

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06349

研究課題名(和文)多機能型蛋白性ナノ粒子の最適設計による新規感染症ワクチンの開発

研究課題名(英文)The potential of self-polymerizing Spy0128 as vaccine adjuvant

研究代表者

三里 一貴(Misato, Kazuki)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：10756638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、改変型Spy0128から形成されるナノサイズの人工線毛(Spy0128重合体)の、ワクチン用蛋白性ナノ粒子/バイオナノ素材としての有用性を評価した。研究は予定通り進行し、Spy0128のワクチン抗原としての有用性を明らかとしたものの、Spy0128重合体のワクチン抗原としての明確な有用性を見出すことはできなかった。一方で、幾つかの課題も見出されたことから、今後の改良に繋がる成果を得たものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Here I tried to examine the potential of self-polymerizing Spy0128 as vaccine adjuvant. I showed that Spy0128 might be superior vaccine antigen against Streptococcus pyogenes. In contrast, I could not usefulness of self-polymerizing Spy0128 as vaccine antigen compared with Spy0128.

研究分野：生体医工学

キーワード：ワクチン 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

近年の新型インフルエンザのパンデミックや結核等の再興、さらには、昨今のエボラ出血熱やデング熱の猛威からも明らかなように、病原性ウイルス・細菌による感染症は未だ、我々人類の圧倒的脅威となっている。この点、世界保健機構(WHO)も宣言しているように、最強で最善の予防・治療手段であるワクチンの開発が、これら感染症の克服に向けてのキーポイントとなっている。現在、安全性を重視し、弱毒株などを用いる生ワクチンから、病原体そのものではなく、病原体由来の蛋白質やペプチドを抗原として用いたサブユニットワクチンに期待が寄せられている。しかし、蛋白質やペプチドを単独で投与しても、免疫誘導の場であるリンパ節や免疫細胞へほとんど移行せず、免疫応答が誘導されないこと、病原体に対する防御免疫を十分に誘導するために免疫賦活化剤(アジュバント)が必須であるものの、体内動態を制御できず、*in vivo* で十分な免疫応答を誘導し得るアジュバントに乏しいことから、ワクチン開発が遅々として進んでいない現状にある。さらには、アジュバントが、標的としない組織へ移行することで、予期しない炎症を惹起してしまう懸念も生じている。事実、子宮頸がんワクチン接種による副作用(疼痛症候群)の原因がアジュバントに起因するという仮説も相俟って、ワクチンの安全性(ワクチンリスク)への懸念が高まる今日、如何に、抗原とアジュバントの体内動態を制御し、有効性のみを担保しつつ、副作用を低減するかといった課題の克服が世界的急務となっている。即ち、ワクチン抗原とアジュバントを、標的組織・細胞であるリンパ節(免疫細胞が多数存在)や樹状細胞(ワクチン効果で中心的役割)へ適切に送達し得る送達キャリアの開発が緊急性・必要性の高い課題となっており、医工学領域における世界規模での最重要課題といっても過言ではない。

申請者はこれまで、非晶質ナノシリカなどをモデル粒子として用い、粒子径と体内動態の連関を精査してきた。その結果、ナノサイズ(一次元の大きさが100nm以下)のナノ粒子が、サブミクロンサイズの粒子と比較して、皮内投与後に、リンパ節への移行性が顕著に上昇すること、さらに、樹状細胞に効率良く取り込まれることを明らかとしてきた。さらに、樹状細胞がナノ粒子を取り込んだ際、インフラマソームと呼ばれる異物認識受容体が活性化され、免疫応答が活性化されることをも見出してきた。本知見は、ナノ粒子がワクチン抗原・アジュバントの送達キャリアになり得ること、さらには、ナノ粒子自身がアジュバントとして有望であることを先駆けて見出したことに他ならない。その過程で、

