

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07466

研究課題名(和文)糖脂質抗原を用いた新たな老化予防ワクチンの開発

研究課題名(英文) Investigation of vaccines using glycolipid antigens for anti-aging

研究代表者

岩部 裕香 (Iwabu, Yuka)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30738266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、低度の炎症疾患である老化への予防において、糖脂質抗原が良い標的となると考え、老齢変異型とされる自然発症免疫疾患マウスモデルを使い、免疫システムの解明と糖脂質ワクチンの開発を行った。方法は合成糖脂質抗原を設計しマウスに免疫し、抗体価を確認後、ワクチン投与前後のマウスの血清から、免疫グロブリンIgGを精製して糖鎖構造を分析した。結果、N-glycan Complex type bi-antennary構造に加えて、core fucose構造が多く存在することが分かった。また、ワクチン投与群では、IgG糖鎖構造に変化が見られたが、無投与群と比較して体重、死亡率に影響は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は核酸(ゲノム)、タンパク質に続く第3の生命鎖として、生命現象のカギとなる。生体内には様々な構造の糖鎖が存在するため、全身性自己免疫疾患や低度の炎症疾患(老化)など細胞内代謝の僅かな変化を捉える指標として糖鎖をターゲットとした。免疫グロブリンIgGは重鎖および軽鎖からなる糖蛋白質であり、多様な糖鎖は重鎖の定常領域に存在する。IgGの定常領域に存在するN結合型糖鎖を解析することで、テロメアよりも優れた老化マーカーとなる。糖脂質抗原を用いたワクチンの開発は、新しい創薬のターゲットとして、さらに癌の発生などの初期ステージにおける診断薬や早期治療に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Glycolipid antigens are good targets in the early stages leading to chronic inflammation and in the prevention of low-grade inflammatory diseases of aging. In this study, we aimed to elucidate the immune system and develop a glycolipid vaccine using a mouse model of spontaneous immune disease, which is considered an old age variant. We designed specific synthetic glycolipid antigens, which are considered to be glycan markers of chronic inflammation, and immunized mice with them. After confirming the antibody titer, immunoglobulin IgG was purified from the serum of mice before and after vaccine administration and analyzed for glycan structures. As a result, the IgG analysis showed that in addition to the N-glycan complex type bi-antennary structure, the core fucose structure was present in large numbers. Although there were changes in the profiling of IgG glycan structures in the vaccine-treated group, there was no effect on body weight or mortality compared to the no-treated group.

研究分野：炎症

キーワード：複合糖質ワクチン 免疫 老化 糖鎖 癌

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸(ゲノム)、タンパク質に続く第3の生命鎖として、生命現象のカギとなる。また、複合糖質の糖鎖は細胞の発生や分化に深くかかわっており、高度の炎症疾患(癌)のような劇的な変化だけでなく、全身性自己免疫疾患や低度の炎症疾患(老化)など細胞内代謝の僅かな変化や、さらに癌の発生などの初期ステージにおいてもワクチンによる予防に適しているのではないかと考えた。

実際に、糖鎖は標的とする細胞で機能し基質特異性があるために抗原となりやすい。臨床分野においても、糖脂質あるいはムチン型糖鎖をエピトープとするモノクローナル抗体が有効な診断薬として開発されている。近年、複合糖質を抗原とした癌免疫療法の研究が進み、細胞表面の糖鎖構造が変質を受けた腫瘍関連糖鎖抗原(tumor-associated carbohydrates antigens)が報告されている。

一方、免疫グロブリン IgG は Fc 領域に N 結合型糖鎖部位を一箇所(二量体で二箇所)持ち多様な糖鎖構造が形成される。医療での応用としては、免疫グロブリン大量静注療法に応用され、投与する IgG の Fc-N 結合型糖鎖 にシアル酸を過剰に付加すると抗炎症効果を高めることができる(Hess C *et al*, J Clin Invest.2013; Anthony RM *et al*, Science.2008)。糖蛋白質のアスパラギン結合型糖鎖(N-結合型糖鎖)は、レセプターを介した遺伝情報や細胞内転送機構のシグナルとして働き、癌細胞の転移能や増殖にも関わることが報告されている。したがって、IgG の Fc-N 結合型糖鎖 は IgG-G2 (シアル酸付加) 構造では抗炎症反応を、また IgG-G0 (シアル酸欠失) 構造では炎症反応を亢進させることが推定される。

以上の背景を踏まえ、シアル酸欠失構造である特異的な IgG-G0 糖鎖の蓄積を防ぐ特異的な糖脂質ワクチンを設計し本研究を遂行した。

2. 研究の目的

複合糖質ワクチンは、抗原を糖鎖・糖脂質にしているため、細胞内代謝の僅かな変化を標的とすることができる。慢性炎症に至る初期ステージや、低度の炎症疾患(老化)に対するワクチンによる予防を考えたとき、糖脂質抗原は良い標的となる。本研究では最終目標として、自然の老化、つまり低度であるが確実に進行している炎症疾患への効果を目的とする。

