

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19096

研究課題名(和文) 志賀毒素に対するトキソイドワクチンと治療用モノクロナル抗体医薬品の開発研究

研究課題名(英文) Development of the toxoid vaccines and neutralizing monoclonal antibodies against Shiga toxins

研究代表者

原國 哲也 (HARAKUNI, Tetsuya)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・協力研究員

研究者番号：60593598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：EHECが産生する志賀毒素(Stx)には血清学的交叉反応性を示さない1型(Stx1)および2型(Stx2)が存在し、これらを同時に中和できるトキソイドワクチンが必要とされている。以前確立したエンテロトキシンB鎖安定化法を応用することにより、Stx1およびStx2を十分に中和可能なトキソイドワクチンを開発した。また、これらワクチン抗原を免疫源として、Stx1およびStx2を中和可能なモノクロナル抗体を作出した。

研究成果の概要(英文)：Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) produces two immunologically distinct types of Shiga toxin (Stx, ie, Stx1 and Stx2). EHEC toxoid vaccines should prevent intoxication caused by both types of toxins. Using the enterotoxin B subunit stabilization technology we established before, we developed the toxoid vaccines that sufficiently neutralized Stx1 and Stx2. In addition, we produced neutralizing monoclonal antibodies using the toxoid vaccines as an immunogen.

研究分野：細菌学(含真菌学)

キーワード：腸管出血性大腸菌(EHEC) 志賀毒素(Stx) サブユニットワクチン モノクロナル抗体 リフォールディング コイルドコイル分子 5量体

1. 研究開始当初の背景

食中毒の原因菌として知られる *Escherichia coli* O157:H7 などの病原性大腸菌が産生する腸管毒素は、1分子のA鎖とホモペントマーのB鎖から構成される AB₅型毒素である。その代表的例として、コレラ毒素 (CT)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 由来の易熱性腸管毒素 (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) が存在する。これらの毒素は、ヒトや家畜動物に対し、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。

AB₅型毒素のB鎖は、細胞表層受容体として機能するグロボトリオシルセラミド (Gb3 : Stx の受容体) や GM1-ガングリオシド (CT 及び LT 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、B鎖のみで毒素中和抗体を誘導可能であることが知られており、抗毒素トキソイドワクチン開発の標的分子として極めて重要な部分である。

これまで、各種発現系で CT の B 鎖 (CTB) や LT の B 鎖 (LTB) を発現させてきたが、B鎖タンパク質群は、分子安定性が低く崩壊しやすいため、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。この問題を克服するため、CTB を AB₅型毒素のモデルとして利用し、その分子安定性向上を目指した分子改変を施した。そこで、CTB 同様5量体を形成するコイルドコイル分子 (CC) に着目し、CTB の C 末端に CC を融合させたキメラ分子を構築した。CTB-CC 融合タンパク質は、100、10 分間の熱処理でも崩壊せず、GM1 との親和性を保持していた。さらに、この融合分子は、強酸 (pH 0.1) 及び高濃度の変性剤 (10% SDS) に対しても極めて安定性が高かった。この物理化学的安定性は、コイルドコイル分子に完全に依存しており、天然型 CTB では全く認められない性質であった。さ

らに、天然型 CTB が熱処理によって完全にその粘膜免疫原性を失ったのに対し、CTB-CC 融合タンパク質は、熱処理後も高い粘膜免疫原性を保持していた (Arakawa and Harakuni, Vaccine, 2014)。

2. 研究の目的

Escherichia coli O157:H7 に代表される EHEC は Stx を産生し、特に小腸で産生された Stx は、腸管上皮細胞に作用して出血性大腸炎を引き起こし、また、血中へ移行した後全身へ行き渡り、溶血性尿毒症症候群 (HUS) などの重篤な症状を引き起こす可能性のある極めて毒性の高い腸管毒素である。EHEC が産生する Stx2 は、特にそれ単独では極めて不安定で天然高次構造を保持した5量体を形成できなかった。先に述べたコイルドコイルとの融合技術を用い、(1) Stx1 および Stx2 を同時に中和可能な志賀毒素トキソイドワクチンを作製し、それを応用した(2) 抗体医薬品開発の基盤となるモノクロナル抗体を作製する。

3. 研究の方法

(1) 志賀毒素トキソイドワクチンの作製およびその性状解析

大腸菌発現系で Stx の B 鎖 (StxB) ワクチン抗原となる Stx1B および Stx2B を単体、或いはコイルドコイル分子を融合したキメラ分子を封入体で発現させた。得られた封入体は独自のタンパク質リフォールディング法 (Tamaki, Vaccine, 2016) を採用した。加えて、これら5量体分子の詳細な性状 (生化学的) 解析した。

