

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10097

研究課題名(和文) 高齢者における歯肉溝経由ワクチンの有効性とその実際

研究課題名(英文) Gel vaccine designed to co-stimulate both humoral and cellular immunity ideal for elderly vaccination

研究代表者

Cueno Marni (CUENO, Marni)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：20569967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：混合抗原をGCに補給することで特異抗体の産生誘導について調査した。まず、分子ドッキングを介して3つの代表的な抗原をキサンタンジェルでのカプセル化した。次にワクチン接種によりCNS脱髄の可能性から、接種により生ずる有害な影響を確認するためにCNS脱髄生化学的ネットワークを確立した。最後に免疫応答誘導の最適抗原濃度を解明し、(1)キサンタン分子はエピトープ曝露を妨害しない。(2)ジェルカプセル化は構造安定性を高めた。(3)CNS脱髄は主にWNT/ベータ-カテニン経路で影響を受けた。(4)抗原濃度100 µg/mLで抗体応答を誘発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴い口腔内歯肉溝(GC)の拡大と脆弱がみられることから、歯肉溝内の歯周病原性細菌が歯肉粘膜に入り込み易くなり、侵入した細菌が全身に影響をもたらす可能性が高い。これまでの研究で、GCは細菌の侵入経路であることを模倣し、ジェルカプセル化しGCに補給した単一の抗原が同経路で全身性免疫応答を引き起こす可能性を明らかにした。しかし、混合の抗原を用いて同様の実験を実施した場合に同等の全身性免疫応答を誘発するか否かは不明である。

研究成果の概要(英文)：We established the CNS demyelination biochemical network in order to determine potential protein markers associated with any possible harmful effects associated with GC vaccination since vaccination with high levels of antigen may impact nerves causing CNS demyelination. Lastly, we elucidated the optimized antigen concentration to induce an immune response. Throughout this study, we were able to found the following: (1) xanthan molecules encapsulating an antigen does not interfere with epitope exposure; (2) gel-encapsulation enhances antigen structural stability; (3) CNS demyelination is mostly affected at the WNT/beta-catenin pathways; and (4) gel-encapsulated antigens elicit antibody response at 100 microgram per mL.

研究分野：免疫学

キーワード：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

高齢者は中年・若年層と比較して感染症に罹りやすいことから、加齢に伴う免疫機能の低下は高齢者の感染発生率および重症度の増加に深く関与するものと考えられる。さらに、これらの感染症の罹患はしばしば長期的な後遺症と関連しており、虚弱、自立の喪失、さらに日常活動への影響が生じる可能性がある。これらの点から、高齢者の感染症の発症予防は非常に重要である。

一方、感染症の予防接種は発症予防の中で最も効果的な方策である。現在、いくつかの国では高齢者へのワクチン接種を推奨しており、高齢者に対するワクチン接種法の研究が多数報告されている。しかし、これまでに高齢者用に承認されたワクチンには欠点や限定された有効性などの問題点があることから、新たな高齢者用ワクチンへの関心が高まっているとともに、その開発は必須である。

### 2. 研究の目的

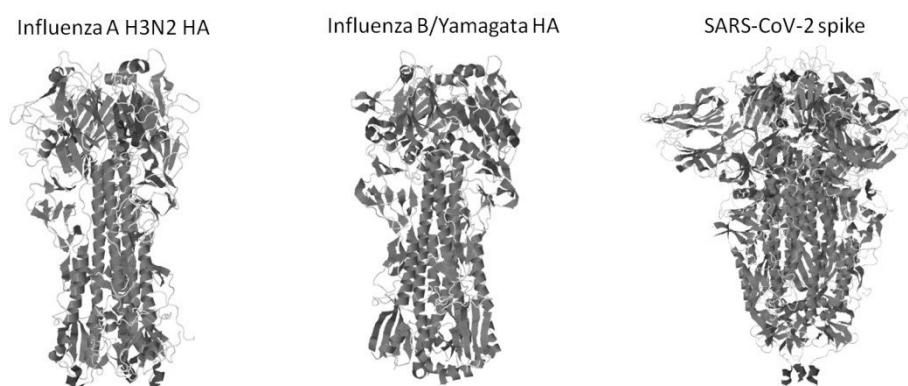
我々は、歯肉溝 (GC) から病原微生物の侵入が認められることにヒントを得て、ジェルに混和した単一の抗原を GC に注入したところ、抗原が吸収されて全身性免疫応答を引き起こす可能を確認した。しかし、混合抗原を同経路で用いた場合、接種などの他経路と同等の全身性免疫応答を誘発するか否かについては未だ不明である。本研究では、ジェルに混合した複数の抗原を用いて GC 経路による抗体の誘導量について調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、標的エピトープの露出を確認するために分子ドッキングを介して3つの代表的な抗原(インフルエンザ H3N2 HA、インフルエンザ B /山形 HA、SARS-CoV-2 スパイク)をキサンタンジェルと混合させてサンプルを作製した。次に、SD 系雄ラットを3群に分け、1群をプラセボ群、残りの2群はサンプル投与群とし、低抗原用量混合(1抗原あたり 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )および高抗原用量(抗原あたり 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )を GC 内に投与した。CNS 脱髄経路の評価に理想的な生化学的ネットワークは、Cytoscape を使用して確立した。

