

女性研究者支援 第3回万有医学奨励賞 研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	長崎大学熱帯医学研究所
氏 名	モイ メンリン
研究テーマ	マーモセットを用いたデングワクチン開発・実用化のためのモデル動物の構築

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

デング熱の流行地域は急速に拡大しており、日本国内においては、2014年には70年ぶり162人規模のデング熱国内流行が発生した。さらに、毎年、数百の輸入症例が報告されている。デング熱に対する対策として、ワクチンがもっとも有効な予防法である。2017年に世界11カ国においてデング熱ワクチンが承認されたが、ワクチン接種者で重症患者及びデング出血熱による死亡例も認められた。このことから、デング熱ワクチンの開発・実用化には適切なモデル動物による有効性・安全性の評価が必要である。

本研究では、我々が独自で開発したマーモセット新世界ザルを用いたデングウイルス感染症モデル(Moi et al., J Gen Virol, 2014; Omatsu et al., J Gen Virol, 2011)、及び、FcγR発現細胞を用いた新規中和抗体測定法(Moi et al., Lancet, 2013; Moi et al., PloS NTD, 2012; Moi et al. J. Infect Dis., 2011)により、(1)デング熱ワクチン開発のためのモデル動物の確立、及び、(2)ワクチン有効性と安全性マーカーの指標となる防御の中和抗体価などのマーカーの同定を目的とした。

本研究課題では、タイ・マヒドン大学との共同研究を通じて、本大学で開発された弱毒化生ワクチンにてマーモセットのデング熱ワクチンの評価モデルとしての有用性を検討した。デング熱候補ワクチン接種を受けたマーモセットにおいては、同血清型に対し、感染防御が認められた。さらに、本件研究により、マーモセットにおける免疫反応(抗体上昇パターン、サイトカイン上昇など)は、デング熱患者、及び、ワクチン接種者(臨床試験)と類似することから、本モデル動物は、デング熱ワクチン開発に有用であることが示唆された。その一方、デング熱再感染のマーモセットにおいては、デング出血熱でみられる発疹や出血斑の症状が認められ、発症モデルとしても有用であることが示唆された。さらに、本研究課題では、マーモセットの免疫解析に有用なツール(遺伝子発現解析、中和抗体測定アッセイなど)の確立・評価も行った。

ワクチン評価モデルとして、開発された本マーモセット動物モデルは、国内においては、主要な研究機関(厚生労働省国立感染症研究所、大阪大学微生物研究所、東京都医学総合研究所、ワクチン開発メーカーなど)がデング熱の治療薬・予防法の評価モデルとして活用しており、海外においても注目されるようになった。本モデルは、旧世界ザルを用いたモデル動物は、デングウイルスの感染に対する感受性が高いことが明らかとなり(Moi et al., AJTMH, 2015; Moi et al., J Gen Virol., 2017)、将来的には、デング熱ワクチン・治療法開発などの研究に大きなインパクトを与えることが多いに期待できる。さらに、本研究により、デング熱ワクチンの評価モデルとしての有用性が科学的なエビデンスが提供でき、今後はさらに多くの研究機関や国際パートナーの協力を得て、ワクチン実用化を前進させるツールとして、多く活用されることが想定される。このように、本研究で得られた成果は、デング熱に対する感染症対策において多大な意義を有する。

さらに、波及効果として、近年南米をはじめ、アジアでも大流行しているジカ熱(Moi et al., Lancet Infect Dis., 2017)に対し、本成果を応じたジカウイルス感染モデルが確立され(Moi et al., in preparation)、日本国内外におけるジカ熱などのワクチン・治療法開発に活用されることが大いに期待できる。また、本プロジェクトを含めたデング熱研究、成果が認められ、研究代表者(モイ)は、①H28年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞、②H29年度長崎大学未来に羽ばたく女性研究者賞(優秀女性研究者賞)、③H29年度長崎大学熱帯医学研究所同門会ベスト論文賞を受賞した。

女性研究者支援 第3回万有医学奨励賞

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	長崎大学熱帯医学研究所
氏 名	モイ メンリン
研究テーマ	マーモセットを用いたデングワクチン開発・実用化のためのモデル動物の構築

