

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660247

研究課題名(和文)新規タンパク性アジュバントの開発

研究課題名(英文)Development of a novel proteinic adjuvant

研究代表者

後藤 康之(Goto, Yasuyuki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50553434

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): Myeloid-related protein 14 (MRP14) は好中球やマクロファージ(M<sub>φ</sub>)などに発現するタンパク質である。本研究では、MRP14の免疫活性化能やアジュバント能について検討した。大腸菌組換え体として作製したMRP14は*in vitro*において強いM<sub>φ</sub>活性化を示し、その活性にはTLRの関与が示唆された。また、インフルエンザワクチンとともにマウスに接種することにより、抗体産生を増強することが明らかとなった。以上のことから、MRP14は新規タンパク性アジュバントとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文): Myeloid-related protein 14 (MRP14) is a protein expressed by immune cells including neutrophils and macrophages. In this study, we produced a recombinant MRP14 using an *E. coli* expression system and examined for its immunostimulatory activities and potency as an adjuvant for a flu vaccine. MRP14 displayed stimulatory activity on M<sub>φ</sub> *in vitro*. It was revealed that MRP14 can serve as an agonist for multiple TLRs. Mice inoculated with a flu vaccine + MRP14 showed higher antibody titers than those with the vaccine alone. These suggest that MRP14 is a promising proteinic adjuvant.

研究分野：免疫学

キーワード：ワクチン アジュバント MRP14

## 1. 研究開始当初の背景

ワクチンは感染症をコントロールする重要な手段の一つである。特に動物用ワクチンは、伴侶動物や食用動物の健康を守るだけでなく、人獣共通感染症からヒトを守る上でも非常に重要である。生ワクチンは感染症対策に大きな役割を果たしてきた一方、副作用の問題が常につきまとう。これを克服したのが不活化ワクチンであるが、病原体の培養というステップが必要なことから、安定供給性が弱点となっている(例:インフルエンザワクチン)。近年、次世代型ワクチンとして同定抗原+アジュバントというサブユニットワクチン(SUV)が注目されている。この場合、ワクチン抗原は組換え体として製造するため供給性の問題が改善されている。現時点でのSUVにおける弱点はその弱い免疫原性だが、これはアジュバントの研究・開発によって克服できる。

臨床での代表的なアジュバントとしてアラムやMF59があるが、これらは液性免疫の亢進には有効であるが細胞性免疫の誘導に機能しない。細胞性免疫を促すアジュバントとして最初に分子レベルで解明されたのがIL-12である。IL-12は非常に有用であるが、その活性にはヘテロ二量体の形成や糖鎖付加という、大腸菌による組換え体作成には向かない性質が関与している。結果として活性型IL-12は哺乳類細胞発現系を用いて製造されるため非常に高価である。一方、近年の自然免疫に関する研究により、Toll-like receptor (TLR)のアゴニストがTh1誘導アジュバントとして注目されているが、やはりいくつか問題がある。例えば、サルモネラ菌由来MPL®はTLR4のアゴニストでヒト用承認ワクチンにも使われているが、疎水性であるため取り扱いが難しい。一方、合成核酸であるCpG ODNはTLR9のアゴニストで親水性も高く取り扱いが容易であるが、動物種によって活性が大きく異なる。

理想的なアジュバントとして、幅広い動物種に使用できる、安価で安定的に製造できる、抗原と一緒に凍結乾燥が可能である、などが挙げられる。大腸菌組換え体として発現可能であるタンパク型アジュバントはこれらの条件を満たすアジュバントとして可能性を秘めているが、これまでに開発は進んでいない。

## 2. 研究の目的

Myeloid-related protein 14 (MRP14)は好中球やマクロファージ(MΦ)などに発現するタンパク質であり、これまでに細胞走化性やMΦ活性化能についての報告がある。本研究では、MRP14の免疫活性化能についてin vitroで解析を行うとともに、マウスを用いてMRP14のアジュバント能や安全性について検討した。

## 3. 研究の方法

### 大腸菌でのMRP14産生条件の検討

大腸菌におけるMRP14の発現精製を目的として、まず6xHisタグ融合タンパク発現ベクター(pET28a)を用いてMRP14の作製を行った。次に、タグ無しタンパクを作製するために、GST融合タンパク質発現用ベクターのpGEX-6P-1にMRP14遺伝子を組み込み、GST-MRP14の発現精製を行い、プロテアーゼ処理によりGSTの切断を試みた。