### 4. 研究成果

供試した3つの抗原すべてのタンパク質構造を生成することができた[インフルエンザ A H3N2 血球凝集素 (HA)、インフルエンザ B /山形血球凝集素 (HA) および SARS-CoV-2 スパイク]。最初に、単量体タンパク質構造が各標的抗原に対して作成され、その後、各抗原は自然界に見られるものと同様の三量体タンパク質として組み立てられました。設計された三量体タンパク質モデルの精度を確認するために、RMSD 測定と接触マッピングを実施したところ、設計されたすべての三量体タンパク質モデルは正確であると確認し、次の実験でのさらなる分析に使用した。

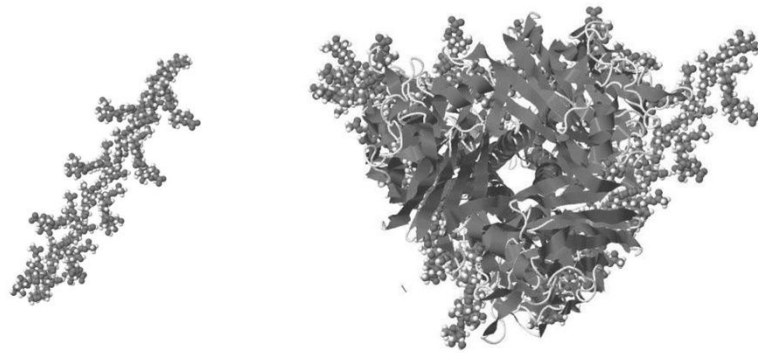


**Figure 1.** Three protein structures designed and used for GC vaccination. (Left panel) Influenza A H3N2 hemagglutinin. (Middle panel) Influenza B/Yamagata hemagglutinin. (Right panel) SARS-CoV-2 spike.

各標的抗原のジェルカプセル化は複数のキサンタン分子を使用した。認識可能な標的エピトープをブロックしないことを確認したところ、キサンタン分子の分子ドッキング後に各標的抗原の受容体結合ドメインの露出が認められた。これは、ジェルのカプセル化がエピトープ認識を阻害しないことを意味する。さらに、ジェルにカプセル化された抗原は室温で安定していることが判明した。これは、ジェルキサンタン分子でカプセル化された抗原が、GC ワクチンを設計するときに重要な熱損傷を防ぐのに役立つことが判明した。