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

① 研究背景・目的

デング熱・出血熱は世界の熱帯・亜熱帯地域で大きな問題となっており、年間約 4 億人がデング熱・出血熱を発症し、死亡例は 2.5 万例である。日本においても近年の輸入症例数が増加傾向にあり、1999 年には輸入症例が 9 症例であったが、2016 年には過去最高の 343 症例が報告されている。さらに、2014 年には、70 年ぶりに国内でデング熱流行が発生し、162 人の患者が発生した。世界人口の約 1/3 がデング熱流行地で生活しているにも関わらず、いまだに実用化されていないデング熱ワクチンの実用化は、国内外においても緊急課題である。2015 年には、世界初となるデング熱ワクチンは、メキシコで承認された。しかし、デング熱ワクチンの普及には(1)適切なモデル動物の開発、(2)防御免疫のメカニズムの解明、及び、(3)生物的に意義のある防御マーカーの確立が必要である。そこで、本研究では、デング熱ワクチン開発のためのモデル動物を構築することにより、ワクチンの実用化を可能にすることを目標とする。本研究では、(1)ワクチン医薬品の開発研究(有効性)および審査行政(安全性基準制定)に有用なマーモセットモデル動物を構築し、さらに、(2)本モデルを活用し臨床への応用が可能な防御マーカーを同定するとともに、(3)デング熱ワクチンによる防御機序を明らかにすることを目的とする。従って、デング熱ワクチンの実用化には適切なモデル動物による有効性・安全性の評価が必要である。本研究では、我々が独自で開発したマーモセット新世界ザルを用いたデングウイルス感染症モデル(Moi et al., J Gen Virol, 2014; Omatsu et al., J Gen Virol, 2011)、及び、FcγR 発現細胞を用いた新規中和抗体測定法(Moi et al., Lancet, 2013; Moi et al., PloS NTD, 2012; Moi et al. J. Infect Dis., 2011)により、(1)デング熱ワクチン開発のためのモデル動物の確立、及び、(2)ワクチン有効性と安全性マーカーの指標となる防御の中和抗体価の同定を目的とする。

② 研究方法

本研究では、ウイルス学や臨床・基礎医学の研究者とともに、獣医学、ワクチン学、感染病理などの専門領域の異なる研究分野との連携、及び、タイ・マヒドン大学との国際的枠組みでデングウイルス(DENV)感染症のワクチン安全性・有効性評価のための動物モデル構築することを目的とする。さらに、確立したモデルにより、DENVの生物的に意義のある防御マーカーを同定し、有効なデング熱ワクチンの実用化を加速させるための基盤構築を目的とする。H27年~28年度は、(1)ワクチン開発研究に有用なモデル構築、(2)安全性基準制定に有用なモデル動物の構築、(3)防御のレベルの同定を行うことを計画し、実験を行った。具体的に、タイ・マヒドン大学で開発された弱毒化生ワクチンにてマーモセットのデング熱ワクチンの評価モデルとしての有用性を検討した。具体的に、16個体のマーモセットを用いて、マーモセット4個体にそれぞれワクチン株(DENV-1及びDENV-2)を接種し、親株(対象群)と比較検討を行った。

さらに、ワクチン接種6ヶ月後は、同じ血清型の臨床分離株を用いて、感染実験を行った。同時に、感染歴のない8個体のマーモセット(flavivirus naïve)を用いて、マーモセット4個体にそれぞれDENV-1及びDENV-2の感染実験を行い、それぞれの個体における臨床症状(ウイルス血症、サイトカイン上昇など)を観察・測定し、さらに、誘導された抗体のレベルを測った。いずれのワクチン株群(8個体)及び親株群(8個体)においても、2回目の感染後には、感染性ウイルス粒子(ウイルス血症)が認められず、抗体の上昇パターンは、再感染のIgM/IgG抗体の上昇パターンであった。それに対し、感染歴のない8個体においては、典型的なデング熱様の症状(ウイルス血症や血小板減少症)が認められ、初感染のIgM/IgG上昇パターンを示した。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

本研究課題では、以上の結果を活用し、① Dengue 熱ワクチンの有効性・安全性の評価に有用な重症 Dengue 熱モデルを構築し、② 同一血清型に対する防御免疫が同一型間のうち異なる遺伝子型の DENV 感染も防御できるかを検討し、③ 感染防御マーカーの探索・同定を行い、防御メカニズムを解明することを目的とする。

