

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06388

研究課題名(和文)細菌の外膜小胞を利用した新機軸のニワトリ用ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of a novel vaccine platform for chickens using bacterial outer membrane vesicles

研究代表者

谷 浩行 (TANI, Hiroyuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00305658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリを対象とした新規ワクチン技術基盤として、細菌外膜小胞(OMV)の応用について検討した。モデル病原体としてSalmonella Enteritidis(SE)を採用し、SEの組換えワクチン候補抗原タンパク質を発現する非病原性大腸菌OMVの作製、およびニワトリに対するワクチン効果の検証を試みた。SEの組換えワクチン候補抗原タンパク質を表層、および内腔に発現する非病原性大腸菌OMVを作製することに成功し、ゲノム改変技術を用いて作製したOMV高産生大腸菌株から高収率に回収することが可能であった。一方、緊急事態宣言による研究機関の活動制限により、ニワトリへの投与試験は実施できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリは飼料要求率に優れ、少ない飼料で短期間に多くの肉や卵を生産することができ、国土が狭く、労働人口が減少している我が国にとって主要な動物性タンパク源として非常に高い可能性を有している。本研究で着目したOMVは、増殖能・感染性がない、優れたアジュバント効果を示す、低コストで大量に作製し得る、温度・化学物質に対して非常に安定である等、ワクチンの素材として理想的な特徴を備えている。本研究で得られた成果は、非病原性大腸菌OMVをプラットフォームとして使用することにより、さまざまな病原体のワクチン抗原を自在に作製・利用し得ることから、新たなワクチン基盤技術として今後の応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The application of bacterial outer membrane vesicles (OMVs) as a novel vaccine technology platform for chickens was investigated. Using Salmonella Enteritidis (SE) as a model pathogen, we attempted to develop nonpathogenic E. coli OMVs expressing recombinant vaccine candidate antigen proteins of SE and to verify their vaccine efficacy against chickens. The nonpathogenic E. coli OMVs expressing the SE recombinant vaccine candidate antigen protein on the surface and in the lumen were successfully produced and recovered in high yield from a high-producing E. coli strain of OMVs produced by genome modification technology. On the other hand, due to restrictions on the activities of the research institute caused by the declaration of a state of emergency, the administration test to chickens could not be conducted.

研究分野：獣医学

キーワード：ニワトリ用ワクチン 大腸菌外膜小胞 サルモネラ

1. 研究開始当初の背景

我が国の食料自給率は、現在、カロリーベースで40%前後、先進国の中では最低の水準となっており、特に畜産物は、飼料、飼育資材を含めそのほとんどを輸入に頼っている。世界的な人口増加に伴う食料需要の増加、新興国との輸入の競合の増加は、我が国の畜産物の安定供給に対する、すでに顕在化するリスクとして報告されており（平成27年度食料供給に係るリスクの分析・評価結果、農林水産省）、国内自給率の向上は、喫緊の最重要課題である。さらに近年の家畜や畜産物の国際間貿易の増大は、十分な家畜衛生対策がとられていない国や地域からの越境性動物疾病の国内への侵入リスクを高め、畜産業に対する大きな脅威となっている。これら感染症の防除にワクチンの接種が推奨されているが、予防する疾病ごとにそれぞれ製造・接種が必要であることから、生産者の大きな負担となっている。研究代表者はこれまで、病原体によらない、新機軸のニワトリ用ワクチンの開発を目指し、大規模食中毒の原因菌である *Salmonella* Enteritidis (SE) の抗原タンパク質を用いたサブユニットワクチンや、その発展型として、表面に SE の組換えワクチン候補抗原タンパク質を発現した非病原性大腸菌を不活化ワクチンとして利用する技術の開発を行ってきたが、いずれも一定の効果は認められるものの、実用化には至っていない。