(2) 志賀毒素トキソイドワクチンのワクチン効果の検証

得られたワクチン抗原をマウスに免疫し (2 回皮下) その後、Stx1 および Stx2 で腹腔内攻撃 (5 LD₅₀) し、その生存率を求めた。

さらに、これらワクチン抗原を接種することで誘導した抗血清を用い、受動免疫法でも毒素攻撃を耐過することが可能か検証した。また、Vero 細胞を用いた中和試験で抗血清の中和機能を評価した。

(3) モノクロナル抗体の試作

ワクチン機能を示したトキソイドワクチンを用いて毒素中和モノクロナル抗体を試作した。モノクロナル抗体作製にはハイブリドーマ法を用いた。

4. 研究成果

(1) 志賀毒素トキソイドワクチンの作製およびその性状解析

Stx1 と Stx2 の B 鎖 5 量体 (Stx1B および Stx2B) を大腸菌発現させ、得られた封入体は独自のタンパク質リフォールディング法を採用することで、効率よく StxB およびコイルドコイル融合 StxB 分子 5 量体を形成させた。その精製タンパク質をマウスへ投与し、その後各々の致死量の毒素で攻撃した。その結果、Stx1B 免疫マウスは Stx1 毒素攻撃後でも 100% 生存したが (図 1 左)、Stx2B 免疫マウスは Stx2 毒素攻撃後に 25% しか生存しなかった (図 1 右)。

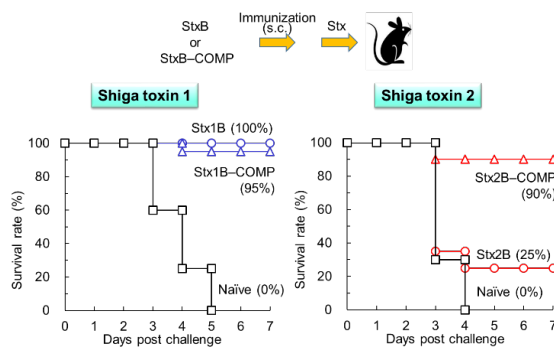


図 1 . 志賀毒素攻撃試験

Stx1B、Stx1B-COMP、Stx2B または Stx2B-COMP で免疫したマウスに志賀毒素 1 型または 2 型を投与し、その生存率を求めた。

以上の Stx1B と Stx2B のワクチン効果の顕

著な違いを究明するため、グルタルアルデヒドを用い、B 鎖 5 量体分子内における B 鎖分子間の会合力 (結合力) を解析した。すなわち、B 鎖分子間のグルタルアルデヒドによる架橋効率を 5 量体分子の安定性の指標とした。その前にまず、Stx1B 5 量体分子と Stx2B 5 量体分子は、共に変性剤 (SDS) に対する高い感受性のため、SDS-PAGE では完全に単量体へ崩壊することを確認した。次に、Stx1B と Stx2B をグルタルアルデヒドで架橋したところ (37) Stx2B が単量体と 2 量体のみ形成したのに対し、Stx1B は単量体から 5 量体まで形成され、SDS-PAGE 上でラダー状を形成した (図 2)。この結果は、Stx2B 5 量体分子が Stx1B 5 量体分子より分子的揺らぎが大きいことを示唆している。

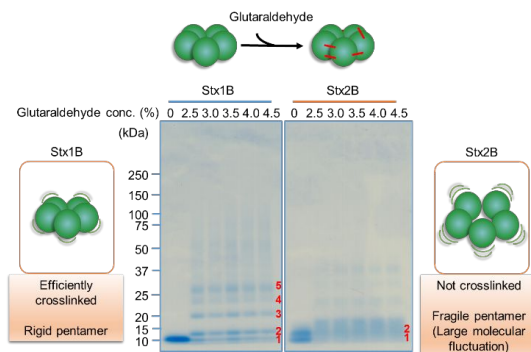


図 2 . グルタルアルデヒド架橋実験

Stx1B 分子および Stx2B 分子をグルタルアルデヒドで架橋可能か検証した。

上述のグルタルアルデヒドによる架橋実験結果を更に詳細な生化学的解析法によって裏付けるため、まず、動的散乱法 (DLS) でタンパク質粒子サイズを測定した。その結果、Stx2B 5 量体分子は Stx1B 5 量体分子と比べ、0.5 nm 程度粒子サイズが大きいことが分かった (図 3)。両者の分子量がほとんど同じであることを考慮すると、この粒子サイズの違いは両者の分子密度の違いを反映しており、Stx2B 5 量体分子の方が Stx1B 5 量体分子より分子密度が低いことを示している。次に、両分子の熱安定性を示差走査熱量測定法

