

令和 2 年 4 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08810

研究課題名(和文)自己集合型ナノパーツ(SNAP)による高度偽原虫の創製とワクチンへの応用

研究課題名(英文)Development of advanced pseud-parasite with self-assembly-nanoparts (SNAP) for subunit vaccines

研究代表者

宮田 健(Miyata, Takeshi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：20448591

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文):本研究事業では、いくつかの自己集合型ナノパーツを用いて、組換えタンパク質抗原によるサブユニットワクチンの開発をすすめてきた。ひとつの重要な成果として、効率よく自己集合化し、ワクチン効果の高い分子を構築できたことである。具体的には抗原に分岐鎖を修飾して作出した網目状のような自己集合分子が、動物実験において、顕著な抗体産生応答の増強を示した。この技術を実用化するために、作成方法の最適化研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術は、人獣共通感染症に対するワクチンの開発に資するものであり、2020年現在、人類が直面している未曾有の感染症危機に対する解決策として、重要な技術の基礎を造るものである。ワクチンは最小の費用で、最大の効果を生み出す感染症対策に重要な技術であるが、病原体ごとに適切なワクチン開発を進める必要もあり、実用化に向けた多くの有効かつ多様な戦略を推し進めることが重要である。

研究成果の概要(英文):We have been developing subunit vaccines based on recombinant protein antigens using several self-nanoassembly-parts(SNAPs). In detail, a mesh-like molecule produced by modifying a branched-chain to the antigen showed a remarkable enhancement of the antibody production response in animal experiments. To put this technology to practical use, we are working on the optimization of the method of production.

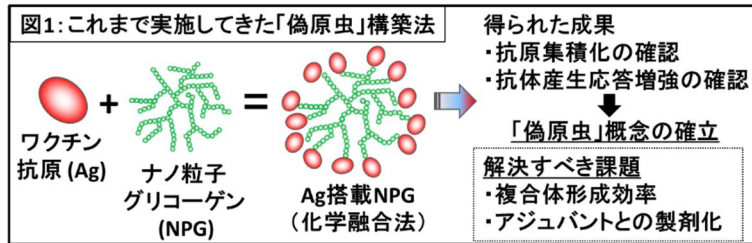
研究分野：ワクチン学

キーワード：マラリア ナノパーツ ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

寄生虫ワクチン開発では、培養の困難さや病原体の大きさなどの理由から、不活化や弱毒化等の従来法ではなく、安全性の高いタンパク質を活用した戦略(コンポーネントワクチン)が重要である。但し、単にタンパク質をそのままワクチン抗原として利用するのではなく、如何に抗原の免疫原性を高めるかがワクチン開発に求められている。その戦略の一つとして、申請者が進めてきた「病原体の模倣(偽原虫)(図1)」がある。これは申請者らが世界に先駆けて開発した特徴的な分岐鎖構造や流動性を有するナノ粒子グリコーゲン(NPG)を足場として利用する原虫表層膜の流動性に似た動的状態を作り出せる画期的なものであり、ペプチド抗原を搭載させたプロトタイプ偽原虫の予備実験結果から、従来のVLPやNP型ワクチンと比べても最低でも同程度以上の感染防御効果を予測していた。しかし、マラリアワクチン候補タンパク質を搭載した偽原虫は、予想をはるかに超えた免疫原性の増強と優れた感染防御能を発揮することが分かった。解決すべき課題は、偽原虫の「形成効率の低さ」である。実用化を見据えた場合、物質生産性の向上は必須である。



