投与量とマウス群

| グループ               | 投与量 ( $\mu$ g) |     |       | マウス頭数 |
|--------------------|----------------|-----|-------|-------|
|                    | 抗原なし           | pE2 | pCD40 |       |
| Mock               | 100            | -   | -     | 5     |
| pE2                | -              | 100 | -     | 6     |
| 12.5 $\mu$ g pCD40 | -              | 100 | 12.5  | 4     |
| 25 $\mu$ g pCD40   | -              | 100 | 25    | 5     |
| 50 $\mu$ g pCD40   | -              | 100 | 50    | 5     |
| 100 $\mu$ g pCD40  | -              | 100 | 100   | 5     |

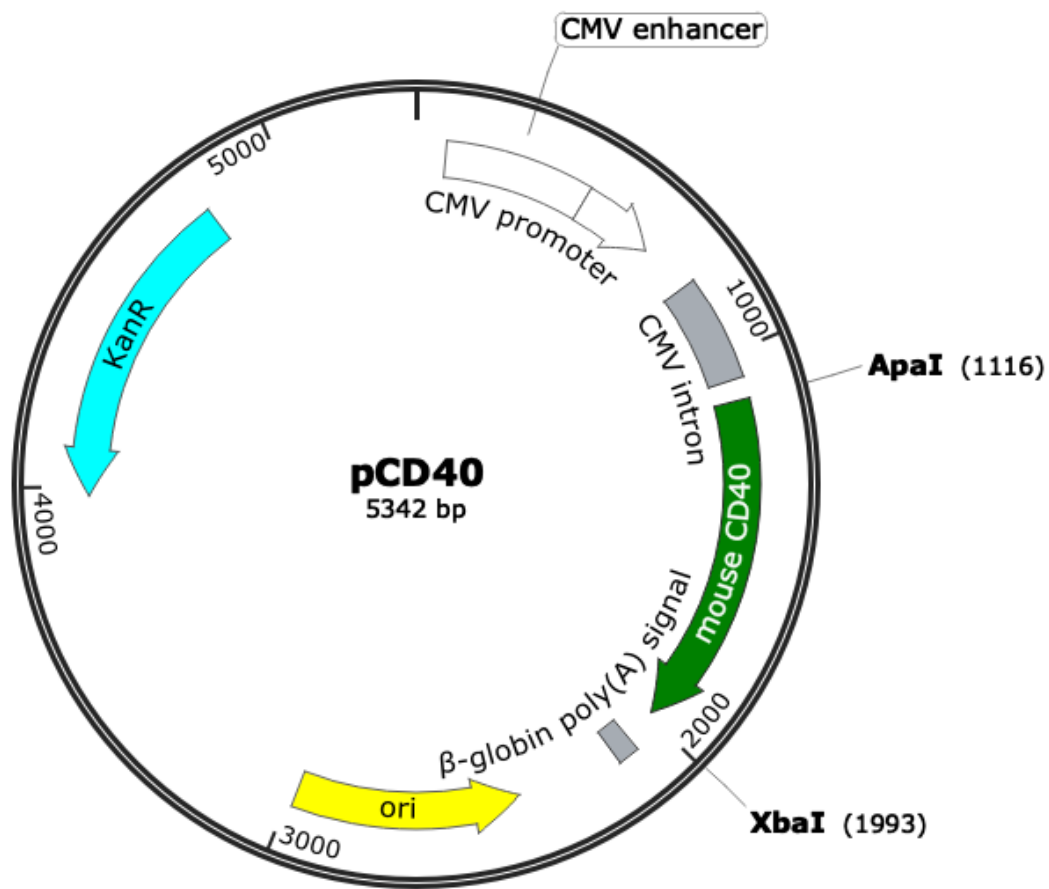


図 1-1 構築した pCD40 の遺伝子ベクターMAP



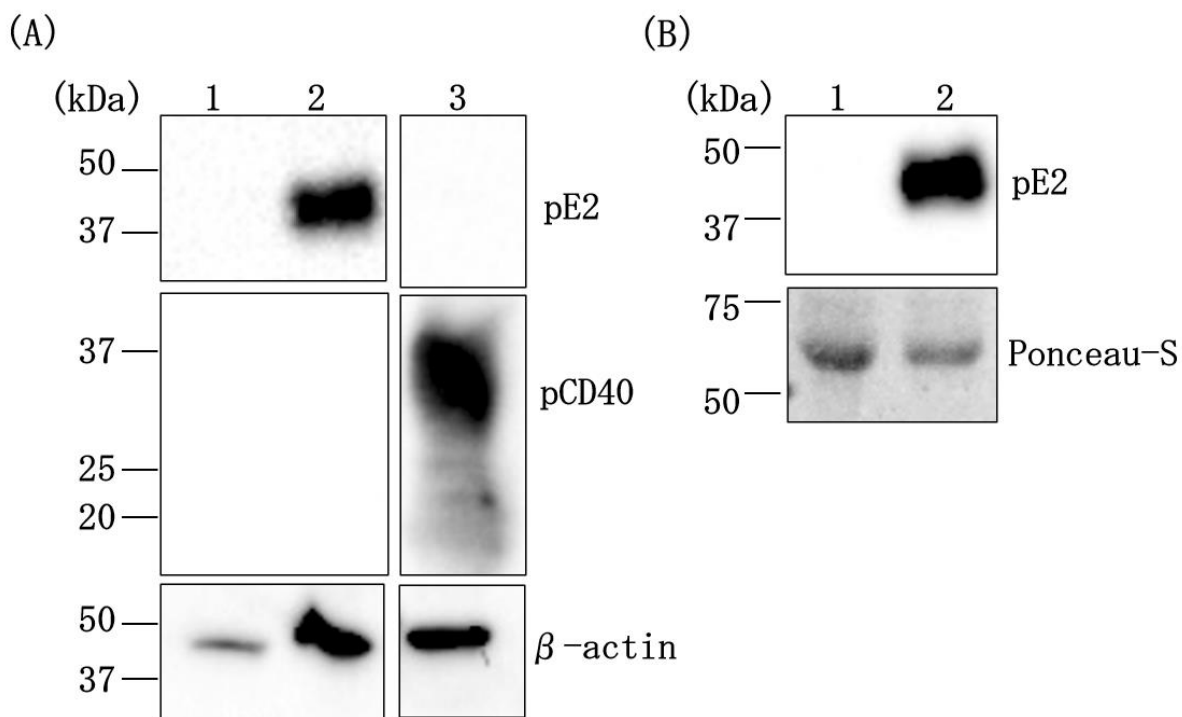


図 1-2 ウェスタンブロットでの E2 と CD40 タンパク質発現

HEK-293T 細胞に pE2 (A) , pCD40 (B) をトランスフェクションし, タンパク質発現をウェスタンブロット分析した。(A) 細胞溶解物 (約  $10 \mu\text{g}/\text{Lane}$ ) を還元条件下, 10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを抗 E2 ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) , 抗 CD40 ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) および抗  $\beta$ -アクチン ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) とともにインキュベートした。(B) 培養細胞上清 ( $5 \mu\text{l}/\text{Lane}$ ) を還元条件下, 10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, PVDF メンブレンに転写した。1 : HEK-293T-pUMVC4a (空のベクター) ; 2 : HEK-293T-pE2; 3 : HEK-293T-pCD40。

