

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591201
 研究課題名（和文） 抗原蛋白を表層ディスプレイする遺伝子組換えビフィズス菌を用いた経口ワクチン
 研究課題名（英文） Novel oral vaccine using genetically engineering bifidobacterium displaying antigen on its cell-surface
 研究代表者
 白川 利朗 (SHIRAKAWA TOSHIRO)
 神戸大学・大学院保健学研究科・准教授
 研究者番号：70335446

研究成果の概要（和文）：近年、腸管での粘膜免疫の誘導が感染予防に対して大きな役割を果たすことが期待されており、生きた腸内細菌、プロバイオティクスを、抗原タンパク遺伝子のキャリアーとして応用した経口ワクチンの開発が研究されている。今回、我々は代表的なプロバイオティクスであるビフィズス菌を応用した経口ワクチンの研究開発を実施し、病原体の抗原を表層ディスプレイするビフィズス菌の開発に成功し、そのワクチン効果をネズミ・チフスモデルで確認した。

研究成果の概要（英文）：Genetically modified probiotic bacteria show promise as an antigen delivery vehicle for mucosal immunization. We developed a novel vaccine platform utilizing *Bifidobacterium* as an antigen delivery vehicle for mucosal immunization. Genetically modified *Bifidobacterium longum* displaying *Salmonella*-flagellin on the cell surface was constructed for the oral typhoid vaccine. We confirmed the efficacy of this oral vaccine in a murine typhoid fever model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：感染症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：ワクチン、腸チフス、粘膜免疫、ビフィズス菌

1. 研究開始当初の背景

近年の薬剤耐性菌の蔓延を考慮すれば、感染症流行地域住民への病原菌に対するワクチン投与は理想的な治療戦略である。また腸管感染症の犠牲者の大部分が途上国の乳幼児であることを考慮すれば、ワクチンの形態としては経口ワクチンが理想的である。また注射薬では使用済み注射針の処理の問題があり、途上国での使用においては経口ワクチンが適している。腸管感染症に対する経口ワクチン

ンについては、弱毒化したサルモネラ菌を用いた腸チフス経口ワクチンが存在するが、その副作用のため乳幼児の投与には適さない。今回、われわれはプロバイオティクスとして有用性と安全性が長年、確認されているビフィズス菌を応用した安全で効果的な腸管感染症に対する経口ワクチンの開発を目標とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、粘膜免疫と全身性免疫の両方を効果的に誘導する粘膜ワクチン・プラットフォームを開発することである。ワクチン・プラットフォームには、その安全性と健康促進効果が長年にわたって確認されているビフィズス菌を用い、抗原表面ディスプレイ型ビフィズス菌を応用した腸チフス経口ワクチンを開発する。

3. 研究の方法

(1) 抗原蛋白表面ディスプレイ型ビフィズス菌の作成：サルモネラ菌のフラジェリン抗原遺伝子に、ビフィズス菌由来の ABC トランスポーター基質結合タンパク質、GLBP (galacto-N-biose /lacto-N-biose I-binding) 遺伝子をアンカーとして融合させることにより、抗原表面ディスプレイ型ビフィズス菌を作製する。

(2) 抗原蛋白発現の局在 (表面発現) 確認：遺伝子組み換えビフィズス菌の *S. typhimurium* フラジェリン蛋白の発現は抗フラジェリン抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて、局在については抗フラジェリン抗体を用いた細胞免疫染色を実施し蛍光顕微鏡にて確認する。

(3) マウス実験モデルによる抗原特異的抗体の産生、特異的細胞免疫誘導の確認：マウス実験モデルによる免疫誘導の確認のため、 2.5×10^7 cfu の遺伝子組み換えビフィズス菌を週 3 回、6 週間にわたり BALB/C マウスに経口投与する。フラジェリン抗原特異抗体の産生確認のため、マウスの糞便および血中のフラジェリン特異抗体 (Ig A) を ELISA 法にて定量する。またマウス脾臓よりリンパ球を抽出し、フラジェリン抗原の刺激による INF- γ の分泌を ELISA 法にて測定する。

