

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658253

研究課題名(和文)細胞性免疫誘導型リバースワクチノロジーの確立

研究課題名(英文)Reverse vaccinology for cell-mediated immunity

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) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：Leishmania major感染モデルを用いて、ワクチン抗原としての有用性に寄与するパラメータの同定を試みた。統計学的解析の結果、アミノ酸組成、発現量、エクソソームへの局在が有意なパラメータと同定され、これらを基にした数式によりプロテオーム中の大多数と既知のワクチン抗原を区別できた。さらに、新規に同定された蛋白は既知のワクチン抗原と同等の抗原性を示した。このように、in silicoアプローチで同定された新規タンパクが既知のワクチン抗原と同様の挙動を示したことは本手法がワクチン候補探索手法として有用であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Identification of parameters influencing the effectiveness of vaccine antigens for leishmaniasis was searched in this study. Statistical analyses revealed amino acid composition, expression level, and localization to exosome were influential parameters. A formula based on the three parameters discriminated the previously characterized vaccine antigens from the whole proteome. Furthermore, novel antigens identified using the formula were as antigenic as the known antigens. These results suggest the in silico approach developed is useful to identify candidate vaccine antigens for leishmaniasis.

研究分野：感染症学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：ワクチン 細胞性免疫 in silico解析

1. 研究開始当初の背景

2010年に国内で発生した口蹄疫の際、ワクチン接種群が感染群と混同される恐れがあることが現在唯一存在する不活化ワクチンの問題として浮かび上がった。イヌに対して致死的な原虫性疾患であるリーシュマニア症でも同様で、ブラジルでは感染犬を淘汰する政策がとられていたが、同時期にブラジルで開発されていたワクチンが粗抗原を用いた不活化ワクチンであったため、ワクチン接種犬→血清診断陽性犬→淘汰という矛盾が起きてしまった。以上のことから、21世紀の感染症対策においては組換え抗原を用いたワクチンの開発が重要である。これまでのワクチン抗原探索では遺伝子発現ライブラリの抗体によるスクリーニングが最も一般的だったが、ライブラリ作製には病原体培養などの障壁が存在するほか、スクリーニングは煩雑で時間、労力、技術を要する。

一方で、ゲノム情報を利用して合理的にワクチン候補を探索する手法 (reverse vaccinology) は近年注目を集めている。髄膜炎を引き起こす細菌 *Meningococcus B* は細胞表面タンパクの抗原変異が多く、不活化ワクチンでは十分な防御効果が得られていなかったが、Rino Rappuoli らにより初めてゲノム情報を基にワクチン抗原を同定することに成功した。これは細菌感染防御に重要な液性免疫のターゲットとなる病原体細胞表面蛋白を予測する手法である。一方で、結核やリーシュマニア症など防御に細胞性免疫を必要とする感染症においては、ワクチンはおろか reverse vaccinology の道筋すら立っていない。

2. 研究の目的

本研究では、防御に細胞性免疫を必要とする感染症においてワクチン抗原としての有用性に寄与するパラメータをコンピュータ解析により同定することを目的とした。そのために、T細胞依存的に防御能を有すると報告のある抗原の共通点を、総プロテオームとの統計学的比較解析により探索した。同定されたパラメータが抗原の有用性に寄与することを実証するため、細胞性免疫が感染防御に重要なモデルである *Leishmania major* マウス感染モデルを用いて、*L. major* プロテオームの中からそれらパラメータを持ったタンパクの検索を行った。

これまでに開発・承認されてきたワクチンの多くが液性免疫に頼るものであり、結核やリーシュマニア症に代表される防御に細胞性免疫を必要とする感染症に対してワクチンを開発できるかが21世紀の課題である。本研究では *L. major* 感染モデルを用いて、細胞性免疫誘導型ワクチンのための reverse vaccinology の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) In silico 解析による防御能パラメー