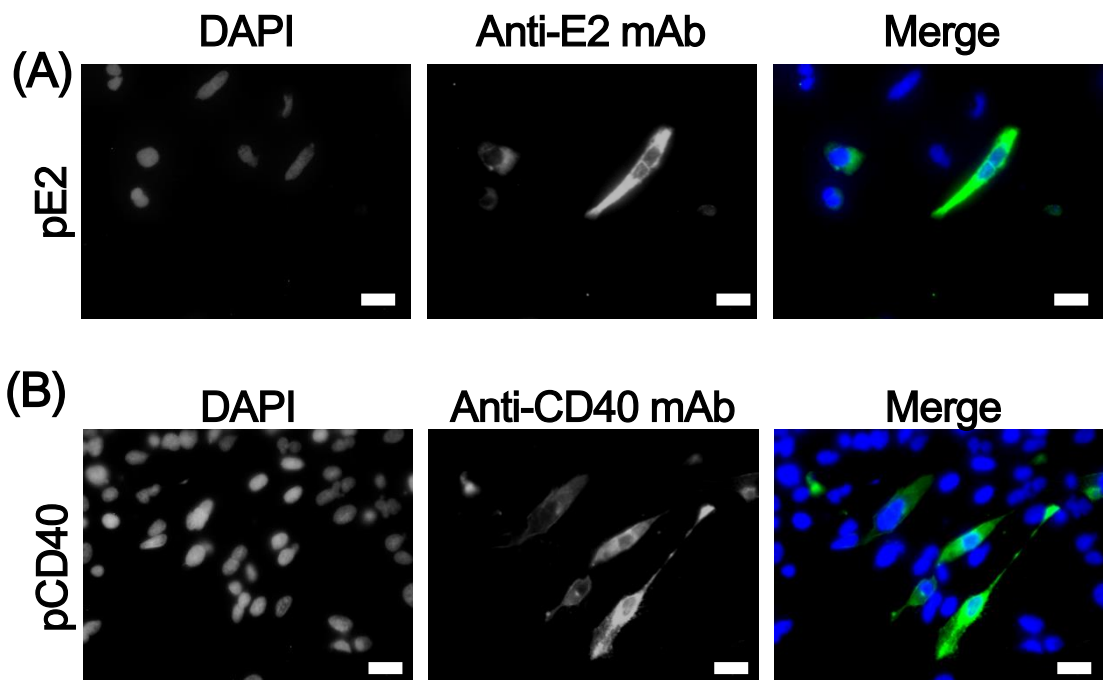


図 1-3 免疫細胞化学染色による E2 と CD40 タンパク質発現

CHO-K1 細胞に pE2 (A) , pCD40 (B) をトランスフェクションし, 抗 E2 (1  $\mu$ g/ml) , 抗 CD40 (1  $\mu$ g/ml) および FITC 結合二次抗体を使用して免疫染色した。核は DAPI で染色した。Scale bar, 20  $\mu$ m。

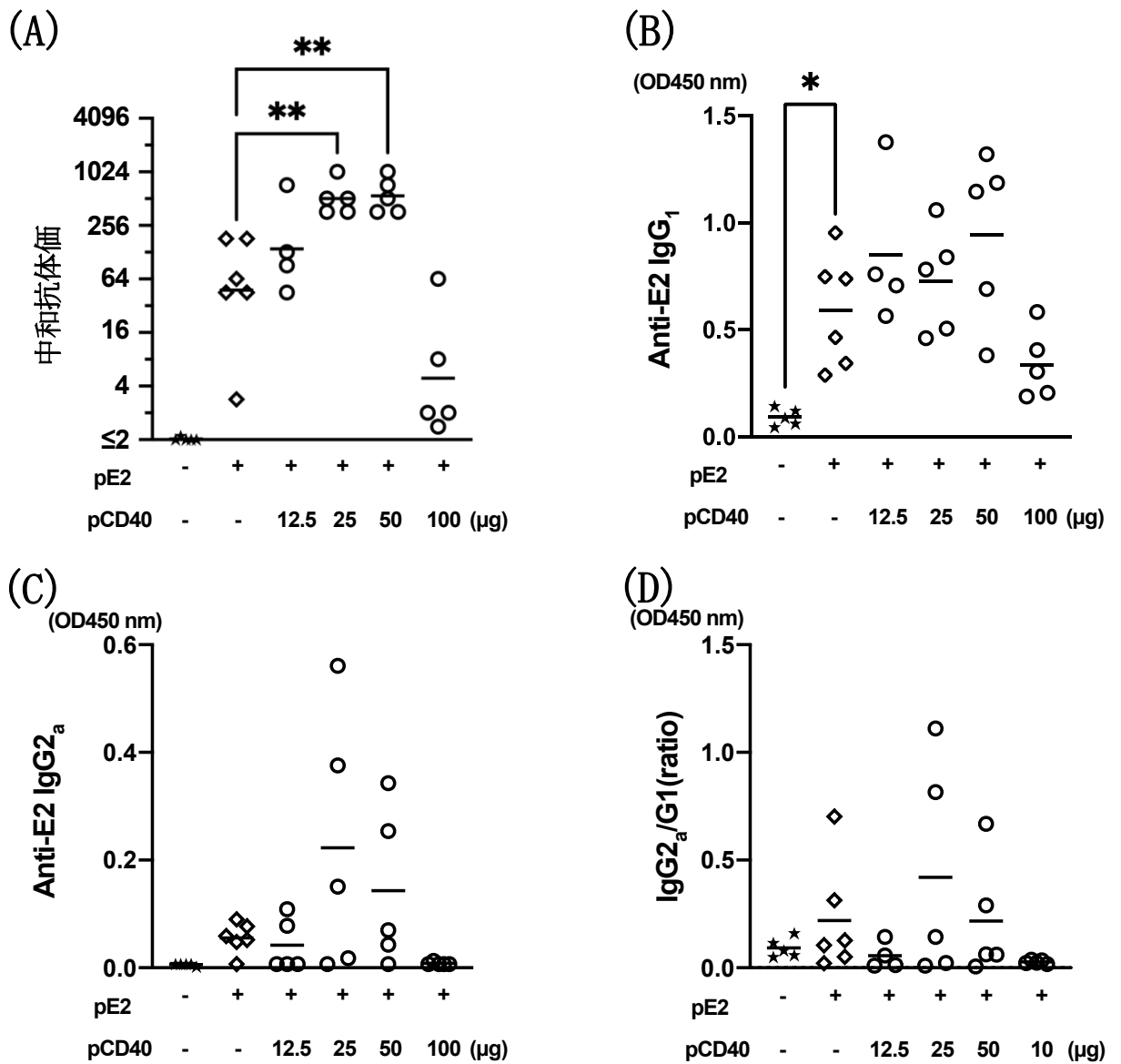


図 1-4 液性免疫

BVDV E2 DNA ワクチンは液性免疫応答に対する pCD40 のアジュバント効果。BALB/c マウスは、プラスミド 3 週間間隔で 2 回皮内免疫された。(A) ウイルス中和抗体価。横棒は幾何平均値を示す。(B) 抗 E2IgG1 力価。横棒は平均値を示す。(C) 抗 E2IgG2a 力価。横棒は平均値を示す。(D) IgG1/Ig2a の比。横棒は平均値を示す。全部のデータは、2 つの独立した実験に行いた。グループ間の差異は、One way analysis of variance (ANOVA) と、それに続く Bonferroni の多重比較検定し、 $P < 0.05$  (\*) および  $P < 0.01$  (\*\*) によって評価された。★: pUMVC4a; ◇: pE2; ○: pE2 と pCD40。

