

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780227
 研究課題名 (和文) ヘテロ型コレラ毒素 B 鎖を用いた免疫寛容誘導生体防御分子構築と経口ワクチンへの応用
 研究課題名 (英文) Construction of immunologic tolerance induction biological defense molecule using heteropentameric cholera toxin B subunit molecules
 研究代表者
 宮田 健 (MIYATA TAKESHI)
 国立大学法人 琉球大学・分子生命科学研究所・非常勤研究員
 研究者番号：20448591

研究成果の概要：

自己免疫疾患を対象とした抗原特異的免疫寛容誘導型の治療用ワクチンの開発を行った。本研究では、そのワクチンの免疫原性を向上させるため、コレラ毒素 B 鎖蛋白質 (CTB) との融合発現させることで、免疫寛容誘導効率を向上させることを計画した。その成果として一部生理活性を持った融合タンパク質を得ることに成功したが、水溶性の融合蛋白質そのものを単に経口投与することでは、効果が低いことが判明した。よって、現在、融合蛋白質を経口投与可能なデリバリー系に乗せることで機能向上させる技術に着目して研究を進めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,000,000	30,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	30,000	3,600,000

研究分野：遺伝子工学、蛋白質化学工学、分子デザイン

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：コレラ毒素、経口ワクチン、免疫寛容、粘膜アジュバント、疾病予防および制御

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は、2 型糖尿病と比較し、その発症メカニズムが全く異なるため、その治療法も異なる。即ち、1 型糖尿病は自己免疫疾患であり、インスリンを始めとする膵島由来の自己抗原に対する免疫寛容を誘導することで予防及び治療が可能であることが分かっている。それゆえに、米国を始めとしてリウマチ同様、抗原特異的免疫寛容誘導型の治療用ワクチンが期待されている自己免疫疾患である。1 型糖尿病発症に最も重要とされている自己抗原のひとつがインスリンであり、

その中でも B 鎖蛋白質中の B:9-23 ペプチドに主要なエピートープが含まれることも分かっていた。よって、臨床レベルにおいて予防及び治療にこのペプチドを利用することが提案されてきた。NOD マウスの実験では、このペプチドのアナログ (A16, 19APL) を皮下投与することで予防及び治療効果があることが示されている。

2. 研究の目的

本研究の最大の目的は、コレラ毒素 B 鎖 (CTB) を基本分子骨格とするワクチン抗原融合シ

システム「ヘテロ型5量体組換えワクチン」の汎用性を追及し、新しい粘膜アジュバント・ワクチンデリバリーシステムとして確立することである。具体的には、(1)大腸菌発現系を用いたヘテロ5量体関連分子発現の効率化の検討、(2)ヒトインスリン関連分子を用いた1型糖尿病発症防御機能性蛋白質の構築とその機能解析、(3)日本住血吸虫症などの病原体に対する炎症反応が病的に重要とされる感染症への応用の検討、(4)ヘテロ型5量体分子構築技術を応用したN末端融合分子構築の検討、及び(5)CTB融合分子のユビキチン化による外来性抗原の抗原提示能向上の検討、を五つの細分化された目的とする。

3. 研究の方法

ヘテロ型5量体技術(図1)はワクチン開発において期待できるものであるが、ワクチン生産技術として詳細な点での最適化の必要性がある。これまでの予備的データから、ヘテロ型5量体は発現系と抗原によってその発現様相が著しく異なることが推測されることから、組換えワクチン生産系として大腸菌を用い、以下の分子構築をする。基盤となるCTB融合用コンストラクト:(1)C末端融合型、(2)N末端融合型、(3)N、C両末端融合型及び(4)分子バッファーCTBを作成し、各々分泌型(ペリプラズム蓄積型)と細胞質蓄積型(封入体発現型)を構築する(図2)。

