

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420803

研究課題名(和文) 分子ディスプレイを用いたマラリア経口ワクチンの構築とライブラリーの作製

研究課題名(英文) Construction of a library of oral vaccine on malaria using molecular display

研究代表者

芝崎 誠司 (SHIBASAKI, Seiji)

兵庫医療大学・共通教育センター・准教授

研究者番号：50342530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質分子を細胞表面に提示する酵母分子ディスプレイ法により、マラリアなど、遺伝子変異によって抗原分子の変化が顕著な感染症に対して利用できる、簡便な経口ワクチン開発の基盤技術が確立できた。本研究課題では、モデルタンパク質を細胞表面に効率よく提示できるよう、宿主細胞の種類、アンカータンパク質の検討に加え、提示用プラスミドのライブラリー作製、培養諸条件、保存条件などが検討された。

研究成果の概要(英文)：By using molecular display technology in yeast cells, a convenient method to develop oral vaccines such as malaria and other infectious diseases. A model proteins was efficiently displayed on the yeast cell surface. Kinds of host cells and anchoring protein were examined at first. Plasmids for creation of library, cultivate condition and preservative condition of yeast cell were also investigated.

研究分野：バイオテクノロジー

キーワード：分子ディスプレイ

### 1. 研究開始当初の背景

マラリアはハマダラカによって媒介される寄生虫病であり、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、及び卵形マラリア原虫の4種がヒトに感染する。なかでも致死性の高い熱帯熱マラリア原虫は熱帯・亜熱帯地域を中心に流行し、毎年患者数が5億人に達し、さらに100万人以上の死亡が報告されている。一方、国内では持ち込まれる輸入マラリアが度々みられ、熱帯熱マラリアによる死亡例も生じている。近年では、薬剤に耐性を有するマラリア原虫が広がりを見せ、加えて、地球温暖化による流行地域の拡大が懸念されている。このような背景のもと、抜本的な対策としてマラリアワクチンの開発に期待が寄せられ、多くの研究者が取り組んでいるところである。しかしながら、これまで世界的に多大な研究努力が費やされてきたにもかかわらず、未だに実用化されたワクチンはない。

近年、マラリア原虫が発達させた寄生機構の重要なポイントが、遺伝子多型によって防御免疫の標的となる抗原分子を変化させていることが明らかになって来ている。よって、流行しているタイプのマラリア原虫に有効な抗原タンパク質の迅速な調製方法が、ワクチン開発において重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題においては、酵母分子ディスプレイ法を用い、マラリア感染症予防のための経口ワクチンを創製する。酵母表層に抗原タンパク質を提示し、生産宿主そのものにワクチン機能を賦与させ、安価で、投与方法、運搬、保存面においても利便性が高いワクチンを創製することで、簡便なマラリア予防法を流行地域に普及させることが期待できる。さらに、本研究を通じ、抗原の変異にも迅速に対応できる経口ワクチン創製基盤技術を確立する。

### 3. 研究の方法

(1)モデルタンパク質(MP タンパク質)を酵母細胞表層に提示し、ワクチン効果が期待できる培養諸条件を検討した。これまで研究において表層提示系として実績のあるBY4741株、W303-1a株、ならびにMT8-1株を選び、3つの株の間で提示効率について、蛍光染色法を中心に比較を行った。

(2) MP タンパク質分子ディスプレイライブラリー構築を進めた。より効果的なワクチンを構築するため、感染防御、ワクチンの共同研究者と情報交換し、適宜助言を頂きながら進めた。

(3)イメージサイトメータを用いたMPディスプレイ分子数の定量実験を進めた。培養至適

条件について再現性の確認を行った。また、MPディスプレイ細胞の保存期間について、温度、保存液組成、pHの検討を行った。また、凍結保存条件におけるMPタンパク質の安定性についても検討を行った。

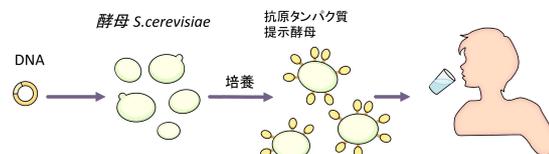
### 4. 研究成果

(1)酵母表層への分子ディスプレイ用マルチコピー型ベクター、pULD1とpFL01にMPタンパク質をコードするDNA配列を酵母細胞に導入した。これらのプラスミドはそれぞれ、アグルチニン、FLO1タンパク質を細胞表層アンカリング領域としているが、pULD1を用いた場合に最も多くの提示量を計測することができた。さらに、検討した細胞の種類では、3つの宿主細胞の中で、BY4741株が最も提示分子数が多いことが確認された。