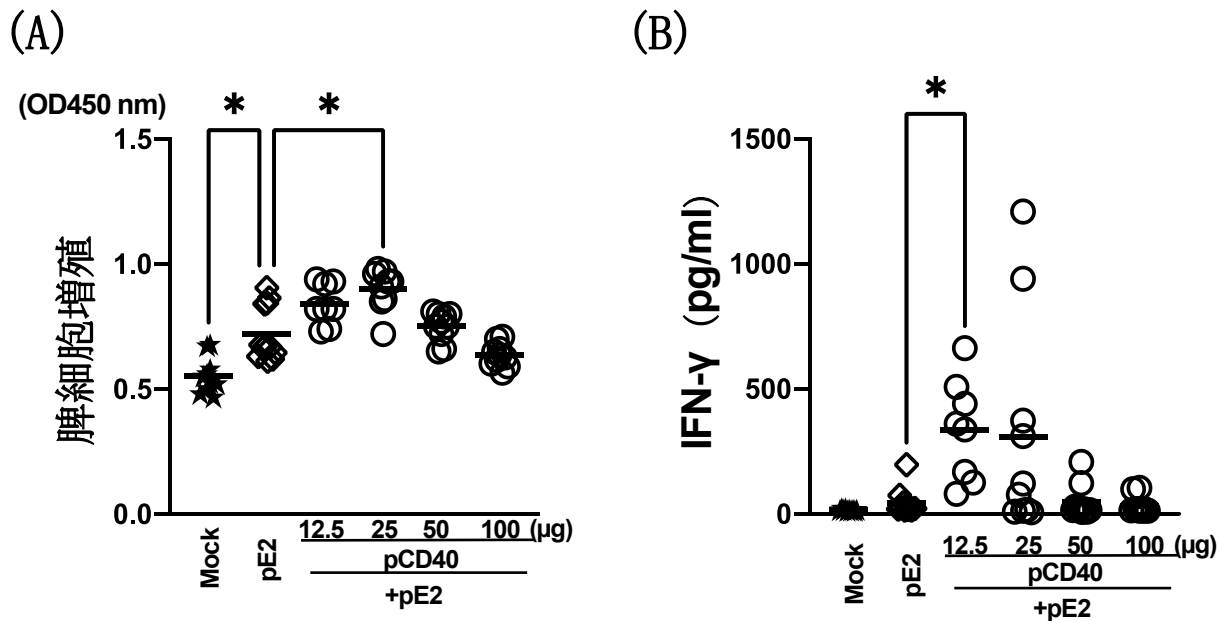


図 1-5 脾臓細胞増殖と INF- $\gamma$  の産生

BVDV E2 ワクチンは細胞性免疫応答に対する pCD40 のアジュバント効果。BALB/c マウスは、pCD40 または pE2 で 3 週間間隔に 2 回皮内免疫された。(A) BVDV 特異的リンパ球増殖。脾細胞を BVDV で 48 時間刺激した。WST-8 を添加し、450nm での吸光度を測定した。横棒は平均値を示す。(B) BVDV 特異的インターフェロン (IFN) - $\gamma$  産生。脾細胞を BVDV で 72 時間刺激した。細胞培養上清中の IFN- $\gamma$  を ELISA で測定した。横棒は平均値を示す。(A) と (B) のデータは、2 つの独立した実験を行いて、グループ間の差異は、Kruskal-Wallis 検定とそれに続く Dunn の多重比較検定。P < 0.05 (\*) によって評価された。★ : pUMVC4a; ◇ : pE2; ○ : pE2 と pCD40。

## 第二章

牛ウイルス性下痢ウイルス E2 抗原を有する DNA ワクチンベクターおよび CD63 発現ベクターの共投与における免疫誘導能の検討

## 1. 緒言

CD63はLysosome-associated membrane glycoprotein 3 (LAMP3)とも呼ばれ、テトラスパンファミリー (TM4SF) のメンバーである。ファミリーの多くは4つの疎水性ドメインが特徴の細胞表面タンパク質で、細胞の発生、活性化、分化や運動性を制御するシグナル伝達を仲介する。CD63は細胞表面にある糖タンパク質であり、インテグリンと複合体を形成し、単球/マクロファージやT細胞の細胞膜において発現して、抗原提示に関与する [Engering et al., 2003, Metzelaar et al., 1991, Petersen et al., 2011], CD63は、その活性化によって、持続的かつ効率的にT細胞の活性化と増殖が促進することから [Pfistershammer et al., 2004], Ovalbumin (OVA) -CD63融合タンパク質をコードするプラスミドは、投与部位にOVAを含む細胞外小胞を生成し、樹状細胞にOVAを効率的に送達する。その結果、OVA-CD63融合タンパク質をコードするプラスミドの投与により、OVAに対する細胞性免疫応答が増強された [Kanuma et al., 2017]。一方でCD63はDNAワクチンの分子アジュバントとして効果不明であるから、期待されている。

第2章ではCD63分子をコードする発現プラスミドを構築し、第1章で構築したpE2との同時接種により、マウスモデルにおいて免疫応答を増強するかについて検討した。

## 2. 材料と方法

### 1) pCD63 DNA プラスミドの構築

マウス CD63 をコードするプラスミド (pCD63) の構築のために, TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて, BALB/c マウスの腎臓から total RNA を抽出した。mRNA の逆転写には PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いた。T100 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) で 37°C 15 分, 85°C 5 秒でインキュベートするより cDNA を合成した。

マウス CD63 遺伝子のコード配列は, 特定のプライマーセットを用いて PCR により増幅した。プライマー配列は, 表 2-1 に示す通りである (制限酵素部位には下線を付した)。反応混合物は, 40ng/1  $\mu$ l の cDNA, 10  $\mu$ M のフォワードおよびリバースプライマー各 1  $\mu$ l, KOD One (Toyobo, Osaka, Japan) 5  $\mu$ l, 滅菌超純水 2  $\mu$ l から構成された。増幅は以下の条件で行った: 94°C で 2 分間の初期変性, 98°C で 10 秒間の変性, 55°C で 5 秒間のアニーリング, 68°C で 25 秒間の伸長を 30 サイクル行った。

増幅された各 DNA 断片を酵素消化し, pUMVC4a 発現ベクター (Aldevron, South Fargo, ND, USA) に挿入して, pCD63 を得た。プラスミドの DNA 配列は, 3500 Genetic Analyzer により確認した。

プラスミドは大腸菌 DH5  $\alpha$  細胞で増幅し, GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いて製造者の指示に従い精製した。プラスミドを滅菌超純水で溶出し, 3  $\mu$ g/ $\mu$ l の濃度に希釈した。

### 2) マウス CD63 タンパク質の発現確認

ウエスタンブロット: 第一章の材料と方法に従い, 構築した pCD63 プラスミドの動物

細胞内での CD63 の発現を確認するために、pUMVC4a と pCD63 を HEK-293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞ライセートと培養上清を採取し、ウエスタンブロットで検査した。1 次抗体は  $0.1 \mu\text{g/ml}$  の anti-CD63 mAb (clone: R5G2, MBL, Nagoya, Japan), または  $0.1 \mu\text{g/ml}$  の anti- $\beta$ -actin 抗体 (clone AC-15; Sigma-Aldrich), 第一抗体希釈液 (Can get signal Immunoreaction Enhancer Solution I, Toyobo) で希釈し、 $4^{\circ}\text{C}$  で overnight 反応した。2 次抗体は peroxidase-conjugated anti-rat IgG 及び anti-mouse IgG (1:10,000 比例で希釈; Jackson ImmunoResearch) を第二抗体希釈液, (Can get signal Immunoreaction Enhancer Solution II, Toyobo) で希釈し、室温で 1 時間反応した。

**免疫組織化学染色：**第一章の材料と方法に従い、プラスミド pCD63 は、Polyethylenimine Max を使用して CHO-K1 細胞に Transfection された。1 次抗体は  $1 \mu\text{g/ml}$  の anti-CD63 mAb (clone R5G2, MBL, Nagoya, Japan), 2 次抗体は FITC-conjugated anti-mouse IgG (1:200; Jackson ImmunoResarch) を用いた。

### 3) マウスへの投与

第一章の材料と方法に従い、pE2 と pCD63 それぞれを BALB/c マウス (雌, 6~8 週齢, 熊谷重安商店 日本) の尾部の遠位 1-2 cm に皮内投与した (表 2-2)。最初の免疫から 3 週間後に同じ用量での 2 回目の免疫を行い、さらに 2 週間後に血液と脾臓を採取した。この研究で使用されたすべての手順と動物は、岩手大学の動物管理使用委員会 (番号: A201909) によって承認された。

### 4) 液性免疫の評価 (中和実験), 血清中の IgG1 と IgG2a の計測及び細胞免疫

第一章の材料と方法に従った。



## 5) 統計解析

第一章の材料と方法に従った。

### 3. 結果

#### 1) pCD63 の構築

得られた CD63 配列 (717 bp) は、NCBI に対比 (BLAST) し、マウス CD63 遺伝子 (Sequence ID: XM\_030244852.1) と 100% に一致していることがわかった。プラスミドに挿入された配列の位置は予想と同じで、Snap gene viewer (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA) で作成したベクターマップを図 2-1 に示す。

#### 2) 哺乳類細胞での遺伝子組換え CD63 蛋白質の発現確認

pCD63 による組換えタンパク質は、CD63 の特異的 mAb を使用したウエスタンブロッティングで検出された (図 2-2)。また、pCD63 による組換えタンパク質は、CHO-K1 細胞にトランスフェクションしてから、CD63 の特異的 mAb を使用した免疫組織化学染色を行った (図 2-3)。これらの結果は、pCD63 が動物細胞で組換え CD63 タンパク質を発現できることを示した。

#### 3) 液性免疫

pCD63 が BVDV E2 DNA ワクチンに対する液性免疫応答に及ぼす影響を調べるために、pE2 のみを投与されたマウスと pE2 及び pCD63 とともに投与されたマウスのウイルス中和抗体価を比較した。Mock 群を除くすべてのグループで中和抗体が検出された (図 2-4A)。pCD63 および pE2 を共投与したグループと pE2 のみを投与したグループの比較では、中和抗体価に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。BVDV E2 に対する特異的 IgG1 および IgG2a 抗体価を ELISA で測定した。pE2 のみを投与したマウス及び、pCD63 と pE2 を共投与したマウスとを比較した。E2 特異的 IgG1 抗体は、Mock 群を除く、すべ