もし、目的とする抗原蛋白質を、立体構造を保持させたまま重合させることで、ナノ粒子(蛋白性ナノ粒子/バイオナノ素材)を創製することができれば、ナノサイズであるが故に、リンパ節・樹状細胞への送達効率が向上するだけでなく、勿論、抗原として機能し得ること、さらに ナノ粒子であることに起因し、それ自身がアジュバント能をも有することから、体内動態が制御されつつ、「抗原」と「アジュバント」の両特性を併せ持つ「多機能型蛋白性ナノ粒子/バイオナノ素材」として、ワクチンに展開できるものと思いついた。

A型レンサ球菌(Group A Streptococcus pyogenes: GAS と略す)感染症は、日本において、毎年約30万人が発症しているものの、通常は抗生剤を服用することにより完治する。一方で、突発的に劇症型GAS感染症となり重症化してしまう例も存在する。近年、日本においても、劇症型GAS感染症の患者数が年々増加傾向にあると共に、世界的には、毎年60万人以上の新規患者と15万人以上もの死者数が推計されており、全世界的にワクチン開発が待望されている。申請者は、未だ存在しないGASに対するワクチン開発を試みるにあたり、細菌表面に存在する線毛に着目した。Spy0128蛋白質を主成分とする線毛は、細胞への接着に必須であることが判明しつつあり、ワクチン抗原として用いることで、GASの細胞への感染を防御し得ると期待される。一方で、細菌表面上では、特殊な酵素の作用により、Spy0128が規則正しく重合することで線毛を形成するものの、*in vitro* においては、Spy0128を重合させることができないことが知られている。本観点で、共同研究者である津本浩平先生(東京大学工学系研究科・教授)は、Spy0128のアミノ酸を一部改変することで、*in vitro* において自発的に重合し、ナノサイズの“人工線毛(Spy0128重合体)”を形成可能な“改変型Spy0128”を独自開発している(Nat Commun. 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究では、改変型Spy0128から形成されるナノサイズの人工線毛(Spy0128重合体)を、ワクチン用の蛋白性ナノ粒子/バイオナノ素材として最適デザインすることで、リンパ節・樹状細胞への移行能に優れるうえ、「ワクチン抗原」および「アジュバント」としての両特性を併せ持つ「多機能型蛋白性ナノ粒子/バイオナノ素材」を創製することを目的とした。これまで、ペプチドや蛋白質を自己重合させたバイオナノ素材は幾つか開発されてものの、医療応用しようとしても、例えば、薬物をバイオナノ素材に化学的に結合せねばならないなど、煩雑な作業を伴うことが

ら、それらの医療応用は皆無である。その点、人工線毛（Spy0128 重合体）は、それ自身がワクチンとして必要不可欠な特性を全て有することから、改変型 Spy0128 を自己会合させるだけで利用できるなど、誰もが簡単に作製できる点で、将来的な実用化の可能性も高いと期待された。

### 3. 研究の方法

#### Spy0128 重合体の作製

大腸菌により改変型 Spy0128 を作製した後、種々カラムで精製した。その後、DTT 存在下で 16 時間静置することで、Spy0128 重合体を作製した。Spy0128 重合体を SDS-PAGE により、重合度を確認した。

#### 免疫誘導能評価

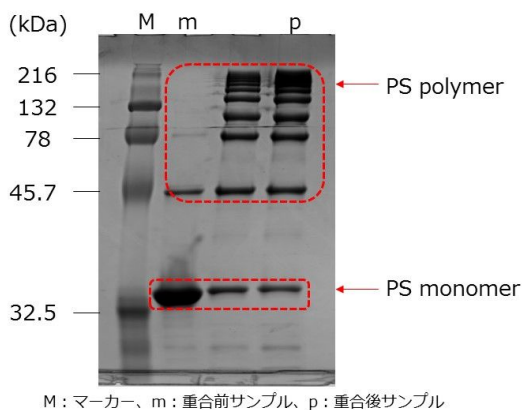
C57BL6 マウス（8 週令）の尾根部に Spy0128 重合体および Spy0128 を 2 週間おきに 2 回投与した。最終投与 2 週間後に血液を回収し、血清中の Spy0128 特異的抗体価を ELISA により評価した。なお、アジュバントとしては、水酸化アルミニウムもしくは CFA/IFA を用いた。ELISA の固相化抗原としては、野生型の Spy0128 を用いた。

