

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム
セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）小児において疾病負荷が高い突発性発疹ウイルス感染症に対する新規ワクチン開発
（英 語）Development of novel vaccine for human herpesvirus-6B

研究開発実施期間：2016 年 10 月 13 日～2018 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語） 森康子
氏名：（英 語） Yasuko Mori

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）神戸大学 大学院医学系研究科 教授
（英 語）Kobe University Graduate School of Medicine, Professor

II 研究開発の概要

本研究開発では小児において疾病負荷の高い感染症である突発性発疹の原因であるヒトヘルペスウイルス 6B（HHV-6B）を標的とした新規ワクチンの開発を目指した。具体的には、我々が作製した HHV-6B 糖タンパク質複合体をワクチン原とし、アジュバントを添加することにより HHV-6B に対する不活化ワクチンの作製を試みた。実用化に向けては以下の 3 点のボトルネックがあったため、本研究開発によりこれらを解決する事を目標とした。

1. 研究室レベルで行われていたワクチン抗原の生産系を、ワクチン製造の実情に沿って認可された材料を用いた生産法へ変更する必要性が示唆されていた。
2. 現行のアルミニウムを含めたアジュバントの HHV-6B 複合体に対する最適化によって最大限の有効性が得られる投与方法の確立が必要であった。
3. HHV-6B はヒトのみを宿主とするため、感染の動物モデルが存在していなかった。そこで、感染動物モデル系の作製が必要であった。

この目標のために、神戸大学大学院医学研究科では、以下の 3 つの実施項目を実施した。

1. ワクチン産生細胞として認可された細胞における HHV-6B ワクチン抗原の作製
2. アジュバントを添加した HHV-6B 抗原によるマウスでの有効性の解析
3. HHV-6B 感染動物モデルの作製

以下に各研究開発実施項目の成果の概要及びその意義を記載する。

1. ワクチン産生細胞として認可された細胞における HHV-6B ワクチン抗原の作製

我々はワクチン産生細胞としては認可されていない 293 細胞を用いて、HHV-6B に対するワクチン抗原となり得る HHV-6B 糖タンパク質複合体である gH/gL/gQ1/gQ2 複合体（以下、テトラマーとする）産生細

胞を構築した。しかしテトラマーをワクチンとして使用するためにはワクチン産生用として既に認可されている細胞を用いる必要があった。そこで我々は日本脳炎ワクチンやロタウイルスワクチン、A 型肝炎ワクチンの製造にも使用されている認可細胞である Vero 細胞を用いて、テトラマー産生細胞の構築を行った。

テトラマーを安定的に分泌するテトラマー恒常発現 Vero 細胞を得る事ができた。Vero 細胞から得られたテトラマーは受容体 CD134 への結合能を有し、機能が維持されていた。テトラマーの精製にも成功し、ウイルス上のテトラマーと同様に複合型糖鎖が付加されている事が示された。

以上より、本研究開発によってワクチン産生用の細胞として認可されている Vero 細胞でのテトラマー産生細胞の樹立に成功し、実用化に向けて産生細胞の選択が可能となった。

2. アジュバントを添加した HHV-6B 抗原によるマウスでの有効性の解析

293 細胞で産生させたテトラマーを用いて、現行のワクチンでも使用されているアルミニウムアジュバント (Alum) と共にマウスの皮下に接種し、免疫誘導能について解析を行った。また、より効果的なアジュバントを見出すために核酸アジュバントについても検討を行った。その結果、テトラマーと Alum の組み合わせでは、接種抗原量に依存してテトラマーに対する抗体価の上昇及び HHV-6B に対する中和抗体の誘導が確認できた。さらに Alum、核酸アジュバントをテトラマーと混合した場合には、少ない抗原量でも免疫誘導が認められた。テトラマーと Alum の接種でのサイトカイン誘導を調べたところ Th2 サイトカインの上昇が認められ、主に液性免疫が誘導されている事が確認された。また実施項目 1 で得た Vero 細胞で産生されたテトラマーを用いて、Alum と混合しマウスへの接種を行ったところ、293 細胞から産生されたテトラマーを用いた場合と同様に中和抗体誘導が確認された。

テトラマー構成成分の一つである gQ1 の中の CD8⁺T 細胞エピトープを探索した。結果、IFN- γ 産生量の高い複数の gQ1 ペプチドを見出すことができ、2 つは CD4⁺T 細胞エピトープ、2 つは CD8⁺T 細胞エピトープとして認識されている事がわかった。CD8⁺T 細胞エピトープとして認識されているペプチドは重複していたことから、詳細な配列解析を行う事で、実際にエピトープとして作用するペプチド配列を同定する事が出来た。

以上より、テトラマーを抗原とした免疫誘導において有効に働くアジュバント及び投与条件を見出すことができ、またテトラマー接種にともなうサイトカイン応答及び抗原中の T 細胞エピトープについて知見を得る事が出来た。