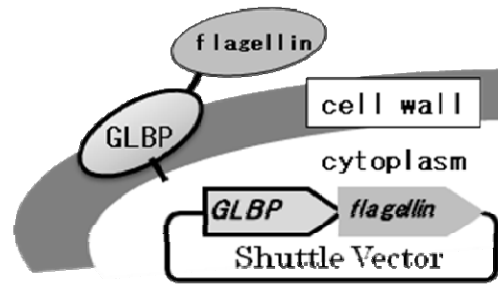
(4) マウス実験モデルによる *S. typhimurium* 感染阻止の確認： 2.5×10^7 cfu の遺伝子改変ビフィズス菌を週 3 回、6 週間にわたり BALB/C マウスに経口投与する。ワクチネーション開始後に *S. typhimurium* の経口投与を行う。本実験により本遺伝子組み換えビフィズス菌の感染予防効果を確認する。

4. 研究成果

(1) 図 1 の模式図のごとく抗原表面ディスプレイ型ビフィズス菌を作製した。

(2) ウェスタンブロッティング法ではフラジェリン-GL-BP 融合タンパクの分子量に相当する 98kDa のタンパクの発現が確認された (図 2)。細胞免疫染色を行った結果、遺伝

子組み換えビフィズス菌表面では蛍光発色 (フラジェリンの発現) が確認されたが親株ビフィズス菌では蛍光発色は観察されなかった (図 3)。



B. longum

図 1、抗原表面ディスプレイ型ビフィズス菌

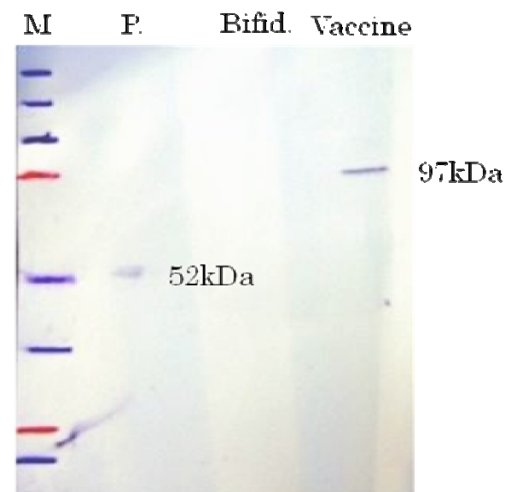


図 2、ウェスタンブロッティング

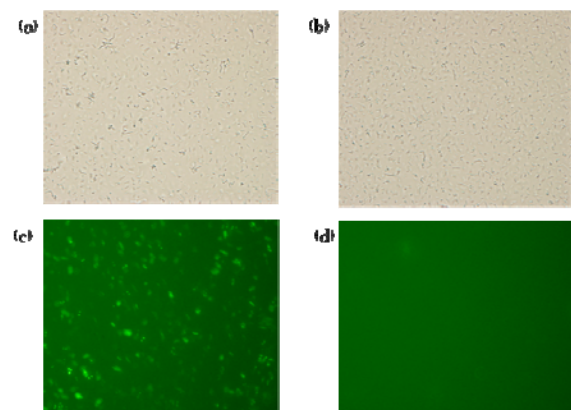


図 3、細胞免疫染色 a, b 遺伝子組み換えビフィズス菌、c, d 親株

(3) 糞便中におけるフラジェリン特異的 IgA 抗体はワクチンを投与されたマウスにおいてワクチン開始後 11, 14 日目に高い発現が見られ、血中の IgA 抗体もワクチンが投与されたマウスのみ高い発現が確認された (図 4)。

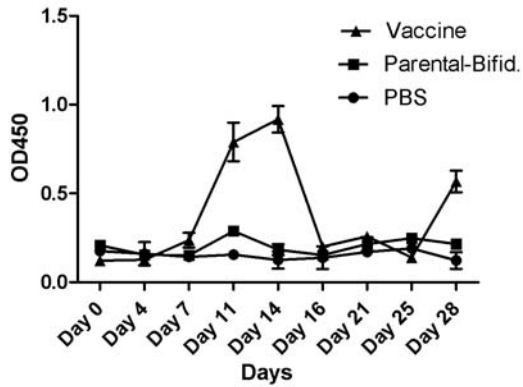


図4、糞便中の抗フラジェリン IgA 抗体

細胞性免疫反応の確認をマウスより抽出した脾臓細胞を用いて検討した。フラジェリンにて刺激した脾臓細胞の培養液中の IFN γ を ELISA 法にて測定した結果、IFN γ の分泌がワクチン群でのみフラジェリンにより刺激された (図5)。

