

機関番号：10105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780262

研究課題名（和文）

細胞内寄生原虫ネオスポラ流産関連因子の機能解析及びワクチン開発への応用

研究課題名（英文） Characterization of abortion related factor of intracellular protozoan parasite *Neospora caninum* and its application for vaccine development

研究代表者

西川 義文（NISHIKAWA YOSHIFUMI）

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：90431395

研究成果の概要（和文）：本研究は、家畜原虫病の一つネオスポラ症のワクチン開発を目指し、ネオスポラ流産関連因子 NcGRA7 の機能解析を目的とした。NcGRA7 はネオスポラから分泌され、免疫細胞を活性化することが明らかとなった。さらに、NcGRA7 を利用したワクチンを開発し、マウス感染モデルにて原虫感染を制御する結果が得られた。今回の研究により、ネオスポラ症のワクチン開発に大きく前進する成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to characterize an abortion related factor of *Neospora caninum*, NcGRA7, for development of vaccine against neosporosis. This study showed that NcGRA7 could stimulate immune cells. Moreover, we developed vaccine based on NcGRA7 and could control the parasite infection in mouse model. The present study indicates the positive results for the vaccine development against neosporosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：感染症学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・基礎獣医学基礎畜産学

キーワード：寄生虫、原虫、ワクチン、流産、垂直感染

1. 研究開始当初の背景

ネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) は犬科動物を終宿主とし、牛・羊・山羊、鹿などを中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。終宿主の糞便中に排出されるオーシストによる水平感染や中間宿主における垂直感染により伝搬される。特に牛には流産、死産或いは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高率に引き起こす。欧米諸国の報告では、牛

の流産の約40%の原因はネオスポラ原虫感染によるものとされている (Anderson et al. 1995 J Am Vet Med Assoc)。ネオスポラ原虫の垂直感染は何世代にも渡り成立し、このことが本原虫の感染拡大の最大の原因として挙げられる。実際、ネオスポラ原虫の感染例が世界中で報告されており、日本においてもその発生が深刻である (山根 2001 家畜診療)。ネオスポラ原虫が感染した母牛を搾

乳に供することができない場合が多く、子牛と搾乳量の損耗などにより、その発生による経済的損失は極めて大きい。地球規模での被害額は年間約数十億 US ドルにのぼるとの試算もある (Dubey 1999)。ネオスポラ原虫感染による流産は、母牛の免疫機能が低下する妊娠 4-6 ヶ月での胎盤感染の成立が原因で発生するため、本原虫の垂直感染をコントロールすることは極めて難しい。このような背景から、いまだにネオスポラ原虫感染症に対する有効な治療法は開発されていないのが現状であった。申請者はこれまでに、ネオスポラ感染に対する予防法の確立を目指し研究を展開してきた。マウスモデルを用いた免疫学的解析により、ネオスポラ感染症の制御にはインターフェロンガンマが誘導するマクロファージの活性化と CD4 陽性 T 細胞の重要性を明らかにした (Nishikawa et al. 2001)。また、ネオスポラ虫体を認識するモノクローナル抗体を作製し、原虫の宿主細胞への侵入に関与する分子 (NcSRS2, NcSAG1) の同定に成功した (Nishikawa et al. 2000)。さらに上記の免疫学的知見からワクシニアウイルスベクターを選択し、NcSRS2 や NcSAG1 を用いた組換えワクチンを作製し、マウスモデルにおいて NcSRS2 組換えウイルスを用いて極めて高いワクチン効果を誘導することに成功した (Nishikawa et al. 2002; 2001; 2000)。また、プロテオーム解析により新規抗原性分子 (NcP0, NcAMA1) も同定している (Zhang et al. 2007)。以上の研究成果から、牛においてネオスポラ原虫の垂直感染に関連する因子が同定されれば、治療法および診断法の開発に繋がるという発想に至った。我が国における近年の疫学調査により、ネオスポラ原虫の抗体陽性牛と流産の関連性が明らかにされつつある。しかしながら、原虫抗体陽性牛が流産を起こさず、かつ子牛への先天的な感染もみられないケースが存在する。申請者は北海道の野外牛血清サンプルを用いて、ネオスポラ感染により流産を起こした牛では分泌小器官 (dense granule) タンパク質である NcGRA7 に対する抗体価が極めて高いことを見出した (Huang et al. 2007)。ネオスポラ感染の制御には Th1 応答 (T 細胞が関与する細胞性免疫) と Th2 応答 (抗体が関与する液性免疫) をバランスよく誘導することが必要である (Nishikawa et al. 2003; 2001)。申請者の予備研究において、NcGRA7 タンパク質を単独投与したマウスでは、僅か 0.3 μ g の投与でも特異抗体の産生を誘導することを確認している。さらに、宿主の免疫反応が Th2 応答にシフトし、Th1 応答はほとんど認められなかった。従って、NcGRA7 は抗原性が極めて高いものの、生体の免疫反応を Th2 にシフトさせて過剰な抗 NcGRA7 抗体の産生を誘導していることが推測された。ネオスポラの感