本研究で着目した細菌外膜小胞 (OMV) は、生菌が放出する数十～数百 nm 径前後の膜小胞であり、主に外膜から構成され、ペリプラズム中のタンパク質を内包する。OMV は、増殖能・感染性がない、宿主細胞に取り込まれて免疫賦活効果を示すことからアジュバントを必要としない、低コストで大量に作製し得る、温度・化学物質に対して非常に安定であり、サブユニットワクチンに求められる保存環境は必要としない等、ワクチンの素材として非常に理想的な特徴を備えている。OMV のワクチン応用に関する研究は、主にヒトを対象として盛んに行われている。現在、ヒト用の髄膜炎菌血清群 B の OMV を使用したワクチンが開発され、すでに米国、欧州を中心に認可されている (Bexsero®、ノバルティス)。一方、産業動物を対象とした OMV ワクチンの開発は人と比較すると遅れており、特に家禽を対象とした OMV ワクチンに関する報告はほとんど認められない。また、いずれも対象とする病原体の OMV について検討しており、投与量、投与ルートに関しても詳細な検討はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類とは免疫機構が大きく異なる鳥類、特に産業動物として重要なニワトリにおいて、OMV が新規のワクチン技術基盤として応用し得るのかどうかを検証するため、感染防除に液性免疫、細胞性免疫、さらに定着を防止する粘膜免疫のすべてを必要とする SE をモデル病原体として採用し、以下の点について検討を試みた。

- (1) SE の組換えワクチン候補抗原タンパク質を発現する非病原性大腸菌 OMV の作製
- (2) 上記 OMV のニワトリに対する免疫賦活効果および感染防除効果の検証

3. 研究の方法

- (1) SE の組換えワクチン候補抗原タンパク質を発現する非病原性大腸菌 OMV の作製

研究代表者らはこれまでに、アンカータンパク質として *Salmonella* Typhimurium の 型分泌装置の B ドメインを用い、大腸菌外膜外側に組換えタンパク質を固定・発現するプラスミドベクターを構築し、SE ワクチン候補抗原タンパク質である鞭毛の構成タンパク質 FliC を表層に発現する非病原性大腸菌 OMV を作製した。本研究では、組換えタンパク質を大腸菌外膜内側に固定・発現するアンカータンパク質として、大腸菌リポタンパク質のシグナルシーケンス (Lpp) および Lpp にそれぞれ大腸菌主要外膜タンパク質 (OmpA) の 46-88 (lpp-ompA46-88)、46-132 (lpp-ompA 46-132)、46-174 (lpp-ompA46-174) アミノ酸残基を連結した4種の発現プラスミドベクターを新たに構築した。それらの発現プラスミドベクターを、ompT を欠失した *E. coli* K12 株を用いて発現誘導を行い、免疫学的手法および Protease accessibility assay (PK assay) により、最適な構成を選別した。FliC に加え、同じく SE ワクチン候補抗原タンパク質であり、宿主の腸粘膜上皮細胞への侵入に関与する SipC をコードする遺伝子配列を、それぞれ選別した発現プラスミドベクターに挿入し、それら形質転換体の発現誘導を行い、培養液上清から OMV を精製した。OMV 放出促進のため、発現誘導後の菌液に4種類の抗生物質をそれぞれ添加し、OMV の収量を比較した。精製した OMV における FliC、および SipC の発現と局在を、免疫学的手法および PK assay により確認した。さらに、透過型電子顕微鏡を用いて OMV の形態学的評価を行った。

OMV 収量の向上を目的に、Red recombinase を用いる系を利用して、大腸菌の外膜とペプチドグリカン層の架橋の形成に関わる *nlpI*、およびペリプラズム腔内でシャペロンとして働くプロテアーゼである *degP* をコードする遺伝子を欠失させた $\Delta nlpI$ 株、および $\Delta degP$ 株を作製した。FliC を大腸菌外膜外側に発現するプラスミドベクターを用いて、野生株 (WT) および遺伝子欠失株を形質転換し、OMV の収量を評価した。また、免疫学的手法、PK assay および透過型電子顕微鏡を用いて、OMV における FliC の発現と局在および形態学的な変化について

評価した。

(2) 上記 OMV のニワトリに対する免疫賦活効果および感染防除効果の検証

作製した OMV をニワトリに種々の濃度およびルート（点眼、筋肉内）で投与し、血中・小腸粘液中の IgG、分泌型 IgA 抗体価、および脾臓の Th1、Th2 サイトカイン発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて経時的に定量解析を試みた。免疫後のニワトリに SE を感染させ、主要臓器および糞便中に生残する菌数を経時的に定量し、感染防除効果について検討を試みた。