(方法—1)重症 Dengue 熱モデル動物の構築

Dengue ウイルス (DENV) 感染に対し、高感受性 (Omatsu et al., J Gen Virol, 2011) を示すが、マーマセツにおける極期のウイルス血症は、約 10^4 PFU/ml であり、ヒトにおけるウイルス血症 (約 10^6 PFU/ml) より低い。ウイルス血症は、重篤化との関連性が高いため、再感染マーマセツ、及び、高価なウイルス ($\sim 10^{12}$ PFU/dose) を用いて感染実験を行う。まずは、DENV-2 既感染マーマセツ 6 個体に対し、DENV-1 (臨床株、 10^4 - 10^{12} PFU/dose) の皮下接種を行う。接種 3 日前および接種直後、2、4、7、10、14 日目に 1.0ml の採血を行い、血中ウイルス量、ウイルス抗原のレベル、抗体価を経時的に測定する。感染 14 日目には解剖を行い、各臓器 (リンパ節、腎臓、脾臓、肝臓) を採材する。さらに、マーマセツを用いて病理解析を行い、重症 Dengue 熱のモデル動物としての有用性を明らかにする。

(方法—2) 同一血清型間の異なる遺伝子型に対する防御効果

Dengue 熱に対するワクチンはいまだ実用化されていない。Dengue ワクチンの条件として、すべての血清型のウイルスを防御することが重要である。しかし、2013 年のタイにおける Dengue 熱ワクチンの臨床試験では、DENV 中和抗体が認められたワクチン接種者において DENV2 型の患者が出現した。このことから、① 防御にもっとも重要とされるマーカーの中和抗体が防御を正確に反映できること、及び、② 同一血清型に対する防御免疫が同一型間のうち異なる遺伝子型の DENV 感染に対する防御効果があるかが問われている。ここで、(1) マーマセツ 6 個体に対し、DENV2 の内、Asian I 遺伝子型 (グループ A: 3 個体)、及び、同血清型の Cosmopolitan 遺伝子型 (グループ B: 3 個体) の感染実験を行う。まずは、すべての 6 個体のマーマセツ (グループ A 及びグループ B) に対し、Asian I 遺伝子型ウイルスの攻撃実験を行う。(2) 具体的に、マーマセツを麻酔し血清型 2 の Dengue ウイルスの内、Asian I 遺伝子型、及び、Cosmopolitan 遺伝子型の皮下接種を行う。接種前、接種直後および接種後の 2、4、7、10、14 日目に 1.0ml の採血を行い、血中ウイルス量、同遺伝子型及び異なる遺伝子型 (Asian I、Asian-American、Cosmopolitan 遺伝子型) に対するそれぞれの抗体価を経時的に測定し、ウイルス血症、感染によって誘導された免疫パターンを明らかにする。(3) 初回の接種から半年後に、血清型 2 の Dengue ウイルスの内 Asian I 遺伝子型の皮下接種を行う。接種前、接種直後および接種後の 2、4、7、10、14 日目に 1.0ml の採血を行い、血中ウイルス量、抗体価を経時的に測定し、ウイルス血症感染によって誘導された免疫パターンを明らかにする。

(方法—3) 感染防御マーカーの探索・同定

いずれの DENV1 及び DENV2 の感染実験においても、初回のウイルス接種 1 週間後に同じ血清型に対する高価な中和抗体価 ($\sim 1:2560$) が認められた。さらに、DENV 接種歴のないマーマセツにおいては、チャレンジ実験後 (2 回目の感染) に中和抗体の上昇が認められた。一方、DENV2 臨床株のチャレンジ実験では、ワクチン株接種群 (4 個体) において、末梢血単球核細胞における IFN- γ 、IL-2、CD4 及び CD8 の遺伝子発現レベルの上昇が確認できた。本研究課題では、これからの末梢血検体を用いて、防御に誘導された免疫因子の網羅的な探索を行う。マーマセツの免疫解析ツールが限られているため、本研究課題では、マーマセツの免疫系の網羅的な解析に有用なマーマセツのマイクロアレイを用いた手法を確立し、Dengue 熱の感染防御のメカニズムを明らかにする。具体的に、中和抗体値のレベルにより、検体を選定し、末梢血中のサイトカインなどの遺伝子の発現を RT-PCR にて測定する。さらに、Luminex 法にて① 血中のサイトカインの測定、② 独自に開発したマーマセツのマイクロアレイを用いて防御免疫の関連因子の特定・解析を行う。