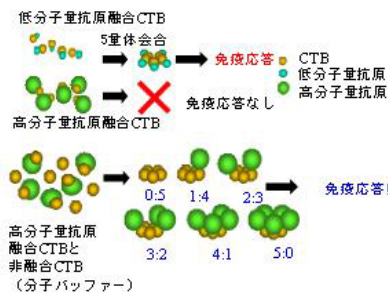


図1 ヘテロ型5量体技術

(1)のC末端にプロインスリン、(2)にN末端にユビキチン、(3)のN、C両末端に其々ユビキチンとプロインスリンを融合させたコンストラクトを作成する。上記コンストラクトを其々単独で、或いは分子バッファーCTBと一緒に in vitro 会合させ、ホモ及びヘテロ型5量体分子を構築し、それらの5量体形成効率、精製効率等を解析し、プロダクト形成の効率を比較検討する。また、上記コンストラクトの in vivo でのヘテロ5量体形成効率を解析するため、複数遺伝子発現可能な大腸菌発現ベクターpETDuet-1 (Novagen) を用いる。構築した各種コンストラクトの発現、精

製した組換え蛋白質各々につき、生化学的解析を中心に生体防御分子としての機能を解析する。



図2 各種発現コンストラクト

4. 研究成果

(1) H19年度は大腸菌発現系においてヘテロ5量体分子の基本骨格となるペリプラズム蓄積型及び細胞質蓄積型分子を構築した。具体的には5量体形成効率検討の基盤となるCTB融合用分子: 1) C末端、2) N末端、3) N、C両末端融合型、及び4) 非融合CTB分子(分子バッファー)を構築した。その過程で得られた新たな知見として、コレラ菌本来のCTBリーダー配列を大腸菌由来のpeIB配列と置換することで、CTB5量体分子が生物活性を保持した状態で効率よく大腸菌から分泌発現することが分かった。これはCTB本来のリーダー配列を用いた場合には認められない現象であり、しかも、通常のLB培地の使用で大腸菌から5量体の形態で分泌発現が確認されたことは以前報告がない。また、これまで酵母や植物などの小胞体をもつ真核生物やCTBの本来の発現宿主であるコレラ菌を除けば、5量体として優位に分泌発現が確認された例はなく、しかも酵母などの真核生物では、CTB本来のリーダーでもCTBの分泌シグナルとして機能する点において大腸菌とは分泌に関し発現様相が全く異なることが分かった。更に、枯草菌発現系などのペリプラズムを持たないグラム陽性菌の発現系では、単量体優位にしか分泌発現が達成されていないのが現状であり、今回得られた知見は、今後のCTB関連組換え融合蛋白質を生物活性を保持した状態で確保するという観点から重要であると考えている。

(2) H20年度はH19年度に構築したCTB-APL融合遺伝子をホモ型或いはヘテロ型5量体として発現させ、その発現様相を解析した。コンストラクトとして、1) C末端、2) N末端、3) N、C両末端融合型を候補としたが、まず、最も可能性が高いと思われるC末端融合型を検討した。その結果、peIB配列保有CTBは

大腸菌で顕著に分泌発現するのに対し、CTB-APL は不溶性凝集体としてのみ発現した。つまり、CTB との融合分子は、大腸菌系ではCTB 単独と発現様相が全く異なることが分かった。(この現象は酵母発現系とは全く異なる。)そこで、大腸菌から生理活性を保持した融合分子を得るため、尿素で不溶性凝集体を変性させ、徐々に巻き戻し作業を行ったところ、一部生理活性を保持した融合分子を得ることに成功した。次に、この融合蛋白質をNOD マウスに経口投与したが予防効果は認められなかった。以前我々はCTB-APL 発現組換え酵母自体を経口投与することで弱いながらも発症防御効果があることを確認している。よって、水溶性の融合蛋白質そのものを単に経口投与することでは、効果が低いことが判明した。よって、現在、融合蛋白質を経口投与可能なデリバリー系に乗せることで機能向上させる技術に着目して研究を進めている。

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 3 件)

- (1) Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequence (RDV ver4.0). Archives of virology, 154 (1) 153-8, 2009 査読有り
- (2) Harakuni T, Kohama H, Tadano M, Uechi G, Tsuji N, Mastumoto Y, Miyata T, Tsuboi T, Oku H, Arakawa T. Mucosal vaccination approach against mosquito-borne Japanese encephalitis virus. Japanese journal of infectious diseases, 62 (1) 37-45, 2009 査読有り
- (3) Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Lapcharoen P, Sumroiphon S, Iwanaga S, Ushijima H, Endoh D, Miyata T, Sakata A, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in

the field.