### MRP14のTLR活性化能

過去の報告より、MRP14と関連の高いタンパク質であるMRP8がTLR4を介してMΦを活性化することが知られている。本研究では、MRP14によるTLR活性化能を検討するとともに、動物種を超えて活性を發揮するかどうか検討を行った。方法として、マウスもしくはヒト由来のTLRを発現するHEK293細胞を用いて、マウスMRP14のTLR活性化能を試験した。

### マウスを用いたMRP14のアジュバント活性評価

我々はこれまでに、TLR4アゴニストであるGLAを用いることにより、市販のインフルエンザワクチンの用量や投与回数を減らすことが可能であることを報告してきた。そこで、本研究ではインフルエンザワクチンを用いてMRP14のアジュバント活性を評価した。インフルエンザHAワクチン(デンカ生研)高用量(1μg)もしくは低用量(100ng)を単独、MRP14(10μg)もしくはMRP14(50μg)とともにマウス尾根部に1回皮下投与した。1週間後に採血を行い、血清中に存在するワクチン抗原に対する抗体をELISAにて検出した。

### マウスを用いたMRP14の安全性試験

TLR4アゴニストであるLPSはエンドトキシンショックを引き起こすなど、その毒性が知られている。MRP14をアジュバントとして投与する際は、皮内、皮下、筋肉内投与などが投与方法として想定されるが、ここでは静脈内に連続投与した際のマウスへの影響について検討した。MRP14(50μg)を1日1回、計7回マウスの尾静脈より投与して、体重変動などを解析するとともに最終投与より24時間後に解剖を行い肝障害や免疫組織への影響を解析した。

## 4. 研究成果

大腸菌組換えMRP14はMΦ活性化能を有する

まず、6xHisタグ融合MRP14の作製を行った。Ni-NTAを用いたアフィニティ精製によって純度の高いタンパクが得られ、1Lの大腸菌培養あたり25mgと高い生産効率を得られた。LPSのコンタミも低く、かつMΦ活性化能を有することも確認できた(図1)。

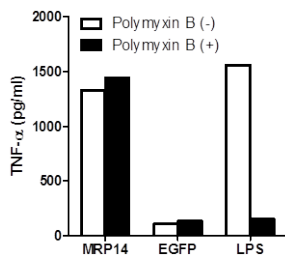


図 1. MRP14 組換え体の MΦ 活性化能。Raw264.7 細胞に MRP14 (156 ng/ml)、EGFP (156 ng/ml)、LPS (625 pg/ml)を加えて培養し、24 時間後に上清中の TNF- $\alpha$  を測定した。EGFP は 6-His タグ付きのコントロールタンパクとして用いた。LPS の阻害剤として polymyxin B (50  $\mu$ g/ml)を用いた。

次に、タグ無しタンパクの作製に関する条件検討を行った。6xHis タグは GST タグなど他のタグと比べて小さいものの、20 アミノ酸程度の配列からなりその部位が抗原性を発揮することが先行研究から分かっている。まず、結果として、融合タンパク質は効率よく発現できるものの、切断によるグルタチオンカラムからの溶出が困難であり、精製効率が非常に低かった。イオン交換クロマトグラフィなどいくつか精製方法について検討を行ったが、いずれの方法においても高い純度のタンパク質を得ることができなかった。これらのことより、MRP14 のスケールアップ発現精製には、6xHis タグ融合タンパクのタグ切断やタグ無しタンパク質の発現精製などを検討する必要があると示唆された。

MRP14 は TLR2 ならびに TLR4 のデュアルアゴニストである

過去の報告より、MRP14 と関連の高いタンパク質である MRP8 が TLR4 を介して MΦ を活性化することが知られている。本研究では、MRP14 による TLR 活性化能を検討するとともに、動物種を超えて活性を發揮するかどうか検討を行った。マウスもしくはヒト由来の TLR を発現する HEK293 細胞を用いて、マウス MRP14 の TLR 活性化能を試験した。その結果、マウスとヒトの MRP14 は 50%強の相同性しか持たないにも関わらず、マウス MRP は両者の TLR を同等に刺激することが明らかとなった (図 2)。さらに、MRP14 は MRP8 同様 TLR4 を活性化することが明らかになったことに加えて、TLR2 に対してもアゴニストとして作用することが明らかとな

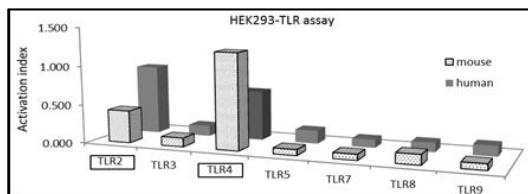


図 2. MRP14 による TLR2 および TLR4 シグナルの活性化。マウスもしくはヒト由来各種 TLR を HEK293 細胞に遺伝子導入し、それぞれの培養細胞に MRP14 (5  $\mu$ g/ml)を加えて TLR シグナルの活性化を測定した。