③ 結果

(3-1)重症デング熱モデル動物の構築

DENV-1 初回の感染では、いずれのマーモセット (3 個体) においても real-time PCR にてウイルス血症 (4.6-7.0 log₁₀ genome copies/ml) が検出され、さらに、IgM/IgG の上昇パターンはデング熱の初感染患者と似ていることが明らかとなった。一方、デングウイルス 2 型既感染のマーモセット 4 個体では、高価な DENV-1 (10⁹~10¹² PFU/dose) の接種により、極期のウイルス血症はヒトと同等なレベル (~7.5PFU/mL) が認められたが、ウイルス血症の持続期間は通常より短く 3 日以内であった。一方、接種ウイルス量を 10³~10⁶ PFU/dose) に減らすと極期のウイルス血症は 10 倍より低くなるが (~5.6PFU/mL)、ウイルス血症の持続期間は約 1 週間であった。いずれの再感染のマーモセットにおいても感染性ウイルス-抗体複合体は Fc γ R 発現細胞にて検出できた。

ワクチン株及び親株の接種を受けた 8 個体においては、感染防御 (ウイルス血症が検出限界以下) が認められたが、感染歴のない 4 個体 (対照群) においては、ウイルス血症が認められ、さらに、初感染の IgM/IgG 上昇パターンを示した。DENV-1 の感染実験と同様に、DENV-2 ワクチン株接種群 (4 個体)、及び、親株接種群 (4 個体) を用いて、感染実験を行った。また、初回接種半年後、DENV-2 臨床株のチャレンジ実験にて、感染防御が確認できた。

(3-2)同一血清型間の異なる遺伝子型に対する防御効果

ここで、(1)マーモセット 6 個体に対し、DENV2 の内、Asian I 遺伝子型 (グループ A: 3 個体)、及び、同血清型の Cosmopolitan 遺伝子型 (グループ B: 3 個体) の感染実験を行った。すべての 6 個体のマーモセット (グループ A 及びグループ B) に対し、Asian I 遺伝子型ウイルスの攻撃実験を行ったところ、同血清型に対する防御効果が確認できた。しかし、初回接種による誘導された中和抗体価は Asian I 及び Cosmopolitan 遺伝子型に対してもっとも低く、Asian-American 遺伝子型に対する中和抗体価がもっとも高いことが明らかとなった。さらに、1 回目と異なる遺伝子型の接種により、中和抗体価が著しく上昇することが明らかとなった。

(方法-3)感染防御マーカーの探索・同定

以下の方法がマーモセットの解析に有用であるかを検討した。Luminex 法を用いて血中のサイトカイン 10 種類 (IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, IFN γ , GM-CSF, TNF α , IFN α , IL8) を検討したところ、IFN γ のみ反応を示した。市販の Luminex アッセイは、新世界ザルのマーモセット・サイトカインとの交差性が IFN γ 以外、ほとんど検出できないため、引き続きの検討に用いることが困難である。次に、マーモセットのマイクロアレイを用いて PBMC 発現遺伝子を検討した。PCA 主成分分析により、コントロール群 (接種 0 日) は、極期 (接種 2、4 日目) の検体より異なることが明らかで、優位に発現する遺伝子の解析を進んでいる。初感染では、極期においては約 100 個の遺伝子が優位に発現することが明らかとなり、GSEA 解析では多くの遺伝子は免疫細胞 (B 細胞、T 細胞) の誘導に関わっていることが示唆された。

④ 考察・今後の課題

本研究により、デングウイルス感染マーモセットモデル動物は、DENV 弱毒化生ワクチンの接種によってヒトにおけるデング熱ワクチン候補株の接種に類似したウイルス血症、抗体誘導、血液学 (生化学、血球数) 的な変化および症状が出現したことを証明できた。さらに、マーモセットにおける中和抗体価上昇パターンは、デング熱患者、ワクチンの臨床試験と類似することが明らかとなった。以上の結果により、本マーモセットモデル動物は、デングウイルス感染モデル及びデング熱ワクチン評価モデルとして有用であることが明らかとなった。