タの探索

L. major に対する防御抗原として報告のあるタンパク (14種) を総プロテオーム (~8,000種) と比較して防御能に関連するパラメータの探索を行った。解析には分子量、等電点、親水性、N末シグナル配列、膜貫通領域、GPIアンカー領域、発現量、哺乳動物宿主タンパクとの相同性、アミノ酸構成、GO Annotation によるタンパク機能予測を取り入れた。これらのパラメータについて、ワクチン抗原群と総プロテオームを統計学的有意に区別できるものを同定した。

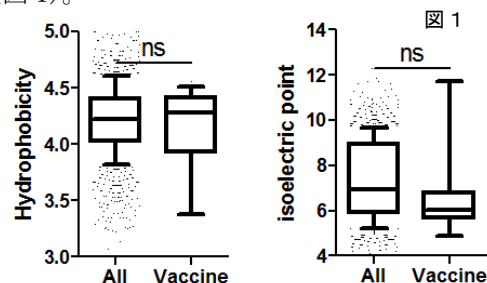
(2) マウス実験による検証

上記のとおり同定されたパラメータを用いてワクチン抗原と総プロテオームを区別する数式を作成し、それを基に総プロテオームのスクリーニングを行った。このスクリーニングによって同定されたワクチン候補タンパクは、コードする遺伝子をクローニングした後、大腸菌組換えタンパクとして発現した。次に、得られたタンパク質の抗原性を評価するため、*L. major* 感染マウス血清を用いたELISAを行った。

4. 研究成果

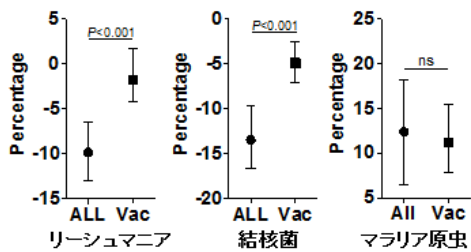
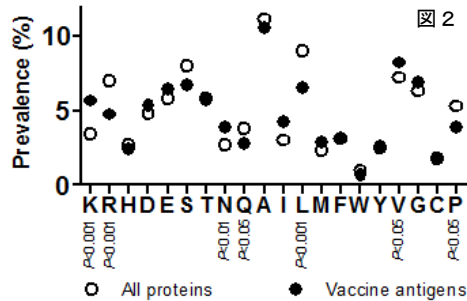
(1) In silico 解析による防御能パラメータの探索

複数のパラメータについて解析を行った結果、親水性や等電点など抗体依存型の防御抗原に重要なパラメータは *L. major* 防御抗原においては重要でないことが確認された (図1)。

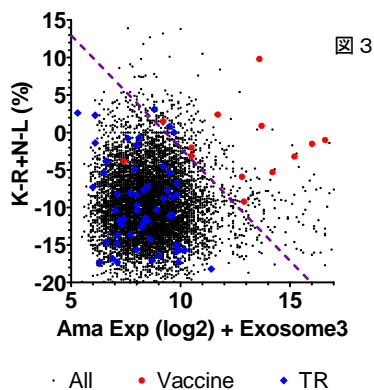


一方で今回、防御抗原におけるアミノ酸組成について解析したところ、総プロテオームと比較して有意に出現頻度が異なるものはいくつか存在することを初めて明らかにした (図2上)。単純に $P < 0.01$ の有意差がある K (ワクチン抗原が高い)、R (低)、N (高)、L (低) の出現頻度だけに着目して $K-R+N-L$ という数式を作成するとワクチン抗原が総プロテオームときれいに区別できた。そのパターンは同じく細胞内寄生体だが細菌である結核菌においても認められる一方、同じく原虫だが防御に液性免疫が重要であるマラリア原虫赤内型においては当てはまらないことが明らかになった (図2下)。最も興味深いことは、同じ塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニンの関係である。これらアミノ酸の置換はタンパク質の立体構造に大きな影響を与えないことがよく知られており、抗