(DSC)で解析した。その結果、Stx2B 5量体分子の変性中点温度 (T_m) は Stx1B 5量体分子の T_m 値より約 20 低いことが分かった(図4)。両者が結晶構造的に大きく変わらないことを考慮すると、この T_m 値の違いは Stx2B 5量体分子内の B 鎖間相互作用力の低さを示している。総じてこれらの結果は、Stx2B 5量体分子が、Stx1B 5量体分子と比較し、分子的揺らぎが大きく、物理化学的に不安定であることを示しており、上述のグルタルアルデヒドによる架橋実験結果を裏付ける結果となった。

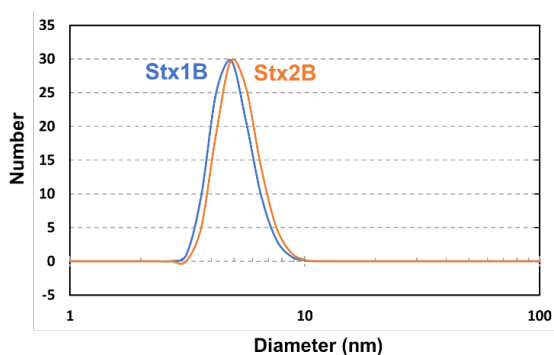


図3 . タンパク質粒子サイズ解析
動的光散乱法(DLS)でStx1B分子およびStx2B分子の粒子の大きさを求めた。

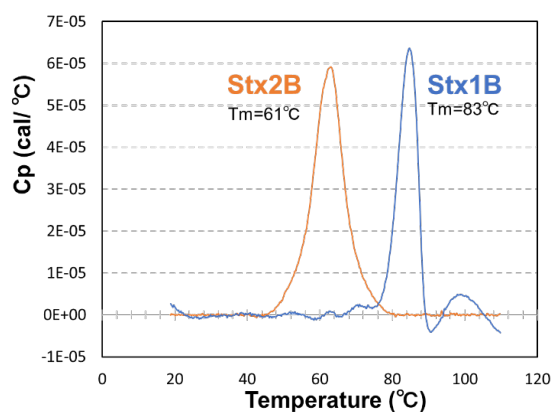


図4 . 熱安定性解析
示差走査熱量測定(DSC)でStx1B 5量体分子およびStx2B 5量体分子の変性中点温度(T_m)を求めた。

以上の生化学的な解析結果から、Stx2B 5

量体分子は、Stx1B 5量体分子より易熱性で生体への投与後、比較的短時間で単量体へ崩壊するため、中和抗体誘導に不利であることが示唆された(中和抗体誘導には5量体の分子形状が必要である)。よって、我々はこのStx2B特有の5量体分子安定性の低さが抗毒素ワクチン効果の低さの直接的原因であると結論付けた。

そこで、以前CTBをモデル抗原として確立したエンテロトキシン B 鎖安定化法(“Five-to-five technology”)をStx2Bの5量体分子安定化へ応用することにした。すなわち、CTBやStxBと同じく5量体を形成するコイルドコイル分子(cartilage oligomeric matrix protein: COMP)をStx2Bの“結束分子”として利用し、COMPとStx2Bの融合分子(Stx2B-COMP)を構築した。この融合分子は、Stx2B単体と比較し著しく高いワクチン効果を示した(図1右)。一方、Stx1B-COMP融合分子は、Stx1B単体と比較し、大差なく高いワクチン効果を示した(図1左)。以上の結果は、物理化学的に不安定なStx2B 5量体分子が本来安定性の高いCOMP 5量体分子によって拘束されたため、既に安定なStx1B 5量体分子にとって、結束分子は正負何れの影響も与えないことを示している。

毒素攻撃試験の結果を更に裏付けるために、これらワクチン抗原で誘導した抗血清を用いて、抗血清移入後の毒素攻撃試験およびVero細胞を用いた毒素中和試験を実施し、その中和機能を検証した。図1に示した能動免疫の結果と同様に、受動免疫後の毒素攻撃試験および毒素中和試験において、Stx1B、Stx1B-COMP および Stx2B-COMP に高いワクチン効果があることが確認できた(図5および図6)。

