

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08428

研究課題名(和文) 腸管毒素原性大腸菌不活化ワクチン開発のためのトキシイド及び定着因子抗原の開発

研究課題名(英文) Recombinant toxoid vaccine development against Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)

研究代表者

新川 武 (ARAKAWA, Takeshi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：50305190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：AB5型の腸管毒素には、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)の易熱性腸管毒素(LT)や腸管出血性大腸菌(EHEC)の志賀毒素(Stx)などが存在する。これまでこれらの腸管毒素のB鎖をワクチン抗原とするには、その発現・精製量に課題があった。そのため、大腸菌封入体からのB鎖抗原の巻き戻し法の開発が試みられてきたが、その殆どは分子量が不均一な高分子量可溶性凝集体としてしか回収できなかった。今回我々は、独自のB鎖リフォールディング法の開発に成功し、各種腸管毒素B鎖を均一性の高い5量体分子として精製する方法を確立した。この成果は、ETECやEHECに対する組換えワクチンの開発に重要な知見を与えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a new protein expression and refolding method to produce B subunit pentamer molecules derived from enterotoxins such as cholera toxin (CT), heat-labile enterotoxin (LT) and Shiga toxin (Stx). Those B subunits are to be included in recombinant vaccines to combat against enterotoxin-producing pathogenic Escherichia coli. Our techniques are considered to be unique in that pentameric B subunit proteins are highly uniform in a molecular structure, although they are often produced as high-molecular mass protein aggregates when refolded from inclusion bodies of E. coli.

These findings would be valuable to design molecular vaccines against enteropathogenic E. coli producing LT (enterotoxigenic E. coli: ETEC) or Stx (enterohemorrhagic E. coli: EHEC).

研究分野：感染症ワクチン開発

キーワード：感染症 ワクチン 組換えタンパク質発現 タンパク質リフォールディング 腸管毒素 志賀毒素 大腸菌 食中毒

1. 研究開始当初の背景

腸管毒素原性大腸菌 (EPEC) は、アジア、アフリカ、ラテンアメリカ等の途上国における細菌性下痢の最も重要な原因菌であり、罹患者数は 5 歳以下の子供で 2 - 3 億人/年、5 - 14 歳の子供で 1 億人/年、15 歳以上の成人で 4 億人/年と極めて高い。EPEC 感染は、これらの国々の幼若年齢層の死亡 (30 - 50 万人/年) の重要な原因のひとつであり、コレラと並ぶ下痢症のトップキラーである。また、先進国からこれらの途上国への旅行者にとっても重要な下痢症の原因菌でもある。さらに、わが国では下痢原性大腸菌による食中毒事例の中で EPEC に起因する発生件数が最も多いのも事実である。

このように、EPEC 感染症は、世界的にも深刻な下痢性疾患であるにもかかわらず、効果的な治療法は存在せず、脱水症状への対処療法として、下痢で失った水分を補給する Oral Rehydration Solution (ORS) が唯一の救命療法である。海外では経口不活化コレラワクチン (DUKORAL®: 国内未認証の輸入ワクチン) が実用化されており、コレラ感染症だけでなく、EPEC 下痢症の予防にも一定の効果があるとされているが、EPEC 下痢症に対し、DUKORAL®は 2 回 (1 週間間隔) の経口投与で 3 ヶ月程度の効果しか期待できない (コレラに対しては約 2 年の予防効果が期待できるとされている)。DUKORAL®は、コレラ菌の死菌 (小川株 2 種と稲葉株 2 種の計 4 種) とリコンビナント CTB (rCTB: コレラ毒素の B 鎖) を混合した不活化ワクチン (WC/rCTB) である。

これまで有効な EPEC ワクチンの開発が困難であった主な理由として、(1) EPEC が産生する易熱性腸管毒素 (LT) に対して有効なワクチンとして有望視されているその B 鎖 (LTB) を大腸菌で高発現させる技術が存在しないこと、(2) 低分子の耐熱性毒素 (ST) に対する十分な免疫原性を賦与できる技術が存在しないことなどが挙げられる。幸い、LTB と CTB は、アミノ酸レベルで高い相同性 (約 80%) を有し、免疫学的な交叉反応性を示すため、抗 CTB 抗体は LT を中和可能である。しかしながら、WC/rCTB は、LTB - CTB 間の高い交叉反応性以外、抗原特異的な類似性を欠くため、防御効果を発揮することができない。すなわち、DUKORAL®は、菌体死菌成分として大腸菌との交叉反応性を示さず、さらに、ST に対する防御効果もない。これが DUKORAL®が EPEC 下痢症に対し、弱いワクチン効果しか示さない主な理由である。