#### 感染防御能評価

上記で免疫したマウスに A 型連鎖球菌を腹腔内投与し、経時的に体重および生存率を評価した。

### 4. 研究成果

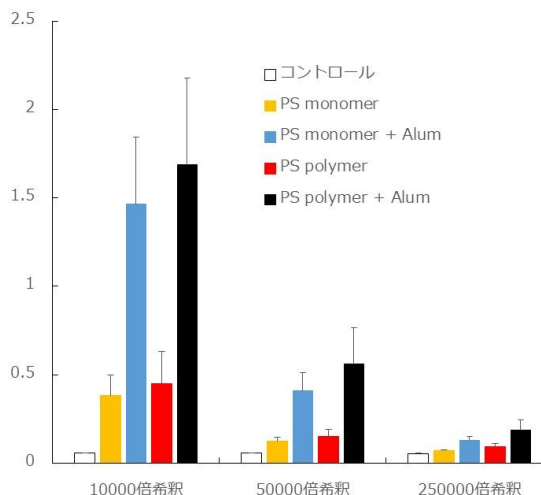
#### Spy0128 重合体の作製



これまでの報告にのっとり、改変型 Spy0128 を大腸菌で発現させた後、His タグカラムおよびゲルろ過カラムにより、改変型 Spy0128 を精製した。その後、DTT 存在下で反応させることで、Spy0128 重合体を作製し、SDS-PAGE により確認した。その結果、精製度の高い改変型 Spy0128 が精製されると共に、Spy0128 重合体も作製されることが確認された。また、Spy0128 重合体を作製する際、改変型 Spy0128

の蛋白濃度により重合度が異なったことから、今後、より重合度の高い Spy0128 重合体を作製することも可能と考えられたが、十分な重合度のものが得られたと考え、今回は、本サンプルを用いて検討を進めた。

#### 免疫誘導能評価



次に、野生型 Spy0128 および Spy0128 重合体をマウスに投与し、Spy0128 特異的抗体産生を ELISA により評価した。その結果、アジュバントの有無に関わらず、いずれの群においても、抗体価の上昇が観察された。また、野生型 Spy0128 投与群と Spy0128 重合体投与群の間で有意な差は観察されなかった。さらに、ワクチン後、A 型連鎖球菌を感染させ、感染防御能を比較検討した。その結果、Spy0128 重合体とアジュバントの共投与群で体重減少の低下および生存率の向上が観察された。一方で、抗体産生について、野生型 Spy0128 投与群と Spy0128 重合体投与群で有意な差が無かったことを考えると、Spy0128 蛋白質自身はワクチン抗原として有望であるものの、Spy0128 重合体が野生型 Spy0128 よりもワクチン抗原として優れているとはいえない結果と言える。その要因として、用いた Spy0128 重合体の重合度が低く、ナノ粒子としての特性を十分に発揮できなかった可能性が考えられる。事実、SDS-PAGE の結果からも、2 量体～5 量体程度の重合体も多く存在している。前述したが、Spy0128 重合体の作成時、蛋白濃度をより最適化することで、重合度を増すことも可能であることから、より重合度の高い Spy0128 重合体の効果を検討することも今後重要になってくるものと考えられた。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Kazuki Misato, Taiki Aoshi, Yasuo Yoshioka.  
Vaccine adjuvant effects of dendritic cell-targeting peptides identified by means of phage display. 第45回日本免疫学会学術集会. 2016年10月11-13日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

三里 一貴(Kazuki Misato)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号: 10756638

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

吉岡 靖雄(Yasuo Yoshioka)

高橋 秀樹(Hideki Takahashi)