

令和元年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19132

研究課題名(和文) クロストリジウム・ディフィシル感染症に対するDNAワクチンの開発と応用

研究課題名(英文) Development of DNA vaccine for Clostridium difficile infection

研究代表者

妹尾 充敏 (Senoh, Mitsutoshi)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：20646624

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)：医療関連感染として問題となっているClostridioides (Clostridium) difficile感染症(CDI)の新たな予防法として、C. difficileの主要な毒素の1つであるtoxin Bのレセプター結合領域をベクターに組み込んだDNAワクチンを構築した。培養細胞にて目的タンパク質が産生された、マウスにおいて目的抗体が産生された、目的抗体がtoxin Bとの結合能および細胞障害活性の中和能を有していた、目的抗体はtoxin Bのみならずtoxin Aに対しても効果を示した。これらの結果から本ワクチンはCDIに対して有用なDNAワクチンであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Clostridioides (Clostridium) difficile感染症(CDI)の新たな予防法として、毒素を標的としたDNAワクチンを構築した。毒素を標的としたワクチンはトキソイドが有名であるが、毒素活性の残存や復帰の可能性がある。しかし、本研究で構築したDNAワクチンは毒素の活性領域を完全に取り除いているため、トキソイドのような副反応は起こらない。さらに、本ワクチンはC. difficileの主要な毒素であるtoxin Bとtoxin Aのどちらにも効果があるため、非常に高い効果が期待される。よって、コントロールすることが難しいCDIに対する有用な手法の1つになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Clostridioides (Clostridium) difficile infection (CDI) is a global health concern because of the high recurrence rate after standard antibiotic therapy. As serious intestinal conditions occur by C. difficile toxins, we considered measures about inactivation of toxins. Vaccination is one of prevention measures by which low recurrence rate is expected. In this study, DNA vaccine for C. difficile toxin B devoid of toxic active site was synthesized and inserted to pVAX1 to construct DNA vaccine. DNA vaccine thus prepared was transfected to HEK293T cells, and the expression of the target proteins were confirmed by western blot. Immunized mice by DNA vaccine produced anti-C. difficile toxin B antibodies and these antibodies neutralized cytotoxic activity of toxin B. Interestingly, immunized mice by DNA vaccine protected cytotoxic activity of toxin A in spite of DNA vaccine for toxin B. These results show the potential of DNA vaccine which constructed in this study as a vaccine for CDI.

研究分野：細菌学

キーワード：Clostridium difficile Clostridioides difficile CDI DNAワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Clostridium difficile は、抗菌薬関連下痢症・腸炎の主要な原因菌である。ヨーロッパやアメリカなどの先進国では、1980年代から院内感染の原因菌として *C. difficile* に注目しているため (Wüst *et al.*, J Clin Microbiol., 1982, 16:1096-1101) 医療関係者の認知度は高く、入院患者に対し、*C. difficile* 感染症 (CDI) とその予防方法について適切な説明が行われている。さらに、CDI 対策や *C. difficile* 研究も活発に行われている。しかし、それでも未だに CDI をコントロールすることはできていない。一方、我が国においては、1980年代から *C. difficile* の病原性に関する研究は行われているが (Nakamura *et al.*, Microbiol Immunol., 1980, 24:995-997) 臨床応用に繋がる成果は得られていない。そのため、医療関係者の認知度は低く、多くの医療施設で CDI 対策が行われていない。しかしながら、CDI の重症例では大腸全摘などの腸切除を行わなければならないことや死亡例の報告も稀ではないため (Khanafar *et al.*, World J Gastroenterol., 2013, 19:8034-8041) 本菌の対策は急務であると考えられる。

2. 研究の目的

CDI の治療には、メトロニダゾールやバンコマイシンなどの抗菌薬が使用されるが、近年、それらの低感受性株の出現が報告されている。また、CDI は再発する症例が非常に多い。つまり、抗菌薬での治療後、再び *C. difficile* を獲得してしまい、再感染することや、治療で完全に除去できなかった芽胞状態の *C. difficile* が治療後に増殖することにより再燃することがある。このような状況から、CDI の新たな治療法や対策が必要とされている。本研究では、この状況を克服するには、ワクチンで予防することが最も適していると考え、毒素をターゲットにしたワクチンを開発することを目的とした。通常、毒素をターゲットにしたワクチンは、トキシドが一般的であるが、毒性復帰などの副反応の問題がある。そこで本研究では、副反応を考慮した安全性の高いワクチンとして、毒素の活性領域を除いた DNA ワクチンの開発を行うこととした。

3. 研究の方法

1) DNA ワクチンの構築

Toxin B のレセプター結合領域をクローニング領域とした。まず、コドンの最適化を行った toxin B のレセプター結合領域に制限酵素サイトを付加した合成遺伝子を作成し、クローニングを行った。その後、哺乳類発現ベクターである pVAX1 に遺伝子断片を組み込み、DNA ワクチンとした (Baliban *et al.*, Infect Immun., 2014, 82:4080-4091; Jin *et al.*, Hum Vaccin Immunother., 2013, 9:63-73; Gardiner *et al.*, Vaccine, 2009, 27:3598-3604)。

