

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21480

研究課題名（和文）生体内抗体を活用したヒッチハイクがんワクチンの創製

研究課題名（英文）Hitchhiking vaccine using natural antibody as an antigen delivery carrier

研究代表者

吉岡 靖雄（Yoshioka, Yasuo）

大阪大学・微生物病研究所・特任教授（常勤）

研究者番号：00392308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、「体内に普遍的かつ大量に存在する自然抗体に対して強固に結合可能なヒッチハイクペプチド」を用い、体内の抗体を送達キャリアとして活用することで、抗原の動態を最適化する“ヒッチハイクワクチン”とも言うべき新たなワクチンの概念構築を図った。その結果、自然抗体に結合するヒッチハイクペプチドを独自に同定すると共に、本ペプチドを抗原送達キャリアとして活用することで、抗原特異的抗体の産生を増強するという第一の目標は達成でき、ヒッチハイクペプチドの萌芽的概念を実証することができた。一方で、抗原特異的CD8陽性細胞の増強には至らず、今後、さらなる改良が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の抗体を抗原送達キャリアに活用しようとする発想はこれまで少なく、本研究成果は、新たな着眼点に基づくワクチン開発の方法論を提唱するものである。特に、感染症ワクチンへの適用は期待される。がんワクチンへの適用については、今後の課題が多いものの、本研究を継続することで、新たな治療戦略に向けた基礎知見が得られるものと期待される。また、同定されたペプチドに結合する自然抗体の特性を精査することで、自然抗体の誘導メカニズムの解明にも繋がるなど、基礎研究への発展にも寄与できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present project, we tried to develop hitchhiking vaccine using natural antibody as an antigen delivery carrier. We identified peptides which can bind to natural antibody strongly using phage display system. Fusion antigen with our identified peptides induced antigen-specific antibody strongly in mice. However, it did not induce antigen-specific CD8+ T cells and further investigation is needed. We believe that this system will provide novel vaccine system for infectious diseases and cancer.

研究分野：医療薬学

キーワード：ワクチン がん 感染症 薬物送達システム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における死亡原因1位のがんは、多くの治療法が存在するものの、未だ根治不能な病と言っても過言ではなく、新たな概念に基づく治療法の開発が急務となっている。本観点で注目される、ワクチンでがんの治療を試みる「がんワクチン」は、がん細胞で高発現する蛋白質由来ペプチド(ワクチン抗原であり、がんペプチドと略す。)を免疫賦活化剤(アジュバント)と共に投与し、がん細胞特異的な細胞傷害性T細胞の活性を高めることで、患者自身の免疫力によってがんを排除しようとするものである。2010年に前立腺がんに対するがんワクチンがFDAで承認されると共に、免疫チェックポイント阻害剤との相乗効果も相俟って、がんワクチンへの期待は再燃している。一方で未だに、がんワクチンにより治療効果が認められないケースの方が多く、普遍的な革新的治療法にすべく、更なる改良が必要不可欠な現状にある。特に致命的課題として、がんペプチドを、近傍のリンパ節に存在する樹状細胞(免疫誘導に重要な免疫細胞)に効率的に送達することが必須であるものの、分子量の小ささも相俟って体内安定性に乏しく、がんペプチド単独では樹状細胞へほとんど移行しないため、免疫応答が誘導されにくいことが挙げられる<抗原送達キャリアの欠如>。さらに、細胞傷害性T細胞を活性化するためにアジュバントの併用が必須であるものの、抗原と同様に、体内動態を制御できないため樹状細胞へ移行せず、十分な免疫応答を誘導しにくいばかりか、リンパ節以外の標的としない組織へ移行することで、予期しない副作用を招いてしまっている<アジュバント送達キャリアの欠如>。即ち、抗原とアジュバントを、標的組織・細胞であるリンパ節・樹状細胞へ適切に送達し得るキャリアの開発が、ワクチン開発における、医療薬学領域での最重要課題と言えよう。