ての群で検出された (図 2-4B)。pE2 のみを投与されたグループと pCD63 と pE2 を共投与されたグループの間で E2 特異的 IgG1 抗体価に有意差はなかった。一方, 12.5  $\mu$ g の pCD63 と pE2 を共投与されたグループは pE2 のみを投与されたグループより, E2 特異的 IgG2a 抗体価が有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (図 2-4C)。pE2 のみを投与されたグループと pCD63 と pE2 を共投与されたグループとの間で IgG2/IgG1 比に有意差は観察されなかった (図 2-4D)。

#### 4) BVDV 特異的脾臓細胞増殖と IFN- $\gamma$ 産生

BVDV E2 DNA ワクチンに対する細胞性免疫応答に対する CD63 の影響を調査するために, pE2 のみを投与されたマウスと pE2 を pCD63 とともに投与されたマウスとの間で BVDV 特異的リンパ球増殖を比較した。BVDV 特異的リンパ球増殖は, Mock 群よりすべての群が有意に高かった (図 2-5A)。BVDV 特異的増殖は, 25  $\mu$ g の pCD63 と pE2 を共投与されたグループでは, pE2 のみを投与されたグループよりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

BVDV 特異的 IFN- $\gamma$  産生を, pE2 のみを投与されたマウスと pCD63 と pE2 を共投与されたマウスの間でも比較した。pE2 のみを投与されたグループと Mock グループの間で IFN- $\gamma$  産生に有意差はなかった。pE2 のみを投与されたグループよりも 25  $\mu$ g の pCD63 と pE2 を共投与されたグループで有意に高かった ( $P < 0.01$ ) (図 2-5B)。

## 4. 考 察

CD63 が BVDV-DNA ワクチンの分子アジュバントとして応用可能かについて検討した。まずマウス CD63 を発現するプラスミド (pCD63) を構築し、培養細胞株にトランスフェクションし、ウエスタンブロットおよび免疫蛍光染色によって CD63 タンパク質の発現確認を行った。次に pE2 および pCD63 を BALB/c マウスに単独ならびに共投与し免疫応答を調べた。その結果、pCD63 および pE2 との共投与では、pE2 単独投与よりも BVDV に対して有意に高い中和抗体応答を誘導することは出来なかったが、pE2 単独よりも BVDV に対する有意に高いリンパ球増殖と IFN- $\gamma$  産生を誘導した。以上のことから、pE2 と pCD63 の同時投与では BVDV E2 に対する細胞性免疫を増強することが明らかになった。

本研究の結果は、CD63 を発現するプラスミドは、OVA をコードするプラスミドと共投与しても OVA に対する細胞性免疫応答を増加させることができなかった以前の研究結果とは一致しないものであった [Kanuma et al., 2017]。この明らかな相違の理由は不明であるが、抗原 (BVDV E2 または OVA) , プラスミド (pUMVC4a または pC1, ただしどちらも同じサイトメガロウイルスプロモーターを使用) , プラスミドの投与量, 投与経路 (皮内または筋肉内) , マウス系統 (BALB/c または C57BL/Cj) またはその他の実験条件の違いを反映していると思われる。今後 CD63 をコードするプラスミドの共投与が BVD DNA ワクチンに対する液性免疫応答を増強するかどうかを明らかにするために、さらなる研究が必要である。

pCD63 のアジュバント効果に CD40 の時と同様に用量依存性は認められなかった。pCD63 の最大用量がなぜ最大の免疫応答を誘導できなかったかは不明であるが、予備的な *in vitro* 実験では、100  $\mu$ g の pE2 と 100  $\mu$ g の pCD63 を共導入した 293T 細胞の培養上清における E2 タンパク質の発現は、pE2 を単独で導入した 293T 細胞の培養上清における発現より低かった (データ未提示) 。このことから、過剰量の pCD63 の共投与は、

CD40 と同様に *in vivo* で pE2 からの E2 発現を競合的に減少させた可能性があると考えられた [Gómez-Chiarri et al., 1996, Schulte et al., 1998]。

第 1 章における CD40 と同様に CD63 においても DNA ワクチンの分子アジュバントとして使用するための最適な用量は、対象となる動物種で詳細に決定する必要がある。

## 5. 結 論

本研究において CD63 を発現するプラスミドは BVDV E2 タンパク質をコードする DNA ワクチンとの共投与において、細胞性免疫応答を増強することを明らかにした。したがって、BVD ワクチンにおいては、細胞性免疫を惹起出来ない不活化ワクチン等との共投与により、液性免疫だけでなく、細胞性免疫も向上させる可能性が示された。

表 2-1 pCD63 プラスミド 構築に使用したプライマー

---

| プライマー        | 配列                                         |
|--------------|--------------------------------------------|
| mCD63F_EcoRI | 5' -GCGGAATTCACCACCATGGCGGTGGAAGGAGGAAT-3' |
| CD63R_ApaI   | 5' -ATGGGGCCCCCCTACATTACTTCATAGCCAC-3'     |

---

下線は制限酵素サイト

表 2-2 DNA プラスミド投与量とマウス群

| 投与グループ             | 投与量( $\mu$ g) |     |       | マウス匹数 |
|--------------------|---------------|-----|-------|-------|
|                    | 抗原なし          | pE2 | pCD63 |       |
| Mock               | 100           | -   | -     | 5     |
| pE2                | -             | 100 | -     | 6     |
| 12.5 $\mu$ g pCD63 | -             | 100 | 12.5  | 5     |
| 25 $\mu$ g pCD63   | -             | 100 | 25    | 5     |
| 50 $\mu$ g pCD63   | -             | 100 | 50    | 5     |
| 100 $\mu$ g pCD63  | -             | 100 | 100   | 5     |



