

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450427

研究課題名(和文) M13ファージの生体における影響に関する免疫学的解析とワクチンへの応用

研究課題名(英文) M13 phage as a vaccine vehicle

研究代表者

橋口 周平 (Hashiguchi, Shuhei)

鹿児島大学・理工学域工学系・助教

研究者番号：40295275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ファージのg3p分子とg8p分子のいずれかのN末側に、アミロイド ペプチドもしくはスギ花粉アレルゲンであるCry j 1の一部の配列を提示させたファージ粒子を作製し、提示させた抗原エピトープ特異的IgG抗体誘導能について解析した。その結果、外来抗原をg8p分子に提示させたファージでは、一次応答の段階から提示抗原(アミロイド ペプチドもしくはCry j 1)特異的IgG抗体の誘導が認められた。一方、抗原ペプチドをg3p分子に提示させたファージでは、2回目の投与でIgG抗体が認められたことから、抗原分子の提示方法の違いにより、抗体応答誘導のメカニズムが異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：M13 phage stimulate an innate immune response and induce a strong primary IgG response in mice without any inflammatory adjuvant materials. To investigate the efficacy of M13 phage as a vaccine carrier for peptide antigens, the sequences of 1-15 region of A or a B-cell epitope of Cry j 1 were genetically linked to the N terminous of M13 gene 3 protein (g3p) or gene 8 protein (g8p). When C57BL/6 mice were immunized subcutaneously with M13 phage displaying the sequences of 1-15 region of A on their g3p molecules, these mice showed a production of serum IgG against A 42 in two weeks after the secondary immunization. In the case of recombinant phage contains approximately 300 recombinant g8p molecules, serum IgG against A 42 was induced during a primary response. Similar response profiles were observed in M13 phage displaying the sequences of a B-cell epitope of Cry j 1, indicating that there are different immunological mechanisms of phage vaccine between g3p fusion and g8p fusion.

研究分野：免疫学

キーワード：ワクチン バクテリオファージ ファージディスプレイ アジュバント 抗体 ペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

ファージディスプレイ法は、細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージの表面に外来のペプチドやタンパク分子を提示させる技術である。私どもは以前の研究で、アルツハイマー認知症予防に有効なヒト抗体のミモトープの特性を検討する中で、このミモトープを 3~5 コピーしか提示していない M13 ファージをリン酸緩衝液に溶かして皮下に注射するだけで、一次抗体応答の段階で線維状アミロイドに反応する抗体応答を誘導できること、誘導される抗体は IgG クラスであり、ファージに対する抗体応答は MyD88 を欠損したマウスでは完全に消失することより、パターン認識分子を介した自然免疫応答であることを明らかにしている (Biochem Biophys Res Commun 402: 19, 2010; J. Neuroimmunol 236: 27, 2011)。バクテリオファージは生活環境に常在しており、高等動物の脅威とならないことが知られているが、ファージそのものが生体に与える影響については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

これまでの研究成果を踏まえて本研究では、M13 ファージ粒子を担体としたワクチン開発を目的として、1) M13 ファージが誘導する免疫応答の詳細な解析、2) 不活化条件の検討、3) ワクチン抗原の提示方法について検討を行った。

### 3. 研究の方法

(1) M13 ファージの投与により誘導される抗体の抗原特異性を解析するために、M13 ファージを 1%ドデシル硫酸ナトリウムで溶解後、Superdex200 カラムを用いて、M13 ファージの g3 蛋白 (g3p) と g8 蛋白 (g8p) を精製し、M13 ファージを BALB/c マウス、C57BL/6 マウスもしくはヌードマウスに腹腔内投与し血清との反応性を ELISA 法により解析した。また、M13 ファージを SDS-PAGE 後、マウス血清を用いてウェスタンブロットティング解析を行った。

(2) M13 ファージをアミノカップリング反応により蛍光標識後、マウスに投与し、フローサイトメトリー解析により、ファージを認識している細胞集団について解析を行った。

(3) アミロイド ペプチドの 1 番目から 15 番目 (Aβ1-15) のアミノ酸配列を 1 つ、もしくはリンカー配列を用いて 2 つおよび 3 つ連続的につないだワクチン抗原をコードする DNA を合成し M13 ファージベクターに組み込み、組み換えファージベクターを作製した。作製した組み換えファージベクターを有する大腸菌を単離し、培養上清から、アミロイド ペプチドの一部の配列を、M13 ファージの g3p 分子の N 末側に提示させた組み換えファージを精製した。ファージの g8p 分子の