2) 培養細胞を用いたタンパク質発現

1)において構築した DNA ワクチンを HEK293T 細胞に化学的手法を用いトランスフェクションした。24時間培養した後、細胞内からタンパク質を抽出し、DNA ワクチンがコードしている toxin B のレセプター結合領域のタンパク質が発現しているかを toxin B に対する抗体を用い、ウエスタンブロッティング法にて確認した。また、同様のウエスタンブロットを toxin A に対する抗体を用いても行った。

3) 抗体の細胞毒性中和能の確認

マウスに DNA ワクチンを 2 回の追加接種を含む計 3 回 (1 日目、14 日目、28 日目) 接種し、42 日目に全血液を採取し、血清を調製した。この血清とリコンビナント toxin B を混合し、培養細胞を用いて toxin B の細胞毒性が血清中の抗体によって中和されるかを確認した。抗体価の測定は ELISA 法を用いて測定した。また、同様の細胞毒性中和実験をリコンビナント toxin A を用いても行った。

4) 致死活性阻害効果の確認

DNA ワクチンをマウスに 3)と同様のスケジュールで計 3 回接種した。42 日目にリコンビナント toxin B をマウスに投与し、DNA ワクチンの接種が toxin B による致死活性を妨げることが可能かを調べた。また、同様の致死活性阻害実験をリコンビナント toxin A を用いても行った。動物実験の 3R を考慮し、観察期間は 7 日間とした。

4. 研究成果

1) HEK293T 細胞における toxin B レセプター結合領域の発現

pVAX1 に toxin B のレセプター結合領域を組み込むことで構築した DNA ワクチンを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に細胞を破碎し、真核細胞内で目的のタンパク質が発現するかを toxin B に対する抗体を用い、ウエスタンブロッティング法で確認した。その結果、toxin B のレセプター結合領域と考えられるタンパク質が検出された (図 1A)。また、この細胞破碎液中に toxin A に対する抗体にも反応するタンパク質があるか調べたところ、抗 toxin A 抗体にも反応するタンパク質が認められ、その中の最も強度の高いバンドは、抗 toxin B 抗体に反応したタンパク質と同等のサイズであった (図 1B)。



図 1. pVAX1 に toxin B のレセプター結合領域を組み込んだ DNA ワクチンを導入した HEK293T 細胞の細胞破砕液のウエスタンブロット。(A) 一次抗体として toxin B に対する抗体を使用。(B) 一次抗体として toxin A に対する抗体を使用。M: サイズマーカー; 1: DNA ワクチンを導入した HEK293T 細胞破砕液; 2: pVAX1 を導入した HEK293T 細胞破砕液

2) マウス血清中の抗体価

DNA ワクチンを接種したマウスの血清中に toxin B に反応する IgG 抗体が存在するか ELISA 法を用いて調べた。その結果、pVAX1 を接種したコントロールマウス群の血清中では認められなかった toxin B に対する IgG 抗体が DNA ワクチンを接種したマウス群では認められた(図 2A)。また、同様の実験をリコンビナント toxin A を用いて行ったところ、DNA ワクチンを接種したマウスの血清中には、toxin B に対する抗体価ほどではないものの、toxin A に対する IgG 抗体も認められた(図 2B)。

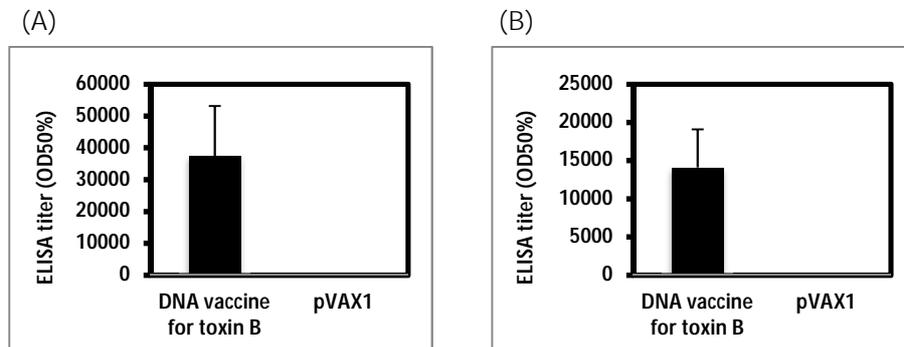


図 2. DNA ワクチンを接種したマウスの血清中の抗体価。(A) リコンビナント toxin B を固相に吸着。(B) リコンビナント toxin A を固相に吸着。どちらも血清を反応させた後、酵素標識された抗マウス IgG 抗体を使用。