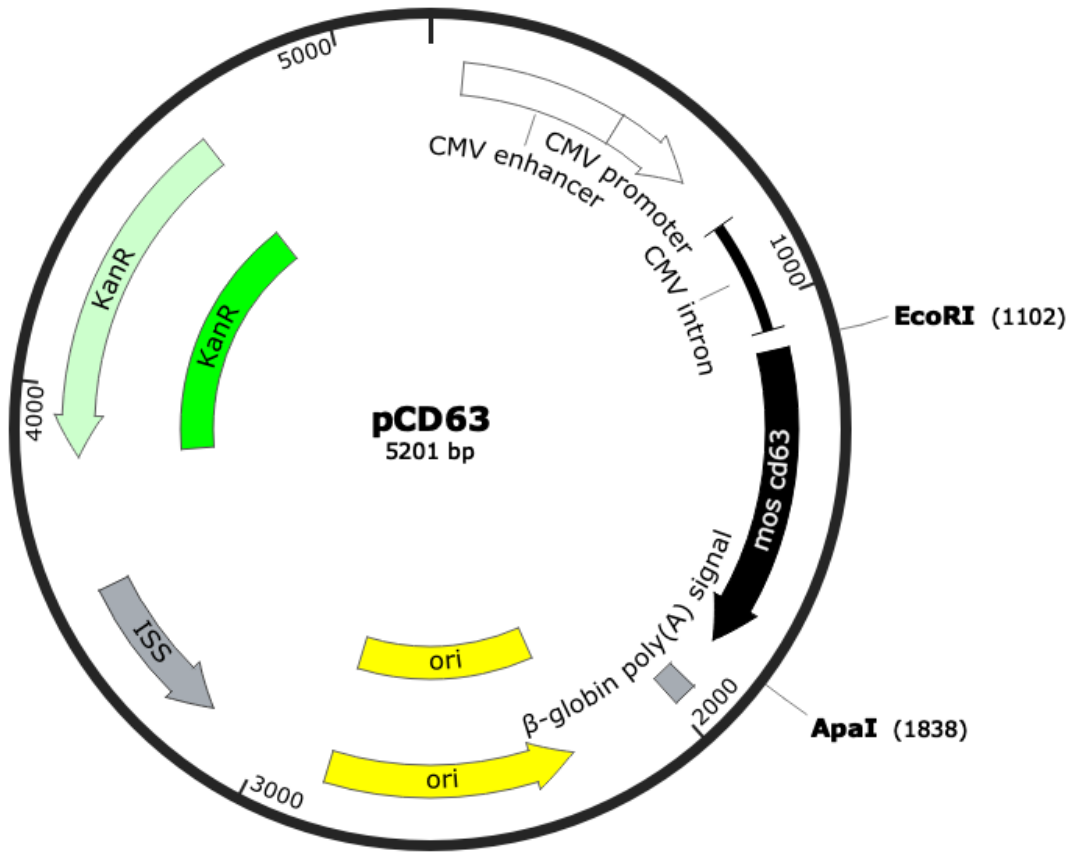


图 2-1 pCD63 向量 MAP

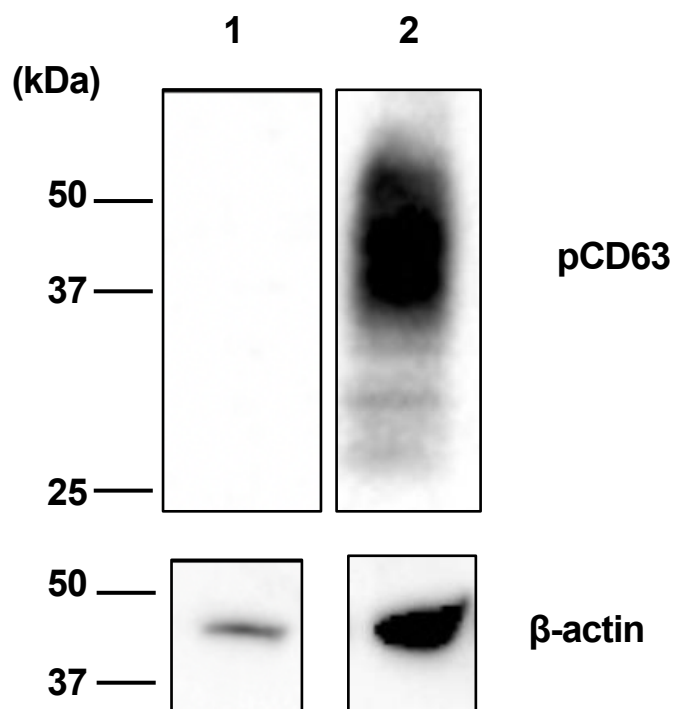


図 2-2 ウェスタンブロットでの CD63 タンパク質発現

HEK-293T 細胞に pCD63 をトランスフェクションし、タンパク質発現をウェスタンブロット解析した。細胞溶解物 (約  $10 \mu\text{g}/\text{Lane}$ ) を還元条件下、10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを抗 CD63 ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) および抗  $\beta$ -アクチン ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) とともにインキュベートした。1 : HEK-293T-pUMVC4a (空のベクター) ; 2 : HEK-293T-pCD63。

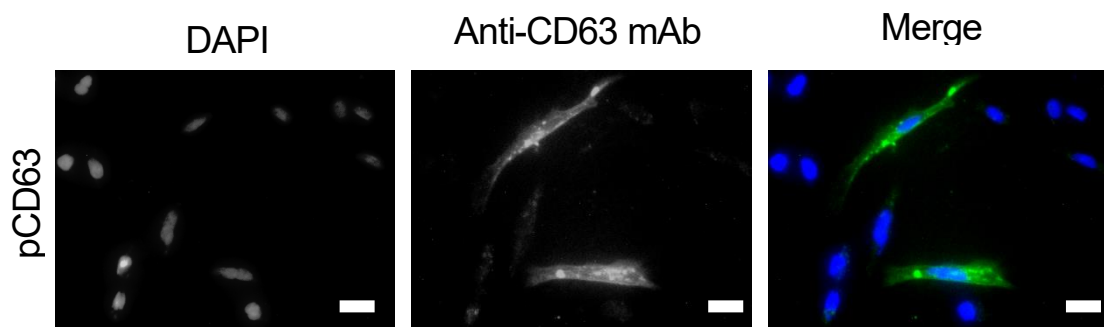


図 2-3 免疫細胞化学染色による CD63 タンパク質発現

CHO-K1 細胞に pCD63 をトランスフェクションし、抗 CD63 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) および FITC 結合二次抗体を用いて染色した。核は DAPI で染色した。Scale bar,  $20 \mu\text{m}$ 。

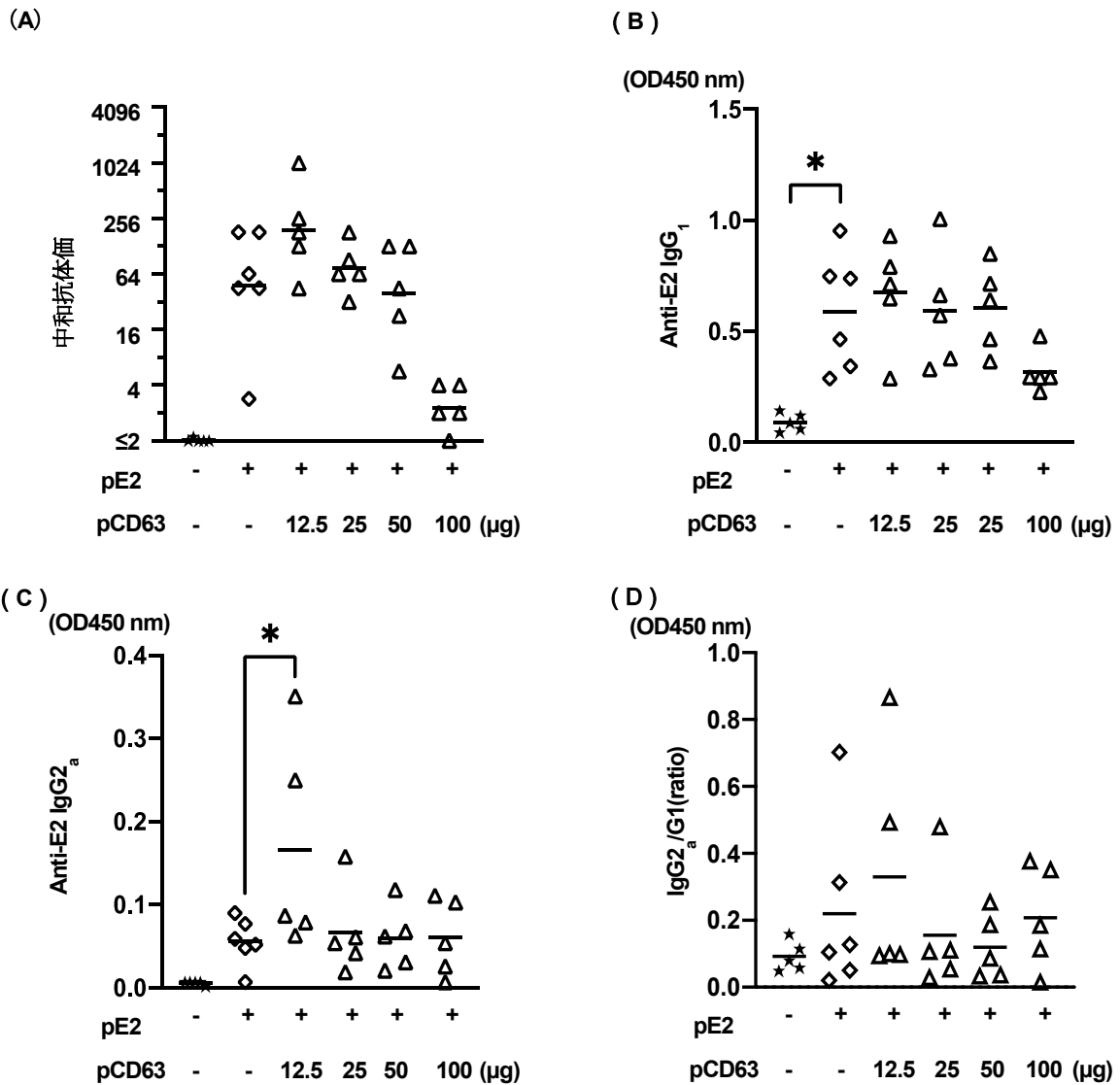


図 2-4 液性免疫

BVDV-E2 DNA ワクチンに対する液性免疫応答に対する pCD63 のアジュバント効果。BALB/c マウスは、プラスミドは 3 週間間隔で 2 回皮内免疫された。(A) ウイルス中和抗体価。横棒は幾何平均値を示す。(B) 抗 E2IgG1 力価。横棒は平均値を示す。(C) 抗 E2IgG2a 力価。横棒は平均値を示す。(D) IgG1/IgG2a の比。横棒は平均値を示す。2 つの独立した実験のデータをまとめた。グループ間の差異は、One way analysis of variance (ANOVA) と、それに続く Bonferroni の多重比較検定し、 $P < 0.05$  (\*) によって評価された。