Journal of virological methods, 146 (1-2) 372-4, 2007 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 小濱秀泰、宮田健、原國哲也、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川武「酵母 *Pichia pastoris* 発現三日熱マalaria 伝搬阻止ワクチン Pvs25 の感染防御効果」第 78 回日本寄生虫学会大会平成 21 年 3 月 27-28 日 (東京)
- (2) 宮田健、小濱秀泰、原國哲也、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川武「マalaria ワクチン開発のための三部構成五価免疫賦活複合体」第 78 回日本寄生虫学会大会平成 21 年 3 月 27-28 日 (東京)
- (3) 平松征洋、奥野隆啓、宮田健、佐藤朝光、新川武、鹿志毛信広、見明史雄「cholera toxin B 分泌乳酸菌を用いた 2 ステップ腸管内 DDS の開発」日本薬学会 第 129 年会平成 21 年 3 月 26-28 日 (京都)
- (4) 小濱秀泰、宮田健、原國哲也、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川武「酵母 *Pichia pastoris* 発現三日熱マalaria 伝搬阻止ワクチン Pvs25 の感染防御効果」第 7 回感染症沖縄フォーラム 平成 21 年 2 月 12-14 日 (沖縄)
- (5) 原國哲也、宮田健、小濱秀泰、平良東紀、松崎吾朗、新川武「酵母発現コレラトキシン B 鎖蛋白質の糖鎖を利用した部位特異的融合法とそのワクチンデザインへの応用」第 7 回感染症沖縄フォーラム 平成 21 年 2 月 12-14 日 (沖縄)
- (6) 奥野隆啓、平松征洋、入江圭一、宮田健、戸田晶久、佐藤朝光、繪柳玲子、新川武、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄「cholera toxin B 発現乳酸菌による 2 ステップ腸内ドラッグデリバリーシステムの構築」第 12 回腸内細菌学会 平成 20 年 6 月 12-13 日 (東京)
- (7) 原國哲也、菊池三穂子、奈良武司、宮田健、平山謙二、新川武「日本住血吸虫パフラミオン抗原を用いた粘膜ワクチンに関する研究」第 77 回日本寄生虫学会大会平成 20 年 4 月 3-4 日 (長崎)
- (8) 平松征洋、宮田健、佐藤朝光、新川武、鹿志毛信広、見明史雄「CTB 発現乳酸菌を用いたデリバリーシステムの構築」第 6 回感染症沖縄フォーラム 平成 20 年 2 月 14-16 日 (沖縄)
- (9) 呉我春学、小濱秀泰、須川秀樹、宮田健、梅村正幸、新川武、松崎吾朗「結核菌 HSP65 発現アデノウイルスベクターの経鼻免疫による肺局所における抗原特異

的 Th1 免疫応答の誘導」第 6 回感染症沖縄フォーラム 平成 20 年 2 月 14-16 日 (沖縄)

(10) 新垣尚子、原國哲也、宮田健、小濱秀泰、呉我春学、梅村正幸、松崎吾朗、坪井敬文、新川武「三日熱マラリア原虫伝搬阻止ワクチン Pvs25 の新しい生産系確立とその粘膜免疫原性向上のための分子改変」第 6 回感染症沖縄フォーラム 平成 20 年 2 月 14-16 日 (沖縄)

(11) 原國哲也、宮田健、小濱秀泰、大城聡、新川武「コレラトキシン B 鎖 (CTB) 5 量体の分子安定性獲得及び経口投与型ワクチンへの応用」第 6 回感染症沖縄フォーラム 平成 20 年 2 月 14-16 日 (沖縄)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：薬物運搬体並びにこれを利用したアジュバント及びワクチン

発明者：宮田健、新川武、松崎吾朗、坪井敬文

権利者：琉球大学

種類：特願

番号：2009-28134

出願年月日：2009 年 2 月 10 日

国内外の別：国内

〔その他〕

<http://www.cc.u-ryukyu.ac.jp/~comb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 健 (MIYATA TAKESHI)

琉球大学分子生命科学研究センター・非常勤
研究員

研究者番号：20448591

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者