3) マウス血清の細胞障害活性の中和能

DNA ワクチンを接種したマウスの血清がリコンビナント toxin B の Vero 細胞に対する細胞障害活性を中和するか調べた。その結果、コントロールマウス群の血清では認められなかった toxin B の細胞障害活性の中和能が DNA ワクチンを接種したマウス群の血清では認められた(図 3A および B)。また、同様の実験をリコンビナント toxin A を用いて行ったところ、DNA ワクチンを接種したマウス群の血清で、toxin A の細胞障害活性も中和することができた(図 3C および D)。それぞれの力価は図 4 に示した。

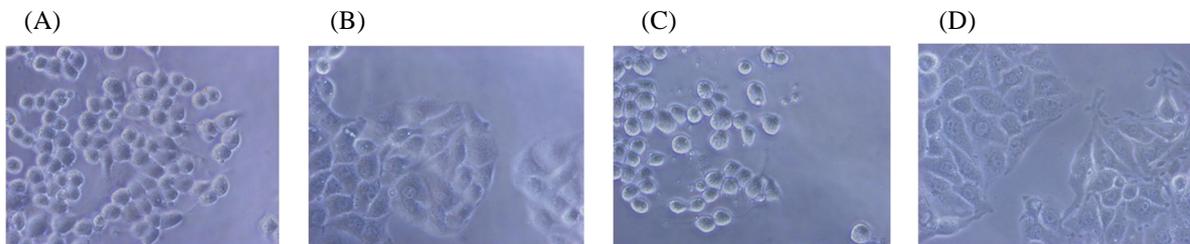


図 3. マウス血清の細胞障害活性の中和能。(A) pVAX1 を接種したコントロールマウスの血清とリコンビナント toxin B を室温で 1 時間反応させた溶液を 80% コンフルエント Vero 細胞へ接種。(B) DNA ワクチンを接種したマウスの血清とリコンビナント toxin B を室温で 1 時間反応させた溶液を 80% コンフルエント Vero 細胞へ接種。(C) pVAX1 を接種したコントロールマウスの血清とリコンビナント toxin A を室温で 1 時間反応させた溶液を 80% コンフルエント Vero 細胞へ接種。(D) DNA ワクチンを接種したマウスの血清とリコンビナント toxin A を室温で 1 時間反応させた溶液を 80% コンフルエント Vero 細胞へ接種。

Pathog. 2018 123:42-46. doi: 10.1016/j.micpath.2018.06.039. Epub 2018 Jun 27. 査読有
Nanki K, Mizuno S, Matsuoka K, Ono K, Sugimoto S, Kiyohara H, Arai M, Nakashima M, Takeshita K, Saigusa K, Senoh M, Fukuda T, Naganuma M, Kato H, Suda W, Hattori M, Kanai T. Fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection in a patient with ulcerative colitis. Intest Res. 2018 16(1):142-146. doi: 10.5217/ir.2018.16.1.142. 査読有

[学会発表](計8件)

Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Hitoshi Honda, Yasuaki Tagashira, Erik R. Dubberke, Kimberly Reske, Margaret A. Olsen and The *Clostridium difficile* infection Japan Study Group, The burden of *Clostridioides difficile* infection in Japan: a prospective multi-center study. 6th International *Clostridium difficile* Symposium, 2018年9月, Bled (Slovenia)

Hidekazu Niwa, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Eri Uchida, Yuta Kinoshita, Yoshinari Katayama, Mitsutoshi Senoh, Haru Kato, Whole-genome analysis of *Clostridioides difficile* strains isolated from horses in Japan. 6th International *Clostridium difficile* Symposium, 2018年9月, Bled (Slovenia)

妹尾充敏、加藤はる、柴山恵吾 *Clostridium difficile* 感染症に対する DNA ワクチンの開発
第92回日本感染症学会学術講演会 第66回日本化学療法学会総会 合同学会 2018年6月
岡山コンベンションセンター(岡山)

Mitsutoshi Senoh, Haru Kato, Masaaki Iwaki, Keigo Shibayama, Development of DNA vaccine for *Clostridium difficile* infection. 第91回日本細菌学会総会 2018年3月 福岡国際会議場(福岡)

妹尾充敏、福田靖、本田仁、田頭保影、加藤はる、柴山恵吾 日本の *Clostridium difficile* 感染症疫学研究報告-タイピング解析- 第91回日本感染症学会学術講演会 第65回日本化学療法学会総会 合同学会 京王プラザホテル(東京)

福田靖、妹尾充敏、本田仁、田頭保影、加藤はる、柴山恵吾 日本の *Clostridium difficile* 感染症疫学研究報告-細菌学的検査法における比較解析- 第91回日本感染症学会学術講演会 第65回日本化学療法学会総会 合同学会 京王プラザホテル(東京)

田頭保影、妹尾充敏、福田靖、加藤はる、本田仁 日本の *Clostridium difficile* 感染症疫学研究報告-発生率とリスクファクター- 第91回日本感染症学会学術講演会 第65回日本化学療法学会総会 合同学会 京王プラザホテル(東京)

Mitsutoshi Senoh, Development of vaccine for *Clostridium difficile* infection. 第90回日本細菌学会総会 2017年3月 仙台国際センター(宮城)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。