これまで世界各地で分離されてきた多くの EPEC 株は、LT⁺/ST⁺ (特に STa) である。しかも、下痢を誘発する機能において、LT と ST では大差はないとされている。よって、LT に対する免疫だけを rCTB によって誘導できるワクチン (WC/rCTB の DUKORAL®など) は、防御効果の面から不十分であるといえる。よって、コレラワクチンを EPEC の予防ワクチ

ンとして適応することには限界があり、EPEC 下痢症に対する特異性の高い新規ワクチンの開発が求められている。

2. 研究の目的

EPEC は、粘膜上皮細胞に定着するための定着因子抗原 (Colonization factor antigen, CFA) を有し、これを介して腸管上皮細胞に付着し定着する。粘膜上皮に定着した菌はそこで増殖し、LT や ST を産生して下痢を誘発する。よって、EPEC ワクチンに含まれるべき抗原は、理想的には、CFA、LT 及び ST (特に STa) の 3 つである。EPEC の定着因子として 20 種類以上が知られているが、ヒトへの高い病原性と関連しているものは数種類に限られている。よって、CS6 など特に開発途上国での分離率が高い定着因子をワクチン抗原として採用することが理想的である。一方、LT 及び STa については、EPEC の下痢誘発因子そのものであるにもかかわらず、その製造に必須となる大量発現・精製技術が十分確立されておらず、WC/rLTB のような DUKORAL®様ワクチンの開発が困難であった。

研究代表者がこれまで rCTB を様々な発現宿主 (大腸菌、酵母、植物等) で産生してきた過程で明らかになったことは、(1) rCTB は大腸菌から >100 mg/L 培養液の規模で分泌発現可能だが、融合タンパク質にしたとたん分泌発現レベルはその 1/1000 以下に減少するだけでなく、菌体内から回収できる rCTB タンパク質量もせいぜい 1 mg/L 程度に留まること、しかし、(2) rCTB は大腸菌封入体発現させ、適切にリフォールディングすることで、天然型の 5 量体を形成できること、(3) ただし、一般的に採用されているタンパク質リフォールディング法は、CTB の場合不適切で、rCTB の殆どが高分子量可溶性凝集体を形成し、分子的に極めて不均一なものになること、(4) LTB は CTB と比較し、アミノ酸レベルでの相同性が高いにもかかわらず、リフォールディング効率が低く、凝集体を形成してしまうこと、などである。よって、本事業では、rCTB-STa 融合タンパク質発現量を 1 g/L 大腸菌培養液まで高め、さらに、CS6 などの重要な定着因子を大腸菌の死菌を添加することで、不活化 EPEC ワクチンの開発に資する技術基盤を構築することを目標とした。さらに、前述のとおり、LTB と CTB は免疫学的交叉反応性を示すため、EPEC ワクチンには、LTB の代わりに CTB を利用しても何ら問題ないと考えられた。また、STa は 19 アミノ酸残基しかなく、それ単独では全く免疫原性を示さないため、CTB を STa のキャリアタンパク質とすることで、STa の免疫原性を向上させることを目指した。すなわち、本研究では、rCTB-STa 融合タンパク質 5 量体を大腸菌封入体からリフォールディングし、均一性の高い融合分子として、その回収量を 1 g/L 程度にまで高める技術を確立することを目指した。そして、この技術で調製された rCTB-STa 融

合タンパク質とCS6等の定着因子抗原を提供する大腸菌株の死菌を組み合わせることで、現行のコレラワクチンを代用する ETEC ワクチンではなく、ETEC 特異的な不活化ワクチン開発の基盤を構築することを本事業の目標に定めた。

不活化コレラワクチンが ETEC ワクチンに対し一定の効果を示すことは明らかであるが、ETEC に対し特異性の高い新たなワクチンが必要とされていることは上述したとおりである。しかし、不活化 ETEC ワクチンは、先行する DUKORAL® をモデルに開発していくことが可能であることもまた事実である。よって、ETEC ワクチン開発の課題は、(1)LTB の高発現系が確立されていないこと、(2)コレラと異なり、ほとんど免疫原性を示さないSTが ETEC 下痢症にとって重要であること、(3)コレラでは O1 及び O139 などごく限られた血清型しか流行を起こさないのに対し、ETEC の血清型は多岐に渡り、血清型抗原を標的とした ETEC ワクチン開発は非現実であることの3点である。よって、研究代表者らはこれらの3つの課題に対し、以下のように取り組むことを計画した。