★ : pUMVC4a; ◇ : pE2; △ : pE2 と pCD63。

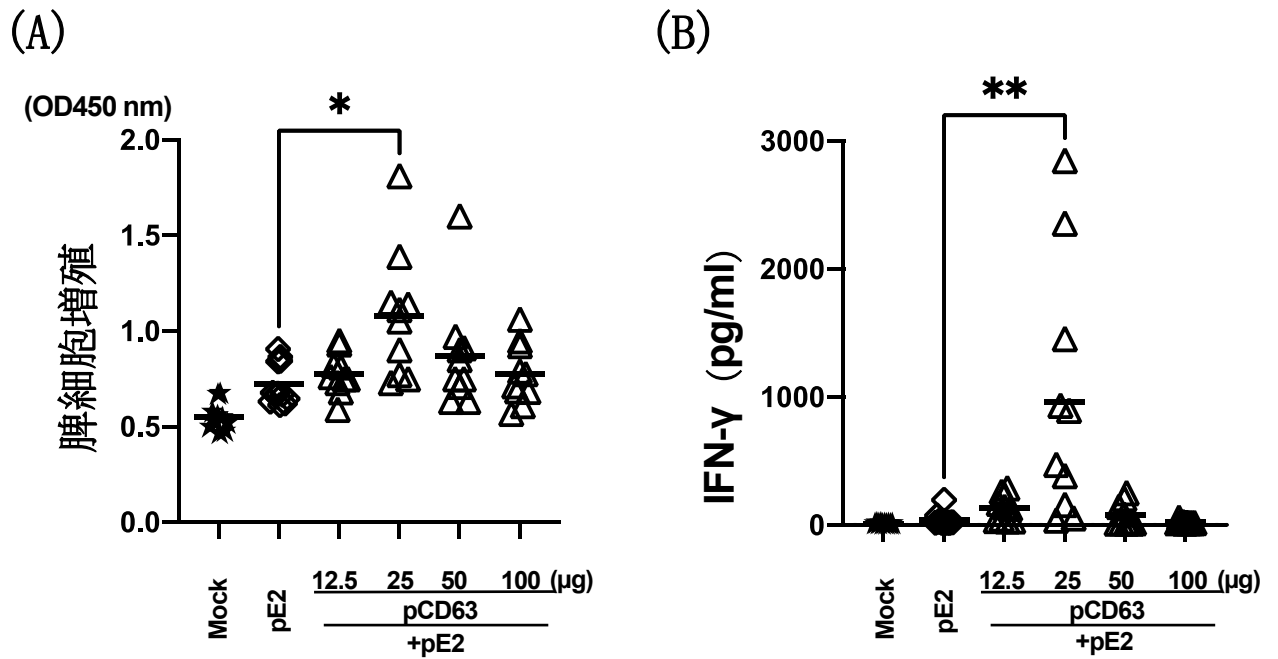


図 2-5 脾臓細胞増殖と IFN- $\gamma$

BVDVE2 ワクチンに対する細胞性免疫応答に対する pCD63 のアジュバント効果。BALB/c マウスは、pCD63 または pE2 で 3 週間間隔に 2 回皮内免疫された。(A) BVDV 特異的リンパ球増殖。脾細胞を BVDV で 48 時間刺激した。WST-8 を添加し、450nm での吸光度を測定した。横棒は平均値を示す。(B) BVDV 特異的 IFN- $\gamma$  産生。脾細胞を BVDV で 72 時間刺激した。細胞培養上清中の IFN- $\gamma$  を ELISA で測定した。横棒は平均値を示す。(A) と (B) のデータは、2 つの独立した実験を行い、グループ間の差異は、Kruskal-Wallis 検定とそれに続く Dunn の多重比較検定。P<0.05 (\*) 及び P<0.01 (\*\*) によって評価された。★: pUMVC4a; ◇: pE2; △: pE2 と pCD63。

## 総 括

牛ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) は、世界中の畜産業に多大な経済的損失を与えている。現在、市販されている BVDV ワクチンにはいくつかの欠点があるため、新しいワクチンを開発する必要がある。BVDV の主免疫抗原である E2 タンパク質をコードするプラスミドは、BVDV に対する DNA ワクチンの候補であるが、DNA ワクチン単体としてはその免疫原性は不十分である。本研究では、CD40 または CD63 を発現するプラスミドについて、それぞれ BVDV E2 DNA ワクチンに対する免疫反応に及ぼす分子免疫アジュバントとしての有用性についてマウスを用いて検討した。

第 1 章では、BVDV E2 タンパク質を発現する pUMVC4a ベースのプラスミド (pE2) およびマウス CD40 を発現するプラスミド (pCD40) を構築した。各プラスミドによるタンパク質の発現は、ウェスタンブロットおよび培養細胞株の免疫蛍光染色により確認した。pCD40 を共投与した pE2 は pE2 単独より有意に高い BVDV 中和抗体価を示した。さらに、pCD40 を共投与した pE2 は、pE2 単独と比較して、BVDV に対するリンパ球の増殖および IFN- $\gamma$  の産生を有意に増加させた。

第 2 章では、マウス CD63 を発現するプラスミド (pCD63) を構築した。プラスミドによるタンパク質の発現は、第一章と同様の方法で確認した。pCD63 を共投与した pE2 は pE2 単独より有意に高い抗 E2 IgG2a 抗体価を示した。さらに、pCD63 を共投与した pE2 は、E2 単独と比較して、BVDV に対するリンパ球の増殖および IFN- $\gamma$  の産生を有意に増加させることが明らかになった。

本研究では、BVDV-E2 抗原を有する DNA ベクターとその免疫効果を増強させるための最適な分子アジュバントとして CD40 と CD63 分子に着目して、それらの効果を明らかにする目的でマウスモデルを用いて研究を実施した。その結果、pCD40 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，また CD63 は細胞性免疫を増強する分子アジュバントとして有用である成績がえられた。これらの作用機序については，本研究では明らかに出来なかったことから，今後の分子レベルでの研究が待たれる。

最後に，本研究は未だマウスレベルであることから，本研究で開発した DNA ベクターが本来の宿主である牛に適用できるか，また DNA の投与量，投与経路などについても，今後の研究が必要である。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から，今後の分子アジュバントの研究展開が期待される。

## 謝 辞

本学位論文ができあがるまでの道程を振り返ってみると、改めて私を支えてくれた人々のことを思い出す。

本論文の執筆において、数多くの人々の手助けがなければ完成できなかったと思う。まず何よりも、私の主指導教員である岩手大学大学院 獣医学研究科 村上 賢二教授に深く感謝しなければならない。また、学位論文の執筆にあたり、ご指導・ご校閲を賜りました岩手大学大学院 獣医学研究科 寺嶋 淳 教授，東京農工大学農学研究院 動物生命科学部門 大森 啓太郎 准教授，岩手大学大学院 獣医学研究科 木崎 景一郎 教授，帝京科学大学 生命環境学部 彦野 弘一 教授に深謝したい。

本研究の遂行にあたり多大な実験指導をいただいた岩手大学大学院獣医学研究科 山田 慎二 准教授，基礎から実験の指導をいただいた元 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 内藤 郁慶 氏（現・北海道立総合研究機構 畜産試験場）に感謝したい。岩手大学大学院獣医学研究科 千葉 優介 氏の先行研究は大変貴重なものであり大いに参考にさせていただいた。また本研究にご協力いただいた全ての学生諸氏にお礼を申し上げます。

最後にいつも私を支えてくれた家族に感謝の念を捧げたい。



## 谢 辞

回顾本篇论文的历程，我非常感谢支持我的老师和同学们。若没有大家的帮助，我很难走到今日。首先，我必须向我的恩师，岩手大学兽医研究生院村上賢二教授表示最深切的感激。我还要对岩手大学兽医研究生院的寺岛淳教授、东京农工大学农学部动物生命科学系的大森啓太郎副教授、岩手大学兽医研究生院的木崎景一郎教授和帝京科学大学生命与环境科学系的彦野弘一教授在撰写本论文时给予的指导和审查表示无尽的谢意。