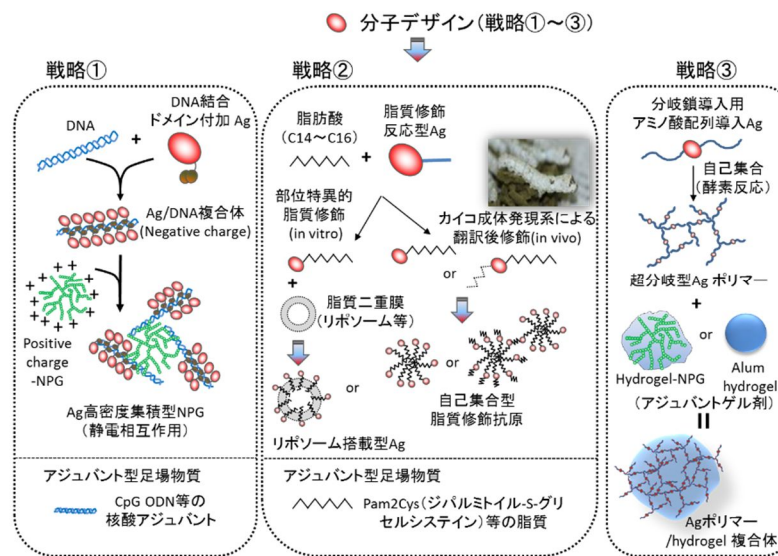
2. 研究の目的

申請者が先に提案したマラリアワクチン抗原を足場物質に高密度に整列させ、病原体表層を模倣した擬似構造「偽原虫」は解決すべき課題もあるが、搭載した抗原の免疫原性を顕著に増強した。このシステムの高度化と実用性を高めることを目的とする。課題である「形成効率」を分子の自己集合技術で解決させ、足場物質に機能性を付与させることで、実用性に優れ、他の病原体への応用が可能な分子設計を実施する。

3. 研究の方法

これまでの偽原虫の構築法は安価で、特異的部位に標的可能なことから化学融合法を採用した。しかし、形成効率は予想よりも低く、根本的な改善の必要性を感じたとともに、少量でも十分に機能を発揮する分子を創出できたことは、その設計概念の有効性を感じるものにもなった。改善にあたって、抗原の足場として開発したNPGが「+(陽)」電荷を有していることに着目した。この「電荷」を、先に申請者らが開発したDNA構造を利用した抗原の集積化技術と概念として融合できないかと発想した

(本集積化技術は偽原虫概念の着想点でもある)予備検証でDNAが効率良くNPGに結合すること、さらにAg/DNA複合体はDNAが有する「-(負)」電荷を保持した状態であることも分かった。これらの先行結果から、両者の融合(Ag高密度集積型NPG)が可能だと確信している。これは、分子間相互作用を利用した複合体形成であり、化学融合法と比べると圧倒的に形成効率が高いと推定している。



実用的で汎用性のある分子デザインとは「足場に搭載させるAgの種類に依存せず、複合体を高効率に形成できること」である。その一つの答えとしてこれまでの問題を解決する戦略を提案するが、異なる挑戦的な分子構築も並行的に実施する(戦略、)。戦略は脂質の活用である。病原体表層膜成分として重要な脂質は難水溶性であり、タンパク質との複合分子デザインは技術的に困難だった。しかし、機能性脂質の合成技術、特異的脂質修飾技術等の成熟により、脂質の活用が現実的になってきた。脂質を利用することで、高効率な構築が困難であった自己集合型脂質修飾抗原(戦略)の創出を試みる。さらに、抗原自身が足場となる超分岐鎖構造体の高効率創製も試みる(戦略)。各戦略の共通概念は「Agを機能型生体高分子(自己集合型ナノパーツ: Self-Nano-Assembly-Parts, SNAP)で自己集合させること」である。

4. 研究成果

前述した方法に記載の戦略 および おける SNAP 型偽原虫の構築を進めた結果、戦略 では、足場である DNA への抗原の結合に用いる構造特異的 DNA 結合ドメインと Pvs25 抗原との融合体を酵母およびカイコ発現系で作出でき、得られた融合体と DNA の複合体の作出に成功した。さらに、この抗原/DNA 複合体の DNA の (-) の電荷を利用して、(+) 電荷を有するナノ粒子グリコーゲン (NPG) と静電相互作用による複合体分子の形成 (Ag 高密度集積型 NPG) の作出に成功した。抗原、DNA、NPG の三者の複合体の機能性評価として、ゲルシフトアッセイ、動物実験によるワクチン機能評価を試みた。その結果、酵母発現系およびカイコ発現系で作出した抗原いずれも抗原単独よりも、抗体産生応答の増強が認められたが、酵母発現系では抗原/DNA 複合体との有意な差は認められなかった。しかしながら、カイコ発現系で作出した抗原は、三者複合体が抗原単体および二者複合体 (抗原/DNA 複合体) よりも、有意に高い抗体産生応答を誘導することが分かった。これはカイコ発現系で作出した抗原の DNA 結合ドメインの機能性が高いことが要因であり、DNA により均一に抗原を配置できた結果だと考えている。