- (1) LTBと交叉反応性を示す rCTB 5量体の高発現技術を確立し、rCTB を rLTB に代わる LT ワクチン抗原として開発する。
- (2) STa を rCTB と融合化し、リフォールディング技術を確立することで、rCTB-STa トキシノイド大量調製法を確立する。

3. 研究の方法

本事業では、均一性が高く、かつ、高発現する rCTB 5 量体構築法(大腸菌封入体タンパク質リフォールディング法)の確立と rCTB-STa 融合抗原の調製法の確立を目指した。タンパク質リフォールディング法は、低タンパク質濃度(0.1 mg/ml 以下)で透析する方法が希釈法が一般的である。しかし、これらの方法は、CTB などの多量体形成タンパク質を想定しておらず、そのまま適用するとタンパク質濃度が極めて低くなるため、最終的にタンパク質濃縮の工程が必要となり、その過程で凝集体を形成するか、不均一な分子構造をもつ高分子量可溶性凝集体を形成するケースが多い。我々は、大腸菌の封入体へ rCTB を大量に蓄積させた後、6 M グアニジン塩酸で可溶化し、アルギニン等を含んだ緩衝液を用いた新しい段階透析法を採用することで、均一性の極めて高い rCTB 5 量体の再構築を目指した。この方法は、10 mg/ml 以上の高タンパク質濃度でも対応できる画期的なタンパク質リフォールディング法として確立することができた。さらに、この技術を rCTB-STa 融合タンパク質だけでなく、他のエンテロトキシン(特に豚の浮腫病の原因である志賀毒素等)へ応用することも進めた。

4. 研究成果

AB5 型の代表的な腸管毒素(エンテロトキシン)には、CT、ETEC 由来の LT、そして、志賀赤痢菌や腸管出血性大腸菌(EHEC)由来の志賀毒素 1 型及び 2 型(Stx1、Stx2)が存在し、これらは人や豚等の家畜動物に対し、下痢や腸管及び全身性の症状を誘発する原因因子として極めて重要である。特にこれらの AB5 型毒素の B 鎖は、細胞表層受容体として機能する GM1-ガングリオシド(CT 及び LT の受容体)やグロボトリオシルセラミド(Gb3:Stx の受容体)と結合し、酵素活性をもつ A 鎖を細胞質内へ輸送するために必須のサブユニットであるため、抗毒素ワクチン開発の標的分子である。これまで、CTB はコレラ菌から分泌発現・精製させたものが、コレラワクチンや渡航者用 ETEC ワクチンとして用いられてきたことは上述したとおりである。また、LTB も CTB 同様、渡航者用ワクチンや豚の離乳後下痢ワクチンの主要な成分として実用化へ向けた開発が進められている。これまでの研究報告の多くは、CTB の場合、コレラ菌から分泌発現させたものや、CTB 及び LTB の場合、大腸菌の可溶性画分から分離・精製して調製したものであったが、その回収量に課題があった。この課題を克服するため、大腸菌の封入体からの B 鎖タンパク質の巻き戻し方法の開発が試みられてきたが、その殆どは分子量が不均一な高分子量可溶性凝集体として回収されるため、ワクチン開発の面で困難な局面が存在した。すなわち、これまで、Stx の B 鎖(StxB)も含め、CTB や LTB などの B 鎖タンパク質群は、均一性の高い 5 量体分子として大量に発現させることが困難であった。しかし、今回我々は、本事業を通じて、独自の B 鎖タンパク質リフォールディング法の開発に成功し、CTB、LTB 及び StxB(1 型及び 2 型の両方)全ての B 鎖タンパク質群を均一性の高い 5 量体分子として調製できる方法を確立した。この技術によって、分泌発現や菌体破砕物から回収する少量の可溶性 B 鎖タンパク質へ依存することなく、当該ワクチン候補 B 鎖タンパク質を大量調製することが可能となった。この成果は、コレラワクチン及び ETEC や EHEC に対する組換えトキシノイドワクチン並びにそれらを基にした治療用モノクロナル抗体の開発にとって重要な技術基盤になると考えている。