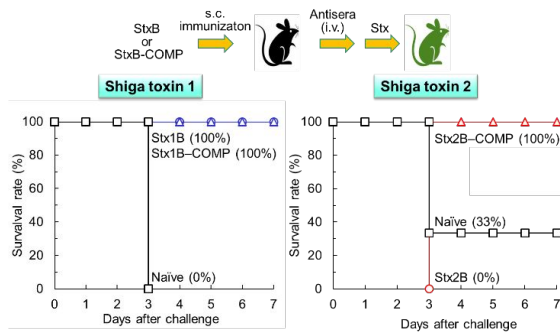


図5 . 抗血清移入（受動免疫）後の毒素攻撃試験

ワクチン抗原で誘導した抗血清を移入したマウスに志賀毒素1型または2型を投与し、その生存率を求めた。

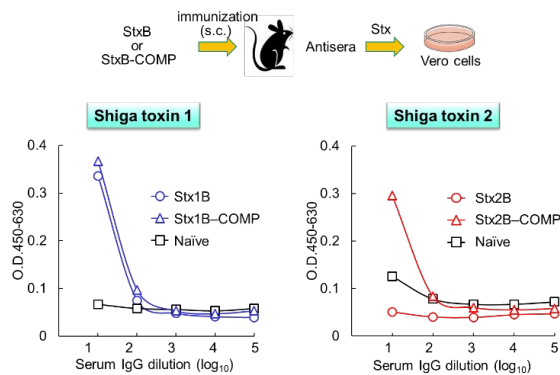


図6 . Vero細胞を用いた毒素中和試験

ワクチン抗原で誘導した抗血清と志賀毒素1型または2型を混合した溶液を Vero 細胞に添加し、その生存率を求めた。

(3) モノクロナル抗体の試作

上記に示したように Stx1B および Stx2B-COMP はワクチン機能を示すことが分かったことから、これらワクチン抗原を用いて中和モノクロナル抗体の作出を試みた。その結果、Stx1 および Stx2 を中和するモノクロナル抗体を数種得ることができた(図7および図8)。

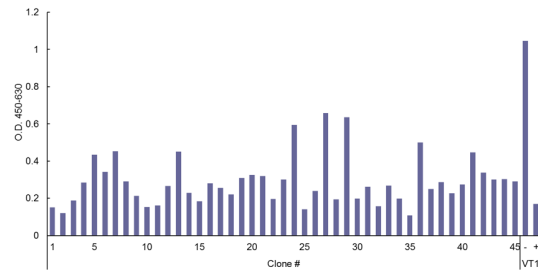


図7 . Stx1B で作出したモノクロナル抗体の毒素中和試験

Stx1B を用いて作出したモノクロナル抗体各クローンと志賀毒素1型を混合した溶液を Vero 細胞に添加し、その生存率を求めた。

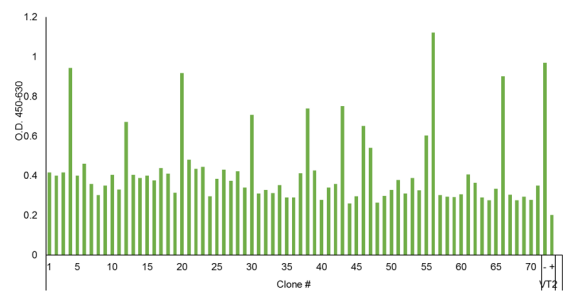


図8 . Stx2B-COMP で作出したモノクロナル抗体の毒素中和試験

Stx2B-COMP を用いて作出したモノクロナル抗体各クローンと志賀毒素2型を混合した溶液を Vero 細胞に添加し、その生存率を求めた。

<引用文献>

Arakawa Takeshi, Harakuni Tetsuya (2014) Cholera toxin B subunit -five-stranded -helical coiled-coil fusion protein: "five-to-five" molecular chimera displays robust physicochemical stability. Vaccine 32:5019-26

Tamaki Yukihiro, Harakuni Tetsuya, Yamaguchi Rui, Miyata Takeshi, Arakawa Takeshi (2016) Cholera toxin B subunit pentamer reassembled from Escherichia coli inclusion bodies for use in vaccination. Vaccine 34:1268-74

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

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．2016 年 10 月 22 日～23
日．京王プラザホテル(東京都新宿区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原國 哲也 (HARAKUNI, Tetsuya)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・協力
研究員

研究者番号：60593598