染制御には細胞性免疫の働きが不可欠なため、NcGRA7 の機能を阻害し、Th1 応答を誘導することが重要だと言える。従って、NcGRA7 の生体内での生理機能を解明し、NcGRA7 特異的 Th1 細胞の誘導方法を確立することができれば、ネオスポラの感染拡大を阻止できる予防法や治療薬の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではネオスポラ流産関連因子 NcGRA7 に注目し、NcGRA7 の生理機能の解明と NcGRA7 特異的 T 細胞の誘導方法の確立によるワクチン開発を目指す。培養細胞を用いた *in vitro* 解析とマウスを用いた *in vivo* 解析により、NcGRA7 の病原性や免疫活性化作用を解析し、NcGRA7 の生理的な作用機序の理解を行う。また、ネオスポラ垂直感染マウスモデル系による NcGRA7 組換えタンパク質のワクチン評価を実施する。さらに、牛における NcGRA7 組換えタンパク質の T 細胞活性化作用について解析し、ワクチン開発への可能性を探る。

3. 研究の方法

本研究ではネオスポラ流産関連因子 NcGRA7 に注目し、NcGRA7 の生理機能の解明と NcGRA7 特異的 T 細胞の誘導方法の確立によるワクチン開発を目指す。2 年の研究期間中に以下のような手順で実施した。

- (1) NcGRA7 組換えタンパク質の作製方法の確立。
- (2) 免疫細胞に対する NcGRA7 組換えタンパク質の細胞毒性及び細胞活性化作用の評価。
- (3) 原虫垂直感染マウスモデル系による NcGRA7 組換えタンパク質のワクチン評価。
- (4) 牛における NcGRA7 組換えタンパク質の T 細胞活性化の評価。

4. 研究成果

ネオスポラ Nc-1 株の精製原虫から RNA を回収し、逆転写により cDNA を作製した。NcGRA7 は 217 アミノ酸からなり、1-17 アミノ酸にシグナル配列、139-157 アミノ酸に推定膜貫通領域を持つ。cDNA を鋳型としたクローニングを行い、大腸菌において成熟型タンパク質 (28-217 アミノ酸) を作製した。

NcGRA7 に対するウサギとマウスの特異抗体を作製し、NcGRA7 の局在を解析した。NcGRA7 は、感染細胞内に形成される寄生胞内へ虫体から分泌されていた。さらに、宿主細胞外の遊離原虫から NcGRA7 の放出が確認された。

マウス由来免疫細胞 (リンパ球、マクロファージ) とマクロファージ株化細胞に対する NcGRA7 組換えタンパク質の宿主細胞に対する細胞活性化作用と細胞毒性を評価した。NcGRA7 はマクロファージの F4/80 と CD86 の

発現を増加させ、細胞の活性化を促していることが示された。リンパ球に NcGRA7 を作用させると、細胞増殖を促進させた。また、NcGRA7 処理マクロファージから、IL-6, IL-12, TNF- α , 一酸化窒素の産生誘導が確認され、炎症反応を誘導する活性が示された。高濃度 (0.1 μ M 以上) の NcGRA7 を作用させると、宿主細胞にアポトーシスを誘導した。興味深いことに、TLR2 や TLR4 欠損マクロファージでは、上記の炎症反応は抑制された。