本研究の最大の特徴は、これまで CTB 融合タンパク質を均一かつ高レベルで産生することができなかった問題を解決し、ETEC ワクチン開発の基盤が構築できた点である。さらに、我々は、この技術を豚の浮腫病(志賀毒素 2 型が原因で起こる豚の致死性の高い大腸菌感染症)を予防するワクチン開発へ応用することに成功している(「豚の浮腫病を予防するワクチン」特許第 9 7 0 1 7 2 4 号(米国); 特許第 6 1 7 2 5 8 2 号(日本国))。また、このエンテロトキシンに関する多量体形成技術は、鶏の産卵低下症候群(EDS)を

予防するワクチン抗原開発にも極めて重要な知見を与える結果となった。しかしながら、本事業開始当初計画した rCTB-STa の大量調製法には未だ成功しておらず、事業終了後も継続して技術基盤確立に向けた実験を進める必要がある。

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2件)

(1) Tamaki Y, Harakuni T, Yamaguchi R, Miyata T, Arakawa T. (2016) Cholera toxin B subunit pentamer reassembled from Escherichia coli inclusion bodies for use in vaccination. Vaccine 34:1268-1274. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.034. (査読有)

(2) Harakuni T, Andoh K, Sakamoto RI, Tamaki Y, Miyata T, Uefuji H, Yamazaki KI, Arakawa T. (2016) Fiber knob domain lacking the shaft sequence but fused to a coiled coil is a candidate subunit vaccine against egg-drop syndrome. Vaccine 34:3184-3190. doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.005. (査読有)

[学会発表](計2件)

(1) 玉城志博、原國哲也、新川武「志賀毒素 (Stx) に対する B 鎖標的型組換えワクチンの分子構築」第 20 回日本ワクチン学会学術集会(東京都新宿区京王プラザホテル)2016年10月22-23日

(2) 原國哲也、安藤清彦、坂元隆一、上藤洋敬、宮田健、山崎憲一、新川武「鶏の産卵低下症候群 (EDS) に対する組換えワクチン抗原の構築とその効果」第 19 回日本ワクチン学会学術集会(愛知県犬山市名鉄犬山ホテル)2015年11月14-15日

[産業財産権]

取得状況(計2件)

名称:「豚の浮腫病を予防するワクチン」
発明者:横川顕治、脇貴志、本田容子、上藤洋敬、瀬脇智満、新川武、原國哲也、宮田健
権利者:化学及血清療法研究所、株式会社ジェクタス・イノベーターズ(国立大学法人琉球大学認定バイオコンサルティング企業)
種類:特許
番号:特許第9701724号(米国);特許第6172582号(日本国)
取得年月日:2017年7月11日(米国);2017年7月14日(日本国)

[その他]

(研究成果発信・教育講演・アウトリーチ活

動等)

(1) 新川武、玉城志博「家畜用リコンビナントタンパク質性ワクチン開発」一般財団法人日本生物科学研究所社内特別セミナー 日本生物科学研究所
2017/1/27

(2) 新川武「組換えワクチン開発における抗原デザイン技術および発現解析」関西バイオビジネスマッチング2017 千里阪急ホテル 2017/2/23

(3) 新川武「タンパク質デザインによる感染症ワクチン開発」琉球大学熱帯生物圏研究センター共同利用研究会・計算科学と感染症研究、2015年11月13日、琉球大学

(4) 新川武「感染症対策としてのワクチン戦略」琉球大学熱帯生物圏研究センター市民公開シンポジウム、2015年8月30日、那覇市

(5) 原國哲也、新川武「食中毒菌 O157:H7 に対するワクチンおよび治療用抗体医薬品の開発」イノベーション Japan 2015、2015年8月27-28日、東京

(国立大学法人琉球大学正式認定企業 株式会社ジェクタス・イノベーターズの設立ならびに研究開発活動)

ホームページ:

<https://jectasinnovators.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新川 武 (ARAKAWA, Takeshi)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授
研究者番号: 50305190

(2)研究分担者

玉城 志博 (TAMAKI, Yukihiro)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教
研究者番号: 00720822

(3)研究分担者

原國 哲也 (HARAKUNI, Tetsuya)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・ポスドク研究員(現沖縄科学技術大学院大学技術員)
研究者番号: 60593598