体によるエピトープ認識においてもそれらアミノ酸の置換が大きな影響を与えることは知られていない。つまり、新規の免疫学的メカニズムが関与していると考えられ、これらの発見は細胞性免疫誘導型ワクチンのための reverse vaccinology の第一歩として高い可能性を秘めている。

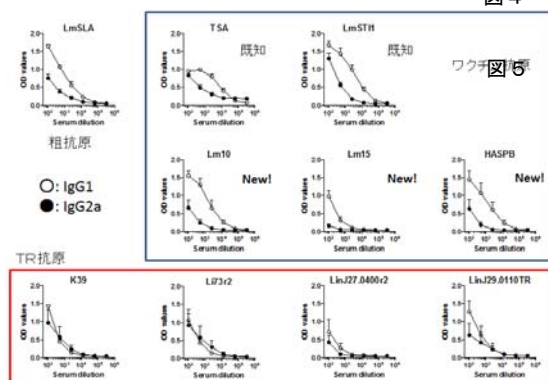


次に、アミノ酸組成の他に有意差のあるパラメータとして同定した発現量とエクソソームへの局在を基にワクチン抗原候補を定義する数式を作成した。図3はその数式に基づき総プロテオームを解析したものであるが、プロテオーム中の大多数と既知のワクチン抗原をきれいに区別できることが分かる。また、抗原性は高いものの免疫回避に関与すると考えられワクチンとしての有用性が低い TR 抗原群が同様にワクチン群と異なる分布をとることも確認できた。これらの結果は本数式が単に抗原性で無く防御効果に基づくことを示唆している。総プロテオームのうちカットオフ値（紫の点線）を超えるものは403 (4.8%)あり、その大多数が過去に報告の無いものであった。自己免疫の誘導回避というワクチンの安全性を考えて哺乳宿主蛋白との相同性があるものを除外するとその数は176 (2.2%)にまで絞られた。

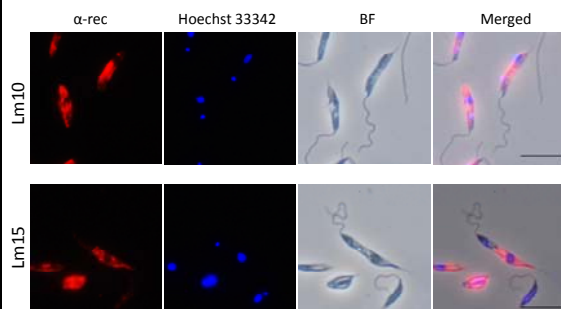
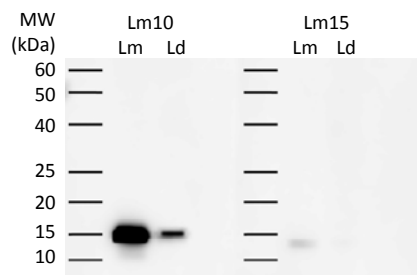


2) マウス実験による検証

いくつかの候補タンパクは組換え体として作製して、免疫学的解析を行った。*L. major* 感染に対して感受性の BALB/c マウスにおいては抗原特異的 Th2 が誘導されるが、TSA や LmSTII などの既知のワクチン抗原に対して IgG1 優位な抗体反応が見られる。一方、TR 抗原に対しての免疫反応はそのパターンに当てはまらず IgG2a の応答も同様に誘起される。今回新規に同定されたタンパクは①既知のワクチン抗原と同等の抗原性を有し、また②IgG1/IgG2a においてワクチン抗原のパターンを示した (図4)。このように、in silico アプローチで同定された新規タンパクが既知のワクチン抗原と同様の挙動を示したことは本手法がワクチン候補探索手法として有用であることを示唆している。



抗原性の確認された新規の候補タンパクのうち、Lm10 および Lm15 についてはマウスを用いてポリクローナル抗体を作製し、蛋白質の発現解析を行った。ウェスタンブロット解析では予想されるサイズのバンドが検出され (図5上)、また蛍光抗体法により Lm10 および Lm15 が細胞質に発現することが明らかとなった (図5下)。