2. 研究の目的

本観点からこれまで、抗体のFc部分を抗原に付与した抗原-Fcキメラを用いることで、抗原の体内安定性向上のみならず、樹状細胞に高発現するFc受容体を介して、抗原を効率的に樹状細胞へ送達可能となり、ワクチン効果を飛躍的に高め得ることが報告されてきた。しかし、近年の抗体医薬を鑑みても、ヒト由来Fcであったとしても、抗原-Fcキメラを投与されたヒトにおいて、Fc部分に対する抗体が産生されてしまい、内在性抗体のFc部分に結合することで、副反応に繋がる可能性が指摘されている。さらに抗体医薬同様に、作製コストが高額となることも相俟って、ワクチンとしての実用化の目途は全く立っていない。そのため、がんペプチドの体内安定性を向上させつつ、Fc受容体を介して樹状細胞に送達可能な画期的方法論の開発が待望されている。一方で体内には、糖鎖や腸内細菌等に対する自然抗体が大量に存在し、血中およびリンパ管を循環することで、異物が体内へ侵入した場合、即座に捕捉すると共に、Fc受容体を介して樹状細胞へ送達するなど、天然の抗原送達キャリアとして機能している。本事実、「体内に普遍的かつ大量に存在する1種類の自然抗体」に対して強固に結合可能なペプチドを創製することができれば、旅人が車をヒッチハイクするかの如く、そのペプチドは投与後、天然の抗原送達キャリアである抗体と結合し、樹状細胞まで効率的に送達される可能性を示すものであるが、本仮説を検証した例は世界的にも皆無である。本観点から申請者は既に、7アミノ酸からなる約10億種類のペプチドを表面提示したファージライブラリを用い、「自然抗体に結合可能なペプチド(ヒッチハイクペプチドと略す)」を約10種類先駆けて同定しており、本仮説を実証し得る状況にある。

本研究では、これらヒッチハイクペプチドを用い、体内の自然抗体を送達キャリアとして活用する“ヒッチハイクワクチン”とも言うべき、従来までのがんワクチンとは全く異なるコンセプトに基づく新たなワクチンシステム概念の確立に挑戦する。

3. 研究の方法

・ヒッチハイクペプチドの同定：C57BL6マウスおよびBALB/cマウスの血清から、プロテインGカラムを用いてIgGを精製した。ファージライブラリは、7アミノ酸からなる直鎖状ペプチドを表面提示したものを使用した。精製IgGをプレートに固相化し、ファージライブラリを添加後、洗浄し、IgGに強く結合するファージクローンを回収した。その後、ファージクローンの中から単クローンを単離し、IgGへの結合力を評価した後、ファージが表面提示しているペプチド配列を解読した。

・融合蛋白質、融合ペプチドの作製：得られたヒッチハイクペプチド候補について、肺炎球菌由来PspA、インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニン(HA)との融合蛋白質を作製した。遺伝子配列を融合させた後、組換えPspA蛋白質は大腸菌で、組換えHA蛋白質は哺乳類細胞で作製した。ニワトリ卵白アルブミン(OVA)由来のMHCクラス1エピトープペプチド(SL8)との融合ペプチドは受託合成により入手した。

・免疫誘導評価：マウスに抗原(融合蛋白質、融合ペプチド)を免疫した。CpG核酸や水酸化アルミニウムなどのアジュバントを併用する検討も実施した。その後、血液を回収し、抗原特異的抗体価をELISAで評価した。また、所属リンパ節や脾臓を回収し、抗原特異的CD8陽性T細胞のテトラマーアッセイにより評価した。

・HA特異的抗体を活用したヒッチハイクワクチンの構築：マウスにインフルエンザウイルスを

感染させ、HA に対する抗体を保有するマウスを作製した。また、抗原と HA の融合蛋白質を哺乳類細胞で作製した。この融合蛋白質をインフルエンザウイルス罹患マウスに注射免疫した後、抗原特異的抗体価を ELISA で評価した。

4. 研究成果

申請者はこれまで、C57BL/6 マウス由来の抗体を用いてヒッチハイクペプチドを同定している。一方で、C57BL/6 マウスよりも BALB/c マウスの方が、血中の抗体量が多いことに着目し、BALB/c マウス由来の抗体を用いて、再度、ヒッチハイクペプチドの同定を試みた。BALB/c マウスの血清から IgG を精製し、ランダムペプチドを表面提示したファージライブラリを用いて、IgG に結合するペプチドをスクリーニングした。その結果、多数の候補ペプチドを得ることができ、その中でも、特に IgG への結合力が高かった数種類を候補ペプチドに用いた。なお、C57BL/6 マウスにおいて同定したペプチドと同様のものもあると共に、異なる配列を有するペプチドも得ることができた。

次に、得られたペプチドと抗原の融合蛋白質を作製し、マウスに 2 回注射免疫した後、血中の抗原特異的抗体価を ELISA で評価した。抗原蛋白質としては、PspA および HA を用いた。コントロールとしては、ペプチドを付与していない野生型の抗原蛋白質を用いた。その結果、アジュバント非存在下で免疫した場合、ペプチド融合抗原群において抗体価が上昇する傾向が観察されたものの、実験毎のばらつきも多く再現性がとれず、抗体価を上昇させることは無いと判断した。そこで、水酸化アルミニウムや CpG 核酸といったアジュバントを併用した際の抗体価を測定した。その結果、野生型の抗原蛋白質を免疫した群と比較して、ペプチド融合抗原を免疫した群において、有意に高い抗体産生が観察された。以上の結果から、独自に創製したペプチドはヒッチハイクペプチドとして機能し、抗原の抗体産生を増強するなど、ワクチン抗原の送達キャリアとして有望であることが判明した。