疾患特異的な合成複合糖質ワクチンの設計

免疫グロブリン IgG は多様な糖鎖構造が形成されており、IgG の Fc 領域の N 型糖鎖構造を解析することで、テロメアよりも優れた老化マーカーになることが報告されている。我々は IgG-G0 (Pro-inflammatory for immunotherapy) 糖鎖抗原を持つワクチンを複数設計・合成して、マウスでの抗体価の上昇度から抗原候補配列を絞り込んだ。今後、シアル酸欠失構造である特異的な IgG-G0 糖鎖の蓄積をワクチン技術により抑制するような、複合糖質を抗原とした治療ワクチンの開発を検討する。

合成複合糖質ワクチンの薬効評価

IgG-G0 ワクチンを合成して、キャリア蛋白である KLH とアジュバントを同時投与し、疾患特異的な複合糖質ワクチンの設計の最適化を図る。薬効評価として、老齢変異型とされ

る自然発症免疫疾患マウスモデル NZBW/F1 及び MRL/lpr マウスを用い、疾患特異的な糖鎖構造を解析して評価する。次に異常な構造を持つ糖鎖の蓄積を抑制する治療ワクチンを投与して、疾患特異的な糖鎖修飾や糖脂質ガングリオシドが変化(例えば、減少)することに依る個体における作用を検証する。並行してモデル動物の脾臓から B 細胞の FACS 解析により、複合糖質ワクチンがどのような免疫細胞を活性化させているのかを検証する。

3. 研究の方法

まず、IgG-G0 糖鎖抗原を持つワクチンを複数設計し、抗原として化学合成させた人工糖脂質をワクチンとして用いる。設計にあたり、正常細胞や癌細胞、自己免疫疾患患者に存在するさまざまな糖鎖のうち、報告が多かった構造を抗原の候補とする。合成された抗原を Balb/c マウスに 3 回免疫し、免疫後の血液を定期的に採取して抗体価を測定し、高い抗体価を確認できなかった抗原は、候補から外す。上記の方法で、選択された特異的な合成糖脂質ワクチンを投与したマウスの血中に、ターゲットの糖鎖構造を認識する抗体が産生されていることを確認する。

老齢変異型とされる自然発症免疫疾患マウスモデルとして、6-8 週齢の雌 NZBW/F1 および MRL/lpr マウスを本研究で使用し、自然発症免疫疾患マウスにおける B 細胞の機能評価も行う。NZBW/F1 マウスの病態の悪化は生後 8 週齢以降から、MRL/lpr マウスの病態の悪化は生後 6 週齢以降から見られるため、ワクチンを両マウスに生後 6 週齢から 2 週間隔で 3 回投与し、12 週齢のマウスを脱血させて血清を分離後-20 度で凍結保存する。免疫後の血液は定期的に採取して抗体価を測定し、末梢血と脾臓から血液細胞を抽出して FACS 解析を行う。ワクチン投与群に対するコントロール群として、その溶媒である phosphate buffered saline (PBS) を投与し、脱血後に脾臓、肝臓、唾液腺、腎臓、肺を摘出し病理組織学解析を行う。

ワクチン投与前後の IgG 糖鎖構造解析は下記の手順で行う。NZBW/F1 及び MRL/lpr マウスに抗原を 3 回免疫し、免疫後の血液を定期的に採取して抗体価を測定する。末梢血と脾臓より得られた血液細胞を氷上で融解し濾過後、Protein A を用いたアフィニティークロマトグラフィーにて IgG を精製する。精製後、マウスモノクローナル抗体と共量を振って 10-20% グラジエントゲルにアプライし、銀染色で検出して IgG 濃度を求め、十分に精製された IgG は重鎖と軽鎖のみバンドとして検出されることを確認して糖鎖プロファイリング作業を行う。糖鎖プロファイリングは Cy3 による糖鎖の標識を行い、レクチンチップにアプライして GlycoStation Tools Pro Ver.1.5 による数値化を行う。

本研究は上記手順で、ワクチン投与前後のマウスの血清から、免疫グロブリン IgG を精製して糖鎖構造を分析しプロファイリングを行う。脾臓細胞から得られた末梢性 B 細胞の FACS 解析の結果と併せて、老化から病態発症の過程までのあいだ、変化する糖鎖構造を経時的に同定する。

4. 研究成果

合成された抗原を Balb/c マウスに 3 回免疫し、免疫後の血液を定期的に採取して抗体価を測定し、抗原のセレクションを行った。選択された抗原を自己免疫疾患モデルマウスである 2 種類の系統、NZBW/F1 及び MRL/lpr マウスに 3 回免疫し、免疫後の血液を定期的に採取して抗体価を測定し、ターゲットの糖鎖構造を認識する抗体が産生されたことを確認