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)

1. 松本芳嗣、後藤康之、三條場千寿。2013年。「犬のリーシュマニア症」。日本獣医師会雑誌、66:5-7。査読無
2. 後藤康之。2012年。「リーシュマニア症に対するワクチン開発の展望」。獣医寄生虫学会誌、11:1-7。査読有

[学会発表] (計 13 件)

国際学会

1. Osada Y, Seki M, Sanjoba C, Goto Y, Matsumoto Y. Susceptibility and resistance correlates with differential expansion of helper T cell subsets in experimental murine visceral leishmaniasis. Worldleish5. May 17, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.
2. Goto Y, Sanjoba C, Reed SG, Noiri E, Matsumoto Y. Tandem repeat proteins for serological diagnosis of visceral leishmaniasis. Worldleish5. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.
3. Goto Y, Yamagishi J, Sanjoba C, Reed SG, Matsumoto Y. In silico identification of vaccine antigens for leishmaniasis. Worldleish5. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.
4. Goto Y. Antigen Discovery for Serological Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Third International Conference on Neglected Tropical Diseases, Bangladesh and Scientific Meeting on Kala-azar and PKDL. Sep 2, 2012, Filaria and General Hospital, Savar, Bangladesh.

国内学会

1. 長田康孝、関信弥、松井洋輔、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。実験的内臓型リーシュマニア症における治療後の再感染抵抗性。第 83 回日本寄生虫学会大会、愛媛大学、松山、2014 年 3 月 28 日。
2. 大間知聡子、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。実験的内臓型リーシュマニア症における血中 IgG の異常亢進。第 83 回日本寄生虫学会大会、愛媛大学、松山、2014 年 3 月 28 日。
3. 孫家梅、イゴーリハタンバター、Yusuf Ozbek、長田康孝、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。Anti-*Leishmania* IgE antibodies: a bio-maker for characterization of cutaneous

leishmaniasis. 第 83 回日本寄生虫学会大会、愛媛大学、松山、2014 年 3 月 28 日。

4. 長田康孝、三條場千寿、木村純二、後藤康之、松本芳嗣。海藻類 *Sargassum yamadae* より単離したキノンテルペノイドの抗リーシュマニア症活性。第 82 回日本寄生虫学会大会、東京医科歯科大学、東京、2013 年 3 月 31 日。
5. 後藤康之、山岸潤也、長田康孝、三條場千寿、松本芳嗣。Reverse vaccinology によるリーシュマニア症ワクチン抗原の探索。第 82 回日本寄生虫学会大会、東京医科歯科大学、東京、2013 年 3 月 29 日。
6. 長田康孝、関信弥、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。マウス実験的内臓型リーシュマニア症における Th1、Th2 の感受性、抵抗性への関与。第 155 回日本獣医学会学術集会、東京大学、東京、2013 年 3 月 28 日。
7. 後藤康之、山岸潤也、長田康孝、三條場千寿、松本芳嗣。リーシュマニア症ワクチン抗原の有用性に寄与するパラメータの探索。第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学、岩手、2012 年 9 月 16 日。
8. 長田康孝、大間知聡子、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。実験的内臓型リーシュマニア症における MRP8、14 陽性細胞の増加。第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸セミナーハウス、神戸、2012 年 8 月 26 日。
9. 後藤康之、三條場千寿、Steve Reed、松本芳嗣。リーシュマニア原虫の抗原学。第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸セミナーハウス、神戸、2012 年 8 月 26 日。

[図書] (計 1 件)

1. Goto Y, Reed SG. 2012. Section 5, 25.2 Current approaches to the development of a vaccine against leishmaniasis. "Immunity to Parasitic Infections" (edited by Tracey Lamb), Wiley-Blackwell, 431-440.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

松本 芳嗣 (MATSUMOTO, Yoshitsugu)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：00173922

山岸 潤也 (YAMAGISHI, Junya)
東北大学・メディカルメガバンク機構・助教
研究者番号：80535328