NcGRA7 をターゲットにしたワクチンを作製し、マウスの感染モデルを用いてワクチン効果を評価した。オリゴ糖リポソーム内に NcGRA7 (OML-NcGRA7) を封入したワクチンを作製しマウスに投与したところ、母マウスにおけるネオスポラの脳内感染率と仔マウスへの垂直感染を抑制する結果が得られた。OML-NcGRA7 を接種したマウスでは NcGRA7 特異抗体の産生が認められ、ワクチン接種マウスより回収したリンパ球はネオスポラ抗原に特異的に反応した。これらの結果は、OML-NcGRA7 が宿主免疫反応を刺激し、ネオスポラ特異的な T 細胞の応答を誘導することでワクチン効果を発揮していることを示している。

次に、ウシにおける NcGRA7 組換えタンパク質の T 細胞活性化能を評価した。ホルスタイン牛から末梢血単核球 (PBMC) を分離し NcGRA7 を作用させたと、IFN- γ の産生が確認された。さらに OML-NcGRA7 を接種したウシ由来の PBMC の場合でも、NcGRA7 の刺激により IFN- γ の産生が確認された。NcGRA7 を抗原とした ELISA によりネオスポラ感染牛の血清を解析したところ、NcGRA7 特異抗体が検出された。これらの結果は、NcGRA7 がウシにおいても免疫原性の高い抗原であることを示している。

今回の研究により、NcGRA7 の生理活性とワクチン効果が明らかになり、ネオスポラ症のワクチン開発に大きく前進する成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) Zhang G, Huang X, Boldbaatar D, Battur B, Battsetseg B, Zhang H, Yu L, Li Y, Luo Y, Cao S, Goo YK, Yamagishi J, Zhou J, Zhang S, Suzuki H, Igarashi I, Nishikawa Y, Xuan X. Construction of *Neospora caninum* stably expressing TgSAG1 and evaluation of its protective effects against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine*. 2010;28(45):7243-7247. 査読有り
- (2) Nishikawa Y, Zhang H, Ibrahim MH, Yamada K, Nagasawa H, Xuan X. Roles of CD122⁺ Cells in Resistance against

Neospora caninum Infection in a Murine Model. *J Vet Med Sci*. 2010;72(10):1275-1282. 査読有り

- (3) Zhang H, Nishikawa Y, Yamagishi J, Zhou J, Ikehara Y, Kojima N, Yokoyama N, Xuan X. *Neospora caninum*: Application of apical membrane antigen 1 encapsulated in the oligomannose-coated liposomes for reduction of offspring mortality from infection in BALB/c mice. *Exp Parasitol*. 2010;125(2):130-136. 査読有り
- (4) 西川義文、総説「ネオスポラ症に対する防御方法の開発に向けて」*獣医畜産新報 Journal of Veterinary Medicine*、2009 年、62 (5)、383-388。査読無し
- (5) Nishikawa Y, Zhang H, Ikehara Y, Kojima N, Xuan X, Yokoyama N. Immunization of oligomannose-coated liposome-entrapped NcGRA7 protects dams and offspring from *Neospora caninum* infection in mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(6):792-797. 査読有り
- (6) Nishikawa Y, Zhang H, Huang P, Zhang G, Xuan X. Effects of a transferring antibody against *Neospora caninum* infection in a murine model. *Vet Parasitol*. 2009;160(1-2):60-65. 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 西川義文ら、ネオスポラ感染動態における原虫由来分子サイクロフィリンの役割、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 18 日、帯広畜産大学
2. 小原潤子ら、ウシにおけるネオスポラ感染モデルの作出、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 18 日、帯広畜産大学
3. 西川義文ら、ネオスポラ特異的移行抗体は原虫感染の防御に関与しない、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 28 日、日本獣医生命科学大学
4. 西川義文ら、ネオスポラ Apical Membrane Antigen-1 (NcAMA1) によるネオスポラ垂直感染に対する防御効果、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 26 日、とざりん文化会館
5. 西川義文ら、オリゴ糖リポソームを用いたネオスポラ垂直感染に対するワクチン開発、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 3 日、栃木県総合文化センター

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン

ン製剤

発明者：西川義文、横山直明、小島直也

権利者：帯広畜産大学、東海大学

種類：特許

番号：PCT/JP2009/004525

出願年月日：2009年9月11日

国内外の別：外国

[その他]

原虫病研究センターHP:

<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html>

研究室 HP:

<http://www.obihiro.ac.jp/~geneticbiochem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 義文 (NISHIKAWA YOSHIFUMI)

帯広畜産大学・

原虫病研究センター・准教授

研究者番号：90431395

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：