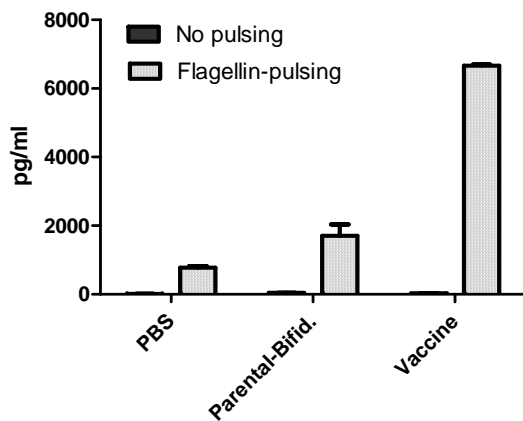


図5、脾臓細胞の IFN- γ 分泌

(4) 感染阻止実験では、PBS 投与群で 14 匹中 12 匹 (平均生存日数 14 日間)、親株ビフィズス菌群で 14 匹中 9 匹 (平均生存日数 25 日間) のマウスが死亡したのに対して、ワクチン投与群では 14 匹中 2 匹しか死亡しなかった (図6)。

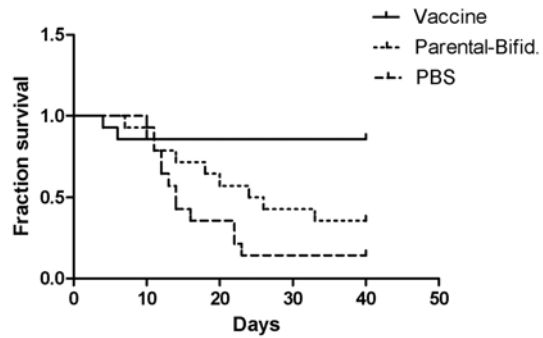


図6、生存曲線

以上の結果より、ビフィズス菌由来の基質結合膜蛋白質の GL-BP を用いることでビフィズス菌表層にフラジェリンが効果的に発現され、それに伴い粘膜免疫が効果的に誘導されたと考えられる。本ワクチンは抗原特異的 IgA 抗体を効果的に誘導し、かつ全身性の免疫、Th1 応答による細胞性免疫誘導し、*S. Typhimurium* の感染によるネズミ腸チフスの発生を予防できることが示唆された。

今回、我々が開発した抗原表層ディスプレイ型ビフィズス菌は新たな経口ワクチン・プラットフォームとして非常に有用であると考えられた。

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1件)

①Yamamoto S, Wada J, Katayama T, Jikimoto T, Nakamura M, Kinoshita S, Lee KM, Kawabata M, Shirakawa T. Genetically modified Bifidobacterium displaying Salmonella-antigen protects mice from lethal challenge of Salmonella Typhimurium in a murine typhoid fever model, Vaccine, 査読あり、Vol.28、 No.41、2010、pp. 6684~6691

[学会発表] (計1件)

①Toshiro Shirakawa, Sakura Yamamoto, Jun Wada, Takane Katayama, Takumi Jikimoto, Masakuni Nakamura, Shohiro Kinoshita, Kyung-Mi Lee, Masato Kawabata, Genetically Engineered Bifidobacterium Displaying Salmonella-Antigen Protects Mice from Lethal Challenge of Salmonella Typhimurium in a Murine Typhoid Fever Model, American Society of Gene and Cell Therapy 13th annual meeting, 2010年5月20日、ワ

シントンDC (米国)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ビフィズス菌表層提示融合タンパク質
発現遺伝子

発明者：白川利朗、山本さくら、片山高嶺、
和田潤、加納康正、島本康介、浅
田雅宣

権利者：神戸大学、森下仁丹 (株)

種類：特許

番号：特願 2009-216256

出願年月日：2009 年 9 月 17 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 利朗 (SHIRAKAWA TOSHIRO)

神戸大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：70335446

(2) 研究分担者

島田 勝 (SHIMADA MASARU)

横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40301452

片山 高嶺 (KATAYAMA TKAKANE)

石川県立大学・生物資源工学研究所・准教授

研究者番号：70346104