自然抗体は、糖鎖などを認識することが知られていると共に、腸内細菌を認識する自然抗体の存在も知られている。これまでに、マウスにおいて、特定の腸内細菌を認識する抗体が同定され、本抗体の認識エピトープも明らかとなっている。そこで、このペプチドのヒッチハイクペプチドとしての有用性を上記と同様に評価した。その結果、予想に反し、ペプチド融合蛋白質においても、抗体産生を増強するに至らなかった。以上の結果からも、申請者が同定したペプチドの有用性が明らかとなった。

次に、同定したヒッチハイクペプチドが、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を増強し得るかを評価した。抗体産生の評価で用いた抗原蛋白質は、CD8 陽性 T 細胞の評価には不向きなことから、本研究では、OVA 由来の SL8 ペプチドを用いた。SL8 ペプチドは OVA 中に存在する MHC クラス 1 エピトープペプチドであり、CD8 陽性 T 細胞の評価系に汎用されるモデルペプチドである。SL8 とヒッチハイクペプチドの融合ペプチドを受託合成し、マウスに注射免疫した後、所属リンパ節および脾臓中の SL8 特異的 CD8 陽性 T 細胞をテトラマーアッセイにより評価した。アジュバントとして、CpG 核酸を用いた。その結果、抗体産生の結果とは異なり、アジュバントの有無に関わらず、SL8 ペプチド単独群と融合ペプチド群で変化は観察されなかった。なお、融合させるペプチドの数を増加させた場合においても効果の増強は観察されなかった。以上の結果から、本ヒッチハイクペプチドでは、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導増強効果は乏しいことが明らかとなった。CD8 陽性 T 細胞を増強できなかった理由は、現段階では不明である。自然抗体により強固に結合可能なペプチドのさらなる同定が必要かもしれない。一方で、融合させるペプチドの数をより増加させる戦略も考えられる。

上記の結果を進める過程で、自然抗体にこだわることなく、生体内に存在する抗体を抗原送達キャリアに適用できるのではないかと考えた。成人および高齢者は、多くの病原体に曝露経験を有すると共に、多くのワクチンを接種している。例えば、インフルエンザに対するワクチンを毎年接種する人も多いであろう。そのため、ほぼ全ての成人の血中には、インフルエンザウイルスに対する抗体が存在することが知られている。そこで、このインフルエンザウイルスに対する抗体を自然抗体として捉え、抗原送達キャリアとして適用可能かを検証した。まず、成人や高齢者を模倣するため、マウスにインフルエンザウイルスを感染させ、HA に対する抗体を保有するマウスを作製した。抗原としては、抗原と HA を融合させた HA 融合蛋白質を用いた。HA 融合蛋白質をインフルエンザウイルス罹患マウスに注射免疫したところ、アジュバントを加えなくとも、強力に抗原特異的抗体を誘導可能であることが判明した。野生型抗原の場合は、抗原単独では全く抗体産生を誘導できず、アジュバントを併用した場合にのみ抗原特異的抗体を誘導可能である。さらに、HA 融合蛋白質群においては、アジュバント非存在下においても、野生型抗原のアジュバント併用群と同等の高い抗体産生を誘導することが明らかとなった。なお、本検討は注射免疫による結果であり、現在、別の研究費を用いて、粘膜ワクチンにおける有用性を評価しているところである。本結果をもとに、将来的には、HA の抗体認識エピトープをヒッチハイクペプチドとして用いたワクチン開発も可能と考えている。

以上、本研究では、自然抗体に結合するヒッチハイクペプチドをファージライブラリにより独自に同定すると共に、本ペプチドを抗原送達キャリアとして活用することで、抗原特異的抗体の産生を増強するという第一の目標は達成でき、ヒッチハイクペプチドの萌芽的概念を実証することができたと考えている。また、成人や高齢者を対象として、インフルエンザウイルスに対する抗体など、既に体内に存在する抗体を抗原送達キャリアとして用いた注射型ワクチンのコン

セプトも実証できた。一方で、独自のヒッチハイクペプチドでは、抗原特異的 CD8 陽性細胞を向上させることは出来なかった。今後、用いる抗原ペプチドを工夫するなど、さらなる改良が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibuya Meito, Tamiya Shigeyuki, Kawai Atsushi, Hirai Toshiro, Cragg Mark S., Yoshioka Yasuo	4. 巻 24
2. 論文標題 Synergistic effect of non-neutralizing antibodies and interferon- for cross-protection against influenza	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103131 ~ 103131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉岡靖雄
2. 発表標題 感染症ワクチンの開発に向けて
3. 学会等名 第48回日本マイコプラズマ学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------