戦略 では抗原への脂質修飾付加が最大のポイントであり、最大のハードルと考えていた。そこで、申請者らが計画していた独自に合成した脂肪酸基質を用いて、酵素的手法で特異的に脂質を修飾させる手法 (in vitro 修飾) に着手した。酵母およびカイコ発現系で作出抗原いずれも脂質修飾に成功したが、脂質配列によっては、凝集することがあり、実用化について大きな課題を残すこととなった。脂質修飾に成功した抗原はワクチン機能評価へと供し、抗体産生応答を検証したが、現状では脂質付加による抗原の機能性向上を認められず、in vitro 修飾の限界と判断した。残された方法としては、ワクチン抗原発現宿主としても利用するカイコ成体を活用する手法 (in vivo 修飾) であり、これはカイコの翻訳後修飾機能を利用し、発現抗原に脂質修飾配列を付与することで、タンパク質に脂質付加された状態で発現が可能となる。しかしながら、作出した脂質付加した抗原の機能性の向上を、予想より認められない可能性があるかと判断し、in vivo 修飾は中断し、戦略 について、注力することにした。

戦略 は抗原の一部を足場とし、自己集合する分子の創製を目的とするものであり、組換え技術で抗原にリンカーアミノ酸配列 (GGGS や GSGS) と「足場かつ分岐点」となる Tyr (チロシン) を導入することで達成できる。この配列によって酵素的に簡便に超分岐鎖型ポリマーが作成できることが分かっており、これをワクチン抗原へと展開応用した。戦略 および と同様に抗原を酵母とカイコで発現させ、リンカーアミノ酸配列と Tyr タグの付与に成功した。この作出した分子を重合させたところ、酵母発現系抗原で数百 kDa 以上の分子重合体が作出でき、カイコ発現系抗原では、数千 kDa 以上の分子重合体が作出できた。この重合体を動物実験で検証したところ、重合体が誘導する抗体産生応答が戦略 および で誘導した抗体産生応答レベルを著しく超えていることが分かった。さらに動物実験で用いるコントロールである不完全フロイントアジュバントよりも有意に高い抗体力価であることも分かり、戦略 が効率性、生産性、機能性も高い SNAPs として優れた分子デザインであることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 1.Kusakisako K, Miyata T, Tsujio M, Galay RL, Talactac MR, Hernandez EP, Fujisaki K, Tanaka T.	4. 巻 74
2. 論文標題 Evaluation of vaccine potential of 2-Cys peroxiredoxin from the hard tick Haemaphysalis longicornis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental and Applied Acarology	6. 最初と最後の頁 73-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10493-018-0209-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ibrahim HR, Isono H, Miyata T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Nutrition	6. 最初と最後の頁 273-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aninu.2018.05.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 3.Masuda A, Lee JM, Miyata T, Sato T, Hayashi S, Hino M, Morokuma D, Karasaki N, Mon H, Kusakabe T.	4. 巻 99
2. 論文標題 Purification and characterization of immunogenic recombinant virus-like particles of porcine circovirus type 2 expressed in silkworm pupae.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 917-926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001087.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮田 健
2. 発表標題 組換えタンパク質抗原によるマラリアサブユニットワクチンの可能性
3. 学会等名 第2回 食薬ヘルスイノベーション研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原 浩一、李 在萬、日下部 宜宏、南畑 孝介、高原 茉莉、神谷 典穂、イブラヒム ヒッサム、宮田 健
2. 発表標題 酵素反応を利用した分子デザインによる機能性ワクチン抗原の作製とマラリアワクチンへの応用
3. 学会等名 第22回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原 浩一、門川 淳一、李 在萬、日下部 宜宏、宮田 健
2. 発表標題 ナノ粒子多糖 (NPG) と DNA を利用した新規マラリアワクチン開発基盤技術の構築
3. 学会等名 第70回日本寄生虫学会南日本支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮田 健、李 在萬、日下部宜宏
2. 発表標題 カイコ発現マラリアワクチン抗原の機能性について
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mio Akutsu, Hikaru Nakazawa, Takeshi Miyata, Mitsuo Umetsu
2. 発表標題 Potential of aggregated antigens for strong immunity
3. 学会等名 11th Annual PEGS Europe (LISOBN, PORTGAL) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	門川 淳一 (Kadokawa junichi) (30241722)	鹿児島大学・理工学域工学系・教授 (17701)	