4. 研究成果

(1) SE の組換えワクチン候補抗原タンパク質を発現する非病原性大腸菌 OMV の作製

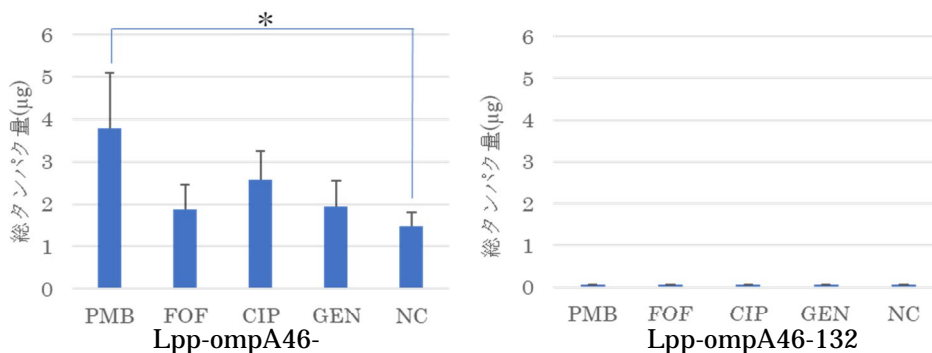


図 1. 抗生物質の添加による OMV 産生量の変化

新たに構築した 4 種の発現プラスミドベクターのうち、lpp-ompA46-174、および lpp-ompA46-132 形質転換体において大腸菌外膜内側における His-tag の発現が確認された。これら形質転換体から OMV を精製したところ、lpp-ompA46-174 の形質転換体で十分な回収量が得られた。さらに、lpp-ompA46-174 の形質転換体に、抗生物質としてポリミキシン B (PMB) を添加することにより、有意な OMV の収量の増加が認められた（図 1）。

FliC および SipC をコードする遺伝子配列を挿入した lpp-ompA46-174 発現プラスミドベクターの形質転換体から OMV を精製し、性状解析を行った結果、OMV 内腔に SE ワクチン候補抗原タンパク質を発現していることが確認された（図 2）。