(2)MPタンパク質の特定の10アミノ酸領域を標的としたPCRによる変異導入では、多様なクローンを得る事ができたものの、ライブラリー化に十分な置換を確認するには至らなかった。標的領域を変更し、変異導入方法については今後も検討を続ける。

(3)イメージサイトメータを用いたMPディスプレイ分子数の定量実験では、40~48時間で最も多くのMPタンパク質分子が提示されることが明らかとなった。また、MPディスプレイ細胞の保存期間は、4において、PBS(pH7.2)に懸濁後、3週間までは安定である事が確認された。また、凍結保存条件におけるMPタンパク質の安定性については、グリセロール濃度を20~35%に設定した場合、最も多くのタンパク質の残存を確認することができた。

下図のように、酵母分子ディスプレイ法により、マラリアなど、遺伝子多型によって抗原分子の変化が顕著な感染症に対して利用できる、簡便な経口ワクチン開発の基盤技術が確立できた。



図：分子ディスプレイによる経口ワクチンの概念

### 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 9件)

Moriya N, Shibasaki S, Karasaki M, Iwasaki T, The Impact of MicroRNA-223-3p on IL-17 Receptor D Expression in Synovial Cells., PLoS

One. 査読有、2017 Jan 5;12(1):e0169702. doi: 10.1371/journal.pone.0169702.

芝崎誠司、植田充美、分子ディスプレイ法を用いた酵母ならびに乳酸菌経口ワクチンの創製、科学と工業、査読有、2016, 90(7), 218-224.

Shibasaki S, Karasaki M, Aburaya S, Morisaka H, Takeda Y, Aoki W, Kitano S, Kitano M, Ueda M, Sano H, Iwasaki T, A comparative proteomics study of a synovial cell line stimulated with TNF- $\alpha$ , FEBS Open Bio. 査読有、2016 Mar 31;6(5):418-424. doi: 10.1002/2211-5463.12049.

Shibasaki S, Ueda M, Oral Vaccine Development by Molecular Display Methods Using Microbial Cells, Methods Mol Biol. 査読有、2016;1404:497-509. doi:10.1007/978-1-4939-3389-1\_32.

Kitahara N, Morisaka H, Aoki W, Takeda Y, Shibasaki S, Kuroda K, Ueda M, Description of the interaction between *Candida albicans* and macrophages by mixed and quantitative proteome analysis without isolation., AMB Express. 査読有、2015 Dec;5(1):127. doi: 10.1186/s13568-015-0127-2.

Shibasaki S, Kitano S, Karasaki M, Tsunemi S, Sano H, Iwasaki T, Blocking c-Met signaling enhances bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation., FEBS Open Bio. 査読有、2015 Apr 20;5:341-347. doi: 10.1016/j.fob.2015.04.008.

Shibasaki S, Karasaki M, Gräslund T, Nygren PÅ, Sano H, Iwasaki T, Inhibitory effects of H-Ras/Raf-1-binding affibody molecules on synovial cell function., AMB Express. 査読有、2014 Dec;4(1):82. doi: 10.1186/s13568-014-0082-3.

Shibasaki S, Tsunemi S, Kitano S, Sekiguchi M, Sano H, Iwasaki T, Differential regulation of c-Met signaling pathways for synovial cell function, Springerplus. 査読有、2014 Sep 23;3:554. doi: 10.1186/2193-1801-3-554.

9 Shibasaki S, Karasaki M, Tafuku S, Aoki W, Sewaki T, Ueda M., Oral Immunization Against Candidiasis Using *Lactobacillus casei* Displaying Enolase 1 from *Candida albicans*., Sci Pharm. 査読有、2014 Jul 23;82(3):697-708. doi: 10.3797/scipharm.1404-07.