N 末側に Aβ1-15 の配列を組み換えた発現ベクターを作製し、大腸菌に形質転換後、M13 ファージを感染させ、Aβ1-15 を M13 ファージの g8p 分子の N 末側に提示させた組み換えファージを精製した。スギ花粉アレルゲンである Cry j 1 の一部の配列についても組み換えファージを作製した。

(4) 作製したファージを BALB/c マウス、C57BL/6 マウスもしくはヌードマウスに投与 (腹腔内投与もしくは皮下投与) 後、血清を回収し、Aβ もしくは Cry j 1 特異的抗体応答を ELISA 法により解析した。

### 4. 研究成果

(1) M13 ファージが誘導する IgG 抗体の抗原特異性を解析するために、C57BL/6 マウスに M13 ファージ ( $10^{12}$  v/100 μl) を腹腔内投与し、誘導された IgG 抗体をウェスタンブロットティングおよび精製抗原を用いた ELISA 法により解析した。その結果、1 回目の投与後 14 日後の血清において M13 ファージの g3p に結合する IgG 抗体が認められ、投与後 27 日後には g3p 特異的な IgG 抗体に加えて g8p 特異的 IgG 抗体の誘導が検出された。g3p および g8p 特異的 IgG 抗体は、ファージの 2 回目の投与により顕著に増強された。一方、T 細胞を欠損しているヌードマウスに M13 ファージ ( $10^{12}$  v/100 μl) を腹腔内投与したところ、M13 ファージ粒子に結合する IgG 抗体の誘導は認められたが、g3p、g8p に対する抗体応答は認められなかった。以上の結果から、M13 ファージの g3p は強い抗原性を有すること、ヌードマウスで誘導される IgG 抗体は M13 ファージの構造そのものを認識していることが示唆された。

(2) マウス腹腔内に M13 ファージを投与した後に腹腔内に浸潤してくる細胞集団についてフローサイトメトリー解析を行った結果、M13 ファージ投与後 3 時間後に CD11b 陽性細胞、9 時間後には好中球の浸潤が認められ、蛍光標識された M13 ファージは CD11b 陽性細胞への結合が観察された。

(3) 遺伝子組み換えにより、Aβ の 1 番目から 15 番目のアミノ酸配列を M13 ファージの g3 蛋白に提示したファージ (Aβ-g3p ファージ) および g8 蛋白に提示したファージ (Aβ-g8p ファージ) を構築した。ファージを精製後、C57BL/6 マウスにアジュバントなしで皮下投与したところ、Aβ-g8p ファージを投与したマウス群では、一次免疫後から Aβ1-15 特異的 IgG 抗体の誘導が認められた。一方、Aβ-g3p ファージを投与したマウスでは、二次免疫後に初めて Aβ1-15 特異的 IgG 抗体の誘導が認められた。

(4) Cry j 1 の一部の配列をファージの g3p (Cry j 1-g3p-ファージ) あるいはファージの g8p (Cry j 1-g8p-ファージ) に提示させた

ファージをBALB/cマウスに腹腔内投与(10<sup>12</sup> virion/100 μl)し、Cry j 1に特異的なIgG抗体応答をELISA法で解析したところ、Cry j 1-g3p-ファージでは2回目の免疫後にCry j 1特異的IgG抗体の誘導が認められた。一方、Cry j 1-g8p-ファージでは1回目の免疫後からCry j 1特異的IgG抗体の誘導が認められた。誘導されるIgG抗体価は、AB1-15を提示させたファージでは、抗原ペプチドの提示方法に関係なく同程度であったが、Cry j 1エピトープを抗原とした場合は、g3p提示と比較してg8pに提示させたファージで強いCry j 1特異的IgG抗体の誘導が認められた。抗原ペプチドの配列や提示率がファージワクチンの抗体応答誘導能に影響することが示唆された。

#### 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2件)

橋口周平、宮原隆二、岸本聡、伊東祐二、分子標的デザインにおけるファージライブラリー法、日本生物工学会誌 93: 289-292, 2015 (査読無)  
Ryohei Shioya, Ryuji Miyahara, Yoshitsugu Shoji, Kazuhisa Sugimura, Shuhei Hashiguchi, Development of Universal Phage Vaccine Displaying Extracellular Domains of M2e derived from Human Influenza A Viruses, Peptide Science 2014, pp265-266, 2015 (査読有)