した。B 細胞の FACS 解析では、自己免疫疾患自然発症モデルである NZBWF1 マウス及び MRL/lpr マウス、C57BL/6 マウスの脾臓から、B 細胞を単離・標識をしてワクチンの投与前後の群間比較を行った。

脾臓細胞から得られた末梢性 B 細胞の FACS 解析より、同じ週齢の C57BL/6 マウスと比較したところ、NZBWF1 マウス及び MRL/lpr マウスでは CD138 陽性 B 細胞のうち Blimp1^{high} 細胞が多くみられた。ワクチンの投与前後において、B220⁺CD138⁺Blimp1⁺ 細胞 と B220⁺CD138⁺Blimp1^{high} 細胞の数の変化は見られなかった。

糖鎖プロファイリング技術を用いた糖鎖構造の解析より、C57BL/6 マウス、NZBWF1(6 週齢)、NZBWF1(12 週齢)、ワクチン投与後 NZBWF1(12 週齢)の IgG 総量はほぼ同じであった。病態発症後 NZBWF1(12 週齢)では *N*-glycan Complex type bi-antennary 構造(二本側鎖をもつ *N*-結合型糖鎖構造)が多く、加えて core fucose 構造(コアフコース糖鎖)も多く存在した。この糖鎖構造が自然発症免疫疾患モデルに特徴的な構造であるかどうかについては、さらなる解析が必要である。また両モデルにおいて、病態の進行とともに、フコースが結合している構造が多く検出され、その多くはコアフコース結合である可能性が示唆されたため、これまでの報告から IgG 上のコアフコース結合が多いと IgG と Fc 受容体上の糖鎖との相互作用に障害が生じるため、IgG と Fc 受容体との親和性が低下することや、コアフコースの欠損によってその親和性が亢進することが示された。また先行文献よりリウマチに罹患する前後の関節痛患者の抗シトルリン化ペプチド抗体(ACPA)を比較すると、罹患後の患者の ACPA において、GlcNAc 構造を末端に持つ糖鎖が増加すること、ガラクトース糖鎖構造とシアル酸糖鎖構造の欠損が亢進するという報告があり、この点は老齢変異型とされるモデルマウスを用いた今回の解析結果と一致した。モデルマウスにおける IgG 上の糖鎖異常において、ワクチンを投与することにより改善されるか否かについては、ガラクトース糖鎖構造とシアル酸糖鎖構造においても今後さらなる分析が必要である。

また、上記のモデルマウスから精製された IgG の *O*-結合型糖鎖構造が占める割合は少なかったが存在していた。MRL/lpr マウスから精製された IgG 糖鎖構造においても、NZBWF1 マウスの病態発症前後と同様の結果が見られた。また、両マウスにおいて、ワクチン投与後には GlcNAc 1-4 構造をもつ糖鎖は減少することが分かった。ワクチン投与群では、無投与群と比較して体重、死亡率など個体における悪影響は見られなかった。上記の解析結果から、IgG 生成率が高いほど上記の特徴は顕著に見られ、溶媒をアプライしたレーンからは IgG 以外のバンドは一切見られなかったため、解析された糖鎖構造は IgG であると示唆された。今後は、長期間にわたるワクチンの投与と糖鎖構造の関与による解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroshi Koriyama*, Yuka Ikeda*, Hironori Nakagami, Munehisa Shimamura, Shota Yoshida, Hiromi Rakugi, Ryuichi Morishita. * These authors contributed equally to this work. Vaccines.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Development of an IL-17A DNA Vaccine to Treat Systemic Lupus Erythematosus in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccines (Basel).	6. 最初と最後の頁 83-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines8010083	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田裕香、中神啓徳、森下竜一
2. 発表標題 Efficacy of anti-IL17A vaccine in lupus-like nephritis model
3. 学会等名 第 16 回 日韓血管生物合同シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田裕香、郡山弘、中神啓徳、森下竜一
2. 発表標題 Effect of anti-cytokine vaccine in lupus-like nephritis mode
3. 学会等名 第 47 回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田裕香、中神啓徳、森下竜一
2. 発表標題 ループス腎炎モデルにおける抗 IL17A ワクチンの有効性
3. 学会等名 脳心血管抗加 齢研究会2018（第16回学術集会）
4. 発表年 2018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	森下 竜一 (Morishita Ryuichi) (40291439)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	
研究分担者	中神 啓徳 (Nakagami Hironori) (20325369)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	
研究分担者	島村 宗尚 (Shimamura Munehisa) (60422317)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授 (14401)	

	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
研究協力者	郡山 弘 (Koriyama Hiroshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------