3. ヒト化マウスを用いた HHV-6B 感染動物モデルの作製

HHV-6B はヒトのみを宿主とするため、適切な感染動物モデルが存在しない。そこでヒト化マウスを用いて、HHV-6B 感染動物モデル系の作製を試みた。神戸大学大学院医学研究科内での共同研究により、免疫不全マウスから免疫細胞ヒト化マウスを樹立し、HHV-6B 感染を行った。

大阪大学（青枝大貴）では、HHV-6B ワクチンに対する細胞性免疫誘導を効率的に増強し、かつ安全性にも優れ、また産業レベルでのワクチン製造にも耐えうる物性を有したアジュバントの創製を目標に開発を行った。細胞性免疫誘導を効率的に誘導する CpG 核酸に対して改良を加え、さらにキャリアーとなり得る物質を加えることで、優れたワクチンアジュバント効果を示す複数のアジュバント候補を創出した。それらを用いることで、より少ない抗原による細胞性免疫応答の誘導が可能であることを確認した。

【英文研究概要】

In this research, we aimed to develop a novel vaccine against human herpesvirus 6B (HHV-6B), which causes a high

disease burden for children. The planned product is a subunit vaccine using a HHV-6B glycoprotein complex as an immunogen with adjuvants to increase immune response. There were three bottlenecks toward the practical use; (1) the substrate cells used for the antigen production in laboratory was ineligible for the clinical use, thus a new production system with approved substrates cell is required; (2) the formulation of the vaccine and the administration protocol need to be optimized to maximize the efficacy; (3) because no animal infection model are available for HHV-6B, development of an animal infection model using humanized mice is required to recapitulate the human-specific infection of HHV-6B and to evaluate the vaccine efficacy.

In Kobe University, the following tasks were addressed to solve the bottlenecks.

1. Production of HHV-6B antigen by using substrate cells approved for vaccine production
2. Analysis of the immunization efficacy in mice with the vaccine composed of HHV-6B antigen and adjuvants
3. Development of an animal model for HHV-6B infection

The summary and result of each task were described below.

1. Production of HHV-6B antigen by using substrate cells approved for vaccine production

We have established a production system of HHV-6B glycoprotein complex (gH/gL/gQ1/gQ2; hereafter tetramer) using the 293 cells which are not approved as substrate cells for vaccine production. For clinical use of the antigen, the substrate cells were need to be changed. We examined Vero cells which are currently approved and actually used for the production of Japanese encephalitis virus vaccine, Rotavirus vaccine, and hepatitis A virus vaccine. As the result, we obtained tetramer-stably-expressing Vero cells. The tetramer produced from the Vero cells has the binding activity to the receptor CD134, thereby proving that the functional form of the tetramer was maintained. We successfully purified the tetramer from the cells, and the tetramer contained complex type glycans as the native tetramer on the HHV-6B particle has.

We established the tetramer expression system with Vero cells which approved for vaccine production, and it allowed us to select the substrate cells for practical production.

2. Analysis of the immunization efficacy in mice with the vaccine composed of HHV-6B antigen and adjuvants

We immunized mice by subcutaneously injecting the tetramer produced by 293 cells with aluminum adjuvant (Alum), which is currently used for several vaccines, and analyzed the immune response. We also examined CpG DNA adjuvant for the tetramer vaccine. As the result, immunization of tetramer with Alum showed increasing antibody titer for tetramer and induced neutralizing antibodies against HHV-6B infection in a dose-dependent manner. Furthermore, concurrent use of Alum and CpG DNA adjuvant effectively induced immune response even in a low tetramer dose. The immunization of tetramer with Alum induced Th2 cytokines, indicating the induction of humoral immunity. The tetramer produced by Vero cells was also analyzed by immunization with Alum. It was revealed that the tetramer produced by Vero cells also induced neutralizing antibodies against HHV-6B as the tetramer produced by 293 cells.

CD8⁺ T cell epitope in the gQ1 of the tetramer was explored. As the result, we found several gQ1 peptides with IFN- γ induction activity. Two of them were recognized as CD4⁺ T cell epitopes and the other two were recognized as CD8⁺ T cell epitopes. Because the two peptides of CD8⁺ T cell epitope contained an overlapping sequence, we identified the actual epitope sequence in the overlapping region by a detailed analysis.

We found effective adjuvants and administration protocols suitable for the tetramer vaccine, and obtained knowledge about the cytokine response by the tetramer immunization, and the T cell epitopes in the antigen.

3. Development of an animal model for HHV-6B infection

Because HHV-6B infect only human, there is no animal infection model. Thus we tried to make an animal model for

HHV-6B infection using humanized mice. This research was conducted in collaboration with a research group in the Kobe University. We generated the immune-cell-humanized mice by injecting human cells into immune-deficient mice, and used for HHV-6B infection experiment.

In Osaka University, we have developed T cell response inducing adjuvant for HHV-6B antigen. Considering effectiveness, safety, and physicochemical feature, we created several CpG based adjuvants, which effectively induce T cell responses with lower amount of HHV-6B antigen immunization in mice.