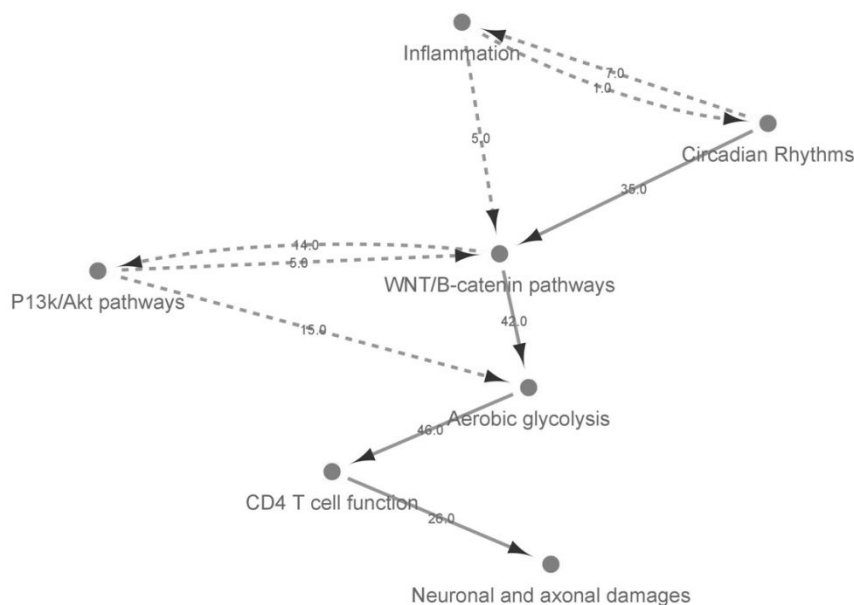
Xanthan molecule

Antigen encapsulated by xanthan molecule



**Figure 2.** Representative protein gel-encapsulation using xanthan molecule. Proposed gel-encapsulation showed that potential antibody epitopes were not blocked by the xanthan molecule.

CNS 脱髄経路全体の中で、ネットワークを設計し、ストレス、近似性、関連性、離心率、およびエッジ間中心性の測定値を使用してネットワークを分析した。すべての中心性測定は、CNS 脱髄経路に関連する主要な経路として WNT/ベータ-カテニン経路を指していることがわかった。ワクチン投与が CNS 脱髄につながる可能性があることを考慮して、GC ワクチン投与がニューロンおよび軸索の損傷を引き起こしたかどうかの手がかりを与えることができる CNS 脱髄ネットワーク内の潜在的なマーカーをチェックした。その結果、CNS 脱髄の潜在的なマーカーが WNT/ベータ-カテニン経路内に見られることを示唆した。



**Figure 3.** Network design and centrality analysis of the CNS demyelination pathway. Centrality measurements show that proteins in the WNT/B-catenin pathway are potential markers for vaccination-induced CNS demyelination induction.

まず、各標的抗原に対する抗体応答を誘導するために、理想的な抗原：ゲル比を確認したところ、各抗原のゲル濃度 1mL あたり 100  $\mu$ g により、GC ワクチン接種を受けた 77 日齢の SD ラットで抗体産生が可能になることが判明した。2 つの標的抗原を組み合わせると、2 つの抗原の組み合わせで 1mL あたり 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> のジェル濃度で GC ワクチン接種を受けた 77 日齢の SD ラットで抗体産生が可能になることがわかった。現時点では、3 つの標的抗原の抗原：ゲル比濃度についての設定は検索中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Marni E Cueno, Kenichi Imai	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural Comparison of the SARS CoV 2 Spike Protein Relative to Other Human-Infecting Coronaviruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2020.594439	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 Marni E Cueno, Miu Ueno, Rinako Iguchi, Tsubasa Harada, Yoshifumi Miki, Kanae Yasumaru, Natsumi Kiso, Kanta Wada, Koki Baba, Kenichi Imai	4. 巻 8
2. 論文標題 Insights on the Structural Variations of the Furin-Like Cleavage Site Found Among the December 2019-July 2020 SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein: A Computational Study Linking Viral Evolution and Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2021.613412	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 Marni E.Cueno, Kanako Iguchi, Kanta Suemitsu, Marina Hirano, Kosei Hanzawa, Takemasa Isoda, Miu Ueno, Rinako Iguchi, Aoi Otani, Kenichi Imai	4. 巻 97
2. 論文標題 Structural insights into the potential changes in receptor binding site found in the influenza B Yamagata hemagglutinin: A putative correlation between receptor binding site structural variability and seasonal infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Graphics and Modelling	6. 最初と最後の頁 107580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmgs.2020.107580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cueno Marni E.、Imai Kenichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Structural Insights on the SARS-CoV-2 Variants of Concern Spike Glycoprotein: A Computational Study With Possible Clinical Implications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 773726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2021.773726	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Marni E. Cueno, Kenichi Imai
2. 発表標題 Structural variations in the influenza B hemagglutinin receptor binding site coincide with viral evolution and infection: A computational study with antiviral applications
3. 学会等名 27th Intelligent Systems for Molecular Biology and 18th European Conference on Computational Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Marni E. Cueno, Kenichi Imai
2. 発表標題 Structural differentiation of the spike glycoprotein from SARS-CoV-2 COVID-19 variants of concern compared to other human-infecting coronaviruses: A computational study with clinical implications
3. 学会等名 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------