女性研究者支援 第3回万有医学奨励賞
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	長崎大学熱帯医学研究所
氏 名	モイ メンリン

1. 論文発表実績 (主要5報)

- ・ 主要論文5報については PDF を添付。
- ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。印刷中は in press と記入。

1	<u>Moi ML</u> , Ami Y, Muhammad Azami NA, Shirai K, Yoksan S, Suzaki Y, Kitaura K, Lim CK, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Marmosets (<i>Callithrix jacchus</i>) as a non-human primate model for evaluation of candidate dengue vaccines: induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates. <i>J Gen Virol.</i> 2017 Nov 21. doi: 10.1099/jgv.0.000913. [Epub ahead of print] 査読有
2	Ly MHP, <u>Moi ML</u> , Vu TBH, Tun MMN, Saunders T, Nguyen CN, Nguyen AKT, Nguyen HM, Dao TH, Pham DQ, Nguyen TTT, Le TQM, Hasebe F, Morita K. Dengue virus infection-enhancement activity in neutralizing antibodies of healthy adults before dengue season as determined by using Fc γ R-expressing cells. <i>BMC Infect Dis.</i> 2018 Jan 10;18(1):31. 査読有
3	Urakami A, Ngwe Tun MM, <u>Moi ML</u> , Sakurai A, Ishikawa M, Kuno S, Ueno R, Morita K, Akahata W. An Envelope-Modified Tetravalent Dengue Virus-Like-Particle Vaccine Has Implications for Flavivirus Vaccine Design. <i>J Virol.</i> 2017 Nov 14;91(23). pii: e01181-17. 査読有
4	<u>Moi ML</u> , Nguyen TTT, Nguyen CT, Vu TBH, Tun MMN, Pham TD, Pham NT, Tran T, Morita K, Le TQM, Dang DA, Hasebe F. Zika virus infection and microcephaly in Vietnam. <i>Lancet Infect Dis.</i> 2017 Aug;17(8):805-806. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30412-7. 査読有
5	Yamanaka A, <u>Moi ML</u> , Takasaki T, Kurane I, Matsuda M, Suzuki R, Konishi E. Utility of Japanese encephalitis virus subgenomic replicon-based single-round infectious particles as antigens in neutralization tests for Zika virus and three other flaviviruses. <i>J Virol Methods.</i> 2017 May;243:164-171. 査読有

2. 学会発表実績 (主要5報)

- ・ 主要5件の学会アブストラクト、プログラム等の PDF を添付
- ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。

1	<u>Moi ML</u> , Nguyen CT, Wijesooriya SL, Nguyen TTT, Vu TBH, Le TQM, Morita K, Dang DA, Hasebe F. Seroepidemiological surveillance of Zika virus in Vietnam, 2014-2016. 第 65 日本ウイルス学会学術集会. (大阪) 2017 年 10 月.
2	Bui TT, <u>Moi ML</u> , Nabeshima T, Pham Hoai LL, Pham Thi H, Dang Thi D, Nguyen Thi TT, Le Thi QM, Morita K, Hasebe F. Single amino acid substitution on NS4B protein of dengue virus increases virus fitness in mammalian cells. 第 65 日本ウイルス学会学術集会. (大阪) 2017 年 10 月.
3	<u>Moi ML</u> , Wijesooriya SL, Nguyen CT, Nguyen TTT, Vu TBH, Tun Ngwe MM, Pha, TD, Pham T, Tran T, Le TQM, Dang DA, Hasebe F, Morita K. Zika virus infection and microencephaly in Vietnam, 2014-2016. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity. (兵庫). 2017 年 9 月

4	<u>Moi ML.</u> 古くて新しい～節足動物媒介性感染症～ジカウイルスの世界的な流行と最近の知見(招待講演). 第 160 回日本獣医学会学術集会. (鹿児島) 2017 年 9 月
5	<u>Moi ML.</u> Determination of the role of flavivirus cross-reactive antibodies during Dengue and Zika infection by using common marmosets. The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. (長崎). 2017 年 5 月