我要感谢岩手大学兽医研究生院的山田慎二副教授在进行本项研究时给予的巨大实验指导及鞭策。原 岐阜大学联合兽医研究生院的内藤郁慶（现在在北海道国家研究院畜牧实验站）给予的基础研究指导。岩手大学兽医研究生院的千葉優介，先前的工作对我很有价值。我还想感谢在这项研究中合作过的同学们。

最后，我想对我的家人表示感谢，让我无后顾之忧。

## 引用文献

- Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D and Stockinger B (1999). DNA Vaccination: Transfection and Activation of Dendritic Cells as Key Events for Immunity. *J Exp Med* **189**: 169-178.
- Alamri SS, Alluhaybi KA, Alhabbab RY, Basabrain M, Algaissi A, Almahboub S, Alfaleh MA, Abujamel TS, Abdulaal WH, ElAssouli MZ, Alharbi RH, Hassanain M and Hashem AM (2021). Synthetic SARS-CoV-2 Spike-Based DNA Vaccine Elicits Robust and Long-Lasting Th1 Humoral and Cellular Immunity in Mice. *Front Microbiol* **12**: 727455.
- Barr TA, Carlring J and Heath AW (2005). CD40 antibody as a potent immunological adjuvant: CD40 antibody provides the CD40 signal to B cells, but does not substitute for T cell help in responses to TD antigens. *Vaccine* **23**: 3477-3482.
- Baxi MK, Deregt D, Robertson J, Babiuk LA, Schlapp T and Tikoo SK (2000). Recombinant bovine adenovirus type 3 expressing bovine viral diarrhea virus glycoprotein E2 induces an immune response in cotton rats. *Virology* **278**: 234-243.
- Bishop GA (2004). The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol* **4**: 775-786.
- Bolin SR (1993). Immunogens of bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* **37**: 263-271.
- Bruserud Ø and Kittang AO (2010). The Chemokine System in Experimental and

- Clinical Hematology. *Curr Top Microbiol Immunol* **341**: 3–12.
- Carlring J, Barr TA, McCormick AL and Heath AW (2004). CD40 antibody as an adjuvant induces enhanced T cell responses. *Vaccine* **22**: 3323–3328.
- Chen L and Flies DB (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**: 227–242.
- Chen Q, Zhu G, Wang R, Zhang J and He G (2014). Adjuvant effect of CD40 on H5N1 DNA vaccine in mice. *Arch Virol* **159**: 1359–1364.
- Chung YC, Cheng LT, Zhang JY, Wu YJ, Liu SS and Chu CY (2018). Recombinant E2 protein enhances protective efficacy of inactivated bovine viral diarrhea virus 2 vaccine in a goat model. *BMC Vet Res* **14**: 194.
- Dieu M-C, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J-M, Oldham E, Aït-Yahia S, Brière F, Zlotnik A, Lebecque S and Caux C (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* **188**: 373–386.
- Dou Y, Lin Y, Wang TY, Wang XY, Jia YL and Zhao CP (2021). The CAG promoter maintains high - level transgene expression in HEK293 cells. *FEBS Open Bio* **11**: 95–104.
- Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y and Noelle RJ (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* **229**: 152–172.
- Elikaei A, Hosseini SM and Sharifi Z (2017). Inactivation of model viruses and bacteria in human fresh frozen plasma using riboflavin and long wave ultraviolet rays. *Iran J Microbiol* **9**: 50–54.
- Engering A, Kuhn L, Fluitsma D, Hoefsmit E and Pieters J (2003). Differential

- post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. *Eur J Biochem* **270**: 2412-2420.
- Fox BS (1993). Antigen presenting cell-derived co-stimulatory signals can selectively regulate IL-2 and IL-4 production from a Th0 cell hybridoma. *Int Immunol* **5**: 323-330.
- Gao Y, Zhao X, Sun C, Zang P, Yang H, Li R and Zhang L (2015). A transgenic ginseng vaccine for bovine viral diarrhea. *Virology* **12**.
- Gao Y, Zhao X, Zang P, Liu Q, Wei G and Zhang L (2014). Generation of the bovine viral diarrhea virus e0 protein in transgenic astragalus and its immunogenicity in sika deer. *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**: 372503.
- Gómez-Chiarri M, Livingston S, Muro-Cacho C, Sanders S and Levine R (1996). Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment. *Dis Aquat Organ* **27**: 5-12.
- Haddad D, Liljeqvist S, Ståhl S, Perlmann P, Berzins K and Ahlborg N (1998). Differential induction of immunoglobulin G subclasses by immunization with DNA vectors containing or lacking a signal sequence. *Immunol Lett* **61**: 201-204.
- Hessman BE, Fulton RW, Sjeklocha DB, Murphy TA, Ridpath JF and Payton ME (2009). Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus in a starter feedlot. *Am J Vet Res* **70**: 73-85.
- Hobernik D and Bros M (2018). DNA vaccines—How far from clinical use? *Int J Mol Sci* **19**: 3605.

- Iotti B, Valdano E, Savini L, Candeloro L, Giovannini A, Rosati S, Colizza V and Giacobini M (2019). Farm productive contexts and the dynamics of bovine viral diarrhoea (BVD) transmission. *Prev Vet Med* **165**: 23–33.
- Jansen MF, Hollander MR, van Royen N, Horrevoets AJ and Lutgens E (2016). CD40 in coronary artery disease: a matter of macrophages? *Basic Res Cardiol* **111**: 38.
- Kaiser A, Donnadieu E, Abastado JP, Trautmann A and Nardin A (2005). CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen. *J Immunol* **175**: 2349–2356.
- Kanuma T, Yamamoto T, Kobiyama K, Moriishi E, Masuta Y, Kusakabe T, Ozasa K, Kuroda E, Jounai N and Ishii KJ (2017). CD63-Mediated Antigen Delivery into Extracellular Vesicles via DNA Vaccination Results in Robust CD8<sup>+</sup> T Cell Responses. *J Immunol* **198**: 4707–4715.
- Khobragade A, Bhate S, Ramaiah V, Deshpande S, Giri K, Phophle H, Supe P, Godara I, Revanna R, Nagarkar R, Sanmukhani J, Dey A, Rajanathan TMC, Kansagra K and Koradia P (2022). Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. *Lancet* **399**: 1313–1321.
- Khodakaram-Tafti A and Farjanikish G (2017). Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iran J Vet Res* **18**: 154.
- Kim NY, Son WR, Choi JY, Yu CH, Hur GH, Jeong ST, Shin YK, Hong SY and Shin S (2020). Immunogenicity and Biodistribution of Anthrax DNA Vaccine Delivered

- by Intradermal Electroporation. *Curr Drug Deliv* **17**: 414-421.
- Kodama K (1974). Studies on cytopathogenic bovine viral diarrhea virus: Recovery, identification, and properties of the isolated virus. *Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll.* **23**: 51-59.
- Kooten CV and Banchereau J (1997). Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* **9**: 330-337.
- Kutzler MA and Weiner DB (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* **9**: 776-788.
- Lafferty KJ and Cunningham A (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* **53**: 27-42.
- Levy M, Barron L, Meyer K and Szoka Jr F (1996). Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther* **3**: 201-211.
- Li L, Honda-Okubo Y and Petrovsky N (2021). Flavivirus DNA Vaccine Design and Adjuvant Selection. *Methods Mol Biol* **2183**: 405-422.
- Lovas TO, Bruusgaard JC, Oynebraten I, Gundersen K and Bogen B (2014). DNA vaccines: MHC II-targeted vaccine protein produced by transfected muscle fibres induces a local inflammatory cell infiltrate in mice. *PLoS One* **9**: e108069.
- McClurkin A, Littledike E, Cutlip R, Frank G, Coria M and Bolin S (1984). Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can J Comp Med* **48**: 156.
- McCluskie MJ, Millan CLB, Gramzinski RA, Robinson HL, Santoro JC, Fuller JT, Widera G, Haynes JR, Purcell RH and Davis HL (1999). Route and method of