##### [学会発表](計16件)

Shuhei Hashiguchi, Ryuji Miyahara, Ryohei Shioya, Yui Matsushita, Akiko Shimotsu, Kazuhisa Sugimura, Immunogenicity of M13 phage vaccine displaying the extracellular domain of matrix protein 2 (M2e) of human influenza A virus, 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)  
宮原隆二、庄司恵二、塩屋亮平、下津堯子、松下由依、杉村和久、橋口周平、M13ファージを担体とした抗AB抗体を誘導するワクチン開発、第34回日本認知症学会学術大会、2015年10月、リンクステーション青森・ホテル青森(青森県・青森市)  
橋口周平、アジュバントの添加を必要としない繊維状ファージ(M13)を担体としたファージワクチンの開発、第158回日本獣医学会学術大会、2015年9月、北里大学獣医学部(青森県・十和田市)  
橋口周平、泊大介、宮原隆二、塩屋亮平、杉村和久、スギ花粉アレルゲンCry j 1のIgE結合エピトープを提示したファ-

ジワクチンによる脱感作効果の検討、第64回日本アレルギー学会学術大会、2015年5月、グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール(東京都・港区高輪)  
Ryohei Shioya, Ryuji Miyahara, Yoshitsugu Shoji, Kazuhisa Sugimura, Shuhei Hashiguchi, Development of universal phage vaccine displaying extracellular domains of M2e derived from human influenza A viruses, 第51回ペプチド討論会、2014年10月、徳島大学大塚講堂(徳島県・徳島市)  
庄司恵二、塩屋亮平、宮原隆二、杉村和久、橋口周平、M13バクテリオファージが誘導する免疫応答の解析、第5回ファージ研究会、2014年9月、三重大学生物資源学研究科大講義室(三重県・津市)  
宮原隆二、塩屋亮平、庄司恵二、杉村和久、橋口周平、アルツハイマー認知症の免疫療法を目指したM13ファージワクチンの設計、第5回ファージ研究会、2014年9月、三重大学生物資源学研究科大講義室(三重県・津市)  
庄司恵二、橋口周平、塩屋亮平、宮原隆二、杉村和久、ファージワクチンの基礎的研究：M13ファージ蛋白を用いた特異的免疫応答の解析、平成26年度日本生化学会九州支部例会、2014年5月、九州大学コラボステーション1(福岡県・福岡市)  
橋口周平、泊大介、塩屋亮平、宮原隆二、庄司恵二、杉村和久、繊維状ファージを担体としたスギ花粉アレルゲン減感作ワクチンの設計、平成26年度日本生化学会九州支部例会、2014年5月、九州大学コラボステーション1(福岡県・福岡市)  
Shuhei Hashiguchi, Masaya Toyonaga, Yoshitsugu Shoji, Kazuhisa Sugimura, Immunological characterization of M13 phage vaccine: Possible involvement of Marginal Zone B cells to generate IgG response and germinal centers in response to M13 phage, 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月、幕張メッセ(千葉県・千葉市)  
Masaya Toyonaga, Shoji Yoshitsugu, Shuhei Hashiguchi, Kazuhisa Sugimura, Medical application of peptide-displaying M13 phage for vaccine vehicle, 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium and 50th Japanese Peptide Symposium (APIPS2013), 2013年11月、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)  
豊永将也、庄司恵二、末広一彦、中倉大輝、中島麻美、徳永麗雅、橋口周平、杉村和久、M13ファージワクチンデザインのためのM13ファージの*in vivo*動態の解析、第86回日本生化学会大会、2013

年9月、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Shuhei Hashiguchi, M13 bacteriophage for a vaccine vehicle. Phage2013, 2013年9月, Oxford, UK

Kazuhisa Sugimura, Teppei Osako, Sotaro Kawabata, Ryuji Miyahara, Tsuyoshi Tsurumaru, Ryusei Oda, Daisuke Tomari, Ryohei Shioya, Shuhei Hashiguchi, Immunological characterization of M13 phage vaccine. International Congress of Immunology 2013, 2013年8月, Milan, Italy

Shuhei Hashiguchi, Masaya Toyonaga, Yoshitsugu Shoji, Takuma Gotanda, Kazuhisa Sugimura. Characterization of antibody responses to M13 phage vaccine: MyD88-dependent and T-cell independent IgG subclass responses. International Congress of Immunology 2013, 2013年8月, Milan, Italy

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋口 周平 (HASHIGUCHI SHUHEI)

鹿児島大学・学術研究院理工学域工学系・助教

研究者番号：40295275