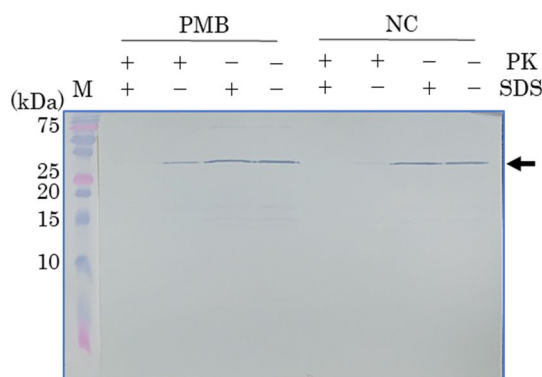


図 2. 精製 OMV 中の FliC タンパク質の局在

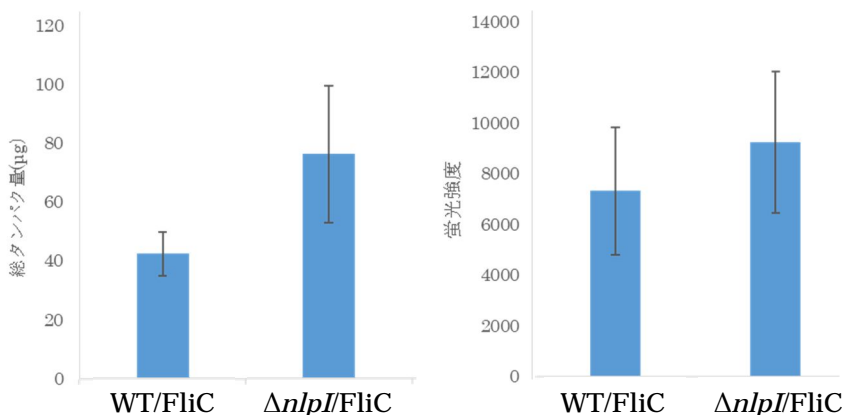


図 3. ΔnlpI 株における OMV 産生量の変化

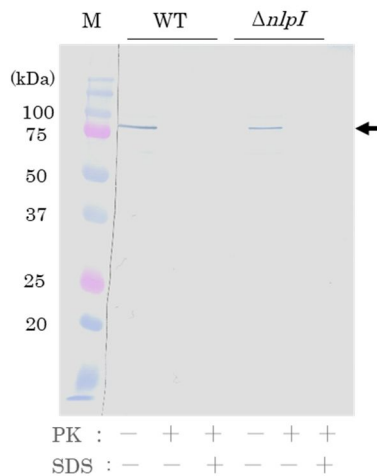


図 4. 精製 OMV 中の FliC
タンパク質の局在

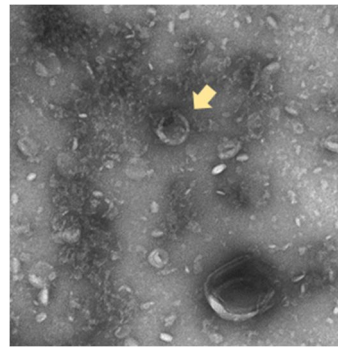


図 5. $\Delta nlpI$ 株の OMV の透過型電子
顕微鏡像

FliC を大腸菌外膜外側に発現するプラスミドベクターを用いて、野生株 (WT) および遺伝子欠失株を形質転換し、OMV の収量を比較したところ、WT と比較して $\Delta nlpI$ 株で増加していた (図 3)。精製した OMV の性状を解析した結果、OMV 表層に FliC の発現が認められ (図 4)、透過型電子顕微鏡を用いた形態学的な評価においても、コントロールと比較して変化は認められなかった (図 5)。

(2) 上記 OMV のニワトリに対する免疫賦活効果および感染防除効果の検証

ニワトリに対する投与実験は、断続的な研究施設の活動制限により、長期の継続実験が不可能であったため、実施できなかった。

今後、本研究で作製した OMV 高産生大腸菌株およびワクチン抗原を表層・内側に発現する非病原性大腸菌由来 OMV の免疫賦活効果および感染防除効果について検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasugi Mayo, Hatoya Shingo, Motooka Daisuke, Matsumoto Yuki, Shimamura Shunsuke, Tani Hiroyuki, Furuya Masaru, Mie Keiichiro, Miyake Masami, Nakamura Shota, Shimada Terumasa	4. 巻 16
2. 論文標題 Whole-genome analyses of extended-spectrum or AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli isolates from companion dogs in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0246482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aono Kimiya, Azuma Yasu-Taka, Nabetani Tomoyo, Hatoya Shingo, Furuya Masaru, Miki Mariko, Hirota Kana, Fujimoto Yasuyuki, Nishiyama Kazuhiro, Ogata Yoshiyuki, Mochizuki Tomofumi, Tani Hiroyuki	4. 巻 210
2. 論文標題 Correlation between toll-like receptor 4 and nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) and pathological severity in dogs with chronic gastrointestinal diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetimm.2019.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Hitoshi, Furuya Masaru, Soma Takehisa, Hayashiuchi Yoshiki, Yoshiuchi Ryusaku, Matsubayashi Makoto, Tani Hiroyuki, Sasai Kazumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Prevalence of microorganisms associated with feline gingivostomatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Feline Medicine and Surgery	6. 最初と最後の頁 103 ~ 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1098612X18761274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安木 真世, 鳩谷 晋吾, 元岡 大祐, 島村 俊介, 谷 浩行, 古家 優, 三重 慧一郎, 三宅 眞実, 中村 昇太, 嶋田 照雅
2. 発表標題 Antimicrobial-resistant bacteria in clinical specimens and feces of companion animals
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 植田充美	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 246
3. 書名 細胞表層工学の進展	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岡村 雅史 (Okamura Masashi) (70374775)	帯広畜産大学・畜産学部・教授 (10105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------