〔学会発表〕(計 13 件)

芝崎誠司、唐崎美樹、青木航、植田充美、

分子ディスプレイ法を用いた酵母ならびに乳酸菌経口ワクチンの効果、2015年9月1日、日本防菌防黴学会 第42回年次大会、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

植田充美、森坂裕信、岩崎剛、芝崎誠司、高齢化社会での関節リウマチの真の発症原因をもとめて - モノリスナノ LC/MS/MS 解析の導入 -, 京都バイオ計測センターシンポジウム「健康管理のためのバイオ計測の展開」、2015年8月3日、京都市産業技術研究所(京都府京都市)

油屋駿介、森坂裕信、武田裕美子、芝崎誠司、青木航、水口博義、岩崎剛、佐野統、植田充美、超ロングモノリスキャピラリーカラムを用いたプロテオーム解析による関節リウマチ発症機構の解析、日本プロテオーム学会 2015年會、2015年7月24日、くまもと森都心プラザ(熊本県熊本市)

Seiji Shibasaki, Mitsuyoshi Ueda, Immunization with antigen displayed microbial cells by molecular display technology against candidiasis, FEMS 6th Congress of European Microbiologists, 2015年6月10日、MECC Maastricht(The Netherlands)

武田裕美子、北原奈緒、森坂裕信、芝崎誠司、岩崎剛、佐野統、植田充美、関節リウマチ発症機構の解明に向けたプロテオーム解析の活用、第37回日本分子生物学会年會、2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

芝崎誠司、植田充美、感染症研究における生化学的イノベーションの最前線、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、国立京都国際会館(京都府京都市)

芝崎誠司、植田充美、分子ディスプレイ技術とプロテオーム解析を用いた次世代型経口ワクチンの開発、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、国立京都国際会館(京都府京都市)

武田裕美子、北原奈緒、森坂裕信、芝崎誠司、岩崎剛、佐野統、植田充美、スーパープロテオーム解析による関節リウマチ発症機構の検討、第66回日本生物工学会大会、2014年9月11日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

9 Seiji Shibasaki, Mitsuyoshi Ueda, Novel platform technique for production of biopharmaceutics using yeast cell surface display system, 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and

6th International Forum on Industrial Bioprocesses, 2014年9月8日、Lille Grand Palais (Lille, France)

<sup>10</sup> 森坂裕信、武田裕美子、芝崎誠司、岩崎剛、佐野統、植田充美、モノリスカラムを用いたプロテオーム解析による関節リウマチ発症機構の検討、日本プロテオーム学会 2014 年会、2014 年 7 月 17 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

<sup>11</sup> Masahiro Sekiguchi, Tsuyoshi Iwasaki, Seiji Shibasaki, Per-Ake Nygren, Torbjorn Graslund, Hajime SanoA, FFIBODY MOLECULES INHIBITING THE INTERACTION BETWEEN RAS AND RAF SUPPRESS THE PROLIFERATION AND THE PRODUCTION OF INFLAMMATORY MEDIATORS BY SYNOVIAL CELLS, 2014 年 6 月 11 日, European League Against Rheumatism (EULAR) 2014 Annual European Congress of Rheumatology, Palais des Congrès de Paris (Paris, France)

<sup>12</sup> Seiji Shibasaki, Mitsuyoshi Ueda, DEVELOPMENT OF AN ORAL VACCINE AGAINST CANDIDIASIS USING MOLECULAR DISPLAY TECHNOLOGY, 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2014 年 5 月 12 日, Centre Convencions Internacional Barcelona (Barcelona, Spain)

<sup>13</sup> 芝崎誠司、関口昌弘、北野幸恵、岩崎剛、佐野統、人工抗体 Affibody による炎症性メディエーター産生の制御、2014 年 4 月 25 日、第 58 回日本リウマチ学会総会、学術集会、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)

〔その他〕

芝崎誠司、キャンパス通信 ポーアイ4大学連携講座 微生物を健康に活かす～酵母で経口ワクチン開発 毎日新聞 兵庫版 21 ページ、2017 年 1 月 31 日

芝崎誠司、フィンランド同窓会セミナー "Future Diagnostics"、JSPS Stockholm Newsletter、Vol. 47, 4, 2015 年 9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝崎 誠司 (SHIBASAKI, Seiji)  
兵庫医療大学・共通教育センター・准教授  
研究者番号：50342530

(2) 研究分担者

岩崎 剛 (IWASAKI, Tsuyoshi)

兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号：10151721

(3) 研究協力者

佐野 統 (SANO, Hajime)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00196304