- delivery of DNA vaccine influence immune responses in mice and non-human primates. *Mol Med* **5**: 287–300.
- McCull SR (2002). Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol* **80**: 489–496.
- Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK and Clevers HC (1991). CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* **266**: 3239–3245.
- Ninomiya A (2002). Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice. *Vaccine* **20**: 3123–3129.
- Nobiron I, Thompson I, Brownlie J and Collins ME (2000). Co-administration of IL-2 enhances antigen-specific immune responses following vaccination with DNA encoding the glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol* **76**: 129–142.
- Nobiron I, Thompson I, Brownlie J and Collins ME (2001). Cytokine adjuvancy of BVDV DNA vaccine enhances both humoral and cellular immune responses in mice. *Vaccine* **19**: 4226–4235.
- O’ Connor EB, Muñoz-Wolf N, Leon G, Lavelle EC, Mills KHG, Walsh PT and Porter RK (2020). UCP3 reciprocally controls CD4<sup>+</sup> Th17 and Treg cell differentiation. *PLoS One* **15**: e0239713.
- Pertmer TM, Eisenbraun MD, McCabe D, Prayaga SK, Fuller DH and Haynes JR (1995). Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and

- cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* **13**: 1427–1430.
- Pertmer TM, Roberts TR and Haynes JR (1996). Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol* **70**: 6119–6125.
- Peters AL, Stunz LL and Bishop GA (2009). CD40 and autoimmunity: The dark side of a great activator. *Semin Immunol* **21**: 293–300.
- Petersen SH, Odintsova E, Haigh TA, Rickinson AB, Taylor GS and Berditchevski F (2011). The role of tetraspanin CD63 in antigen presentation via MHC class II. *Eur J Immunol* **41**: 2556–2561.
- Pfistershammer K, Majdic O, Stöckl J, Zlabinger G, Kirchberger S, Steinberger P and Knapp W (2004). CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J Immunol* **173**: 6000–6008.
- Platt R, Kesl L, Guidarini C, Wang C and Roth JA (2017). Comparison of humoral and T-cell-mediated immune responses to a single dose of Bovela® live double deleted BVDV vaccine or to a field BVDV strain. *Vet Immunol Immunopathol* **187**: 20–27.
- Pouriyaveali MH, Bamdad T, Sadat SM, Sadeghi SA, Sabahi F, Mahdavi M and Aghasadeghi MR (2019). Listeriolysin O immunogenetic adjuvant enhanced potency of hepatitis C virus NS3 DNA vaccine. *IUBMB Life* **71**: 1645–1652.
- Rümenapf T, Unger G, Strauss JH and Thiel H-J (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* **67**: 3288–3294.
- Ran X, Chen X, Ma L, Wen X, Zhai J, Wang M, Tong X, Hou G and Ni H (2019). A



- systematic review and meta-analysis of the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in dairy cattle in China. *Acta Trop* **190**: 296–303.
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D and Yankauckas MA (1994). Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 9519–9523.
- Ridpath JF (2013). Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals* **41**: 14–19.
- Ronecker S, Zimmer G, Herrler G, Greiser-Wilke I and Grummer B (2008). Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *J Gen Virol* **89**: 2114–2121.
- Rush C, Mitchell T and Garside P (2002). Efficient Priming of CD4+and CD8+T Cells by DNA Vaccination Depends on Appropriate Targeting of Sufficient Levels of Immunologically Relevant Antigen to Appropriate Processing Pathways. *J Immunol* **169**: 4951–4960.
- Schulte PM, Powers DA and Schartl M (1998). Efficient gene transfer into Xiphophorus muscle and melanoma by injection of supercoiled plasmid DNA. *Mol Mar Biol Biotechnol* **7**: 241–247.
- Shimizu M and Satou K (1987). Frequency of persistent infection of cattle with bovine viral diarrhea-mucosal disease virus in epidemic areas. *Jpn J Vet Sci* **49**: 1045–1051.
- Sicard T, Kassardjian A and Julien J-P (2020). B cell targeting by molecular adjuvants for enhanced immunogenicity. *Expert Rev Vaccines* **19**: 1023–1039.

Silva PL, Nakajima E, da Costa RM, Ho PL, Martins EA, Carvalho E and da Silva JB (2020). Chemokine expression profiles in liver and kidney of mice with different susceptibilities to leptospirosis. *Microb Pathog* **149**: 104580.

Silveira MM, Moreira GMSG and Mendonça M (2021). DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. *Life Sci* **267**: 118919.

Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Meyers G, Monath T, Pletnev A, Rice CM, Stiasny K, Thiel H-J, Weiner A and Bukh J. Family Flaviviridae. 2011; pp.1003-1020. In: *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, (King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB Eds.)Elsevier, San Diego.

Stark JM, Tibbitt CA and Coquet JM (2019). The metabolic requirements of Th2 cell differentiation. *Front Immunol* **10**: 2318.

Suschak JJ, Williams JA and Schmaljohn CS (2017). Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother* **13**: 2837-2848.

Tammig LA, Duque D, Tran A, Zhang W, Pfeifle A, Laryea E, Wu J, Raman SNT, Gravel C, Russell MS, Hashem AM, Alsulaiman RM, Alhabbab RY, Gao J, Safronetz D, Cao J, Wang L, Chen W, Johnston MJW, Sauve S, Rosu-Myles M and Li X (2022). DNA Based Vaccine Expressing SARS-CoV-2 Spike-CD40L Fusion Protein Confers Protection Against Challenge in a Syrian Hamster Model. *Front Immunol* **12**: 785349.

Tellander AC, Michaëlsson E, Brunmark C and Andersson M (2000). Potent Adjuvant Effect by Anti-CD40 in Collagen-induced Arthritis. Enhanced Disease is Accompanied by Increased Production of Collagen Type-II Reactive IgG2a and

- IFN- $\gamma$ . *J Autoimmun* **14**: 295-302.
- Walz PH, Grooms DL, Passler T, Ridpath JF, Tremblay R, Step DL, Callan RJ and Givens MD (2010). Control of Bovine Viral Diarrhea Virus in Ruminants. *J Vet Intern Med* **24**: 476-486.
- Wang S, Yang G, Nie J, Yang R, Du M, Su J, Wang J, Wang J and Zhu Y (2020). Recombinant E(rns)-E2 protein vaccine formulated with MF59 and CPG-ODN promotes T cell immunity against bovine viral diarrhea virus infection. *Vaccine* **38**: 3881-3891.
- Weinkove R, George P, Dasyam N and McLellan AD (2019). Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. *Clin Transl Immunology* **8**: e1049.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A and Felgner PL (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465-1468.
- Woo JG, Kim NY, Yang JM and Shin S (2011). Biodistribution and blood clearance of plasmid DNA administered in arginine peptide complexes. *Genet Vaccines Ther* **9**: 13.
- World Organizaitn of Animal Health (OIE). Bovine viral diarrhoea. 2018; pp.1075-1096. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, World Organization of Animal Health (OIE), Paris.
- Xu H, Zhao G, Huang X, Ding Z, Wang J, Wang X, Cheng Y, Kang Y and Wang B (2010). CD40-expressing plasmid induces anti-CD40 antibody and enhances immune responses to DNA vaccination. *J Gene Med* **12**: 97-106.
- Yesilbag K, Alpay G and Becher P (2017). Variability and Global Distribution of

- Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses* **9**.
- Zhang P, Wang J, Wang W, Liu X, Liu H, Li X and Wu X (2017). Astragalus polysaccharides enhance the immune response to avian infectious bronchitis virus vaccination in chickens. *Microb Pathog* **111**: 81-85.
- Zhao Y, Jiang L, Liu T, Wang M, Cao W, Bao Y and Qin J (2015). Construction and immunogenicity of the recombinant *Lactobacillus acidophilus* pMG36e-E0-LA-5 of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Methods* **225**: 70-75.
- 加藤肇, 一條祐一, 江村有希子, 佐藤礼一郎, 高久英徳, 大西守 and 田島誉士 (2010). 牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる中和抗体価維持期間に関する調査. *日獣会誌* **63**: 33-37.
- 長井 誠. 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症. 2019; pp. 89-90. In: *動物の感染症*, 第4版 ed (明石博臣, 内田郁夫, 大橋和彦, 後藤義孝, 須永藤子, 高井伸二, 勉宝 Eds.)近代出版, 東京.
- 本川賢司 (2009). ワクチン免疫の基礎と臨床—ワクチン効果を上げるも下げるもの—. *日本家畜臨床感染症研究会誌* **4**: 39-47.
- 鈴木元彦 (2017). CD40. *アレルギー* **66**: 118-119.