った。

MRP14 はインフルエンザワクチンのアジュバントとして機能する

HA ワクチン単独投与では、高用量 (1  $\mu$ g) と比較して低用量 (100 ng) では同等の抗体応答を惹起することは出来なかった (図 3)。一方、低用量ワクチンに MRP14 (10  $\mu$ g) もしくは MRP14 (50  $\mu$ g) を混合して投与を行ったところ、低用量単独と比較して高い抗体価が得られ、その抗体価は高用量と同程度であった。また、高用量ワクチンに MRP14 (50  $\mu$ g) を混合した場合でも、単独と比較して高い抗体応答が確認された。

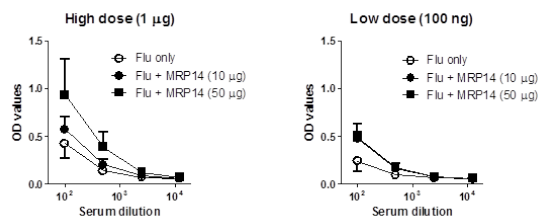


図 3. インフルエンザワクチンに対する MRP14 のアジュバント活性。インフルエンザ HA ワクチン高用量 (1  $\mu$ g) もしくは低用量 (100 ng) を単独、MRP14 (10  $\mu$ g) もしくは MRP14 (50  $\mu$ g) とともにマウス尾根部に 1 回皮下投与した。1 週間後に採血を行い、血清中に存在するワクチン抗原に対する抗体を ELISA にて測定した。

MRP14 は血管内投与によるエンドトキシンショックを引き起こさない

MRP14 (50  $\mu$ g) を 1 日 1 回、計 7 回マウスの尾静脈より投与して、マウスへの影響を解析した。投与期間中に目立った外見の変化は見られず、体重減少も確認されなかった。剖検時に行った血液検査では、白血球数に若干の変化が見られるものの、貧血の徴候などは確認されなかった。また、肝障害マーカーの AST や ALT の上昇も確認できなかった。MRP14 投与マウスでは軽微な脾腫が観察され、脾臓には MRP14 陽性細胞の集簇が確認されたが、これは MRP14 の生理機能として想定される範囲であった。結果として、MRP14 は高用量の静脈内連続投与によってもエンドトキシンショックといった重篤な副作用を示さないことが明らかとなった。

## 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 0 件)  
該当なし

〔学会発表〕(計 6 件)  
国際学会

Mizobuchi H, Isokawa S, Yamakoshi S,

Sanjoba C, Matsumoto Y, Goto Y. Development of splenomegaly during rodent malaria by myeloid-related protein (MRP). 64th annual meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Oct 26, 2015, Philadelphia Marriott Downtown, Philadelphia, USA.

Goto Y, Yamagishi J, Omachi S, Sanjoba C, Reed SG, Matsumoto Y. In silico identification of novel vaccine candidates against *Leishmania major*. 18th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. October 2, 2014, Technische Universitat Dresden, Dresden, Germany.

Reed SG, Coler RN, Duthie M, Goto Y, Guderian J. Rational Design of Vaccines for Canine and Human Visceral Leishmaniasis. 13th International Congress of Parasitology (ICOPA). August 13, 2014, Camino Real Hotel Mexico City, Mexico City, Mexico.

Goto Y, Yamagishi J, Omachi S, Sanjoba C, Reed SG, Matsumoto Y. In silico identification of novel vaccine candidates against *Leishmania major*. 13th International Congress of Parasitology (ICOPA). August 11, 2014, Camino Real Hotel Mexico City, Mexico City, Mexico.

後藤 康之 (GOTO, Yasuyuki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：50553434

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

#### 国内学会

溝淵 悠代、磯川 笙子、山越 祥子、三條場 千寿、松本 芳嗣、後藤 康之。

Myeloid-related protein (MRP) によるローデントマラリア脾腫の増悪。第 85 回日本寄生虫学会大会、宮崎市民プラザ、宮崎、2016 年 3 月 20 日。

溝淵 悠代、磯川 笙子、山越 祥子、三條場 千寿、後藤 康之、松本 芳嗣。

Myeloid-related protein (MRP) によるローデントマラリア脾腫の増悪。第 84 回日本寄生虫学会大会、杏林大学、三鷹、2015 年 3 月 22 日。

#### 〔図書〕(計 1 件)

後藤康之。2015 年。第 4 章「感染症に対する自然免疫」。『獣医免疫学』(監修：池田輝雄、小川健司、松本安喜)、緑書房、58-67。

#### 〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/immune/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者