

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21350090

研究課題名（和文）

ケミカルバイオロジー手法による腸内常在菌への抗原提示と粘膜ワクチンへの展開

研究課題名（英文） display of synthetic antigens on intestinal bacteria based on chemicalbiology and their applications for mucosal vaccines

研究代表者

貞許 礼子 (SADAMOTO REIKO)

お茶の水女子大学・お茶大アカデミック・プロダクション・特任助教

研究者番号：50372264

研究成果の概要（和文）：従来、生きたバクテリアの表面に人工的に提示できる分子は、遺伝子組み換えを利用したタンパク質に限られていた。研究代表者らは新たに、生きたバクテリアの表面にさまざまな化合物を提示させることが出来る方法として、簡単なバクテリア細胞壁前駆体化合物（グルコサミン1リン酸誘導体）を利用した手法を開発した。本研究では、このグルコサミン1リン酸誘導体は、動物細胞培養系において、動物細胞に影響を与えることなく、バクテリアだけを修飾することに使えることが示された。

研究成果の概要（英文）：The bacterial cell-wall precursor GlcLev-1-P was not displayed on the mammalian cell surface. To confirm the orthogonal properties, bacteria-specific surface display in a co-culture system of intestinal epithelial cells (Caco-2, HT29, LS180) and bacteria is currently underway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：

科研費の分科・細目：複合化学 生体関連化学

キーワード：乳酸菌、大腸菌、バクテリア細胞壁、糖ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

粘膜ワクチンは粘膜を介して抗原を曝露し免疫を誘導する手法だが、一般的な注射によるワクチンに比べ大きなメリットがある。注射による抗原の接種とは異なり、粘膜ワクチンの場合全身系免疫および粘膜免疫システムを同時に活性化できるため、病原菌やウイルスの初発感染防御が可能となる。粘膜ワクチンの大きな課題は、抗原キャリアの開発である。現在までに開発されている薬剤輸送システムの多くは静脈注射を前提にしたものが多く、腸管などの粘膜に効率よく抗原を取り込ませるには全く新規なアプローチが

必要となる。申請者は、すべての細菌が共通してもつ細胞壁に非天然のタグ分子を提示するための手法を開発してきた。これにより生きた細菌へさまざまな抗原を提示できる。本研究申請は、それら前駆体と抗原を経口摂取することで腸内細菌に抗原を結合させ、腸内細菌そのものを粘膜ワクチンのキャリアーとして用いるという新しいワクチン手法を開発することが目的である。

腸管に存在する粘膜上皮細胞は免疫機能の監視のため、積極的に腸内の細菌を取り込んでいる (Science 303, 1662, 2004) ことから、申請者らの手法をもちいて細菌表面に抗原

を提示させることによって、抗原を腸管から効率よく粘膜免疫システム(主に樹状細胞)に輸送することが可能になると考えた。腸内細菌は500種あるいはそれ以上とも言われているが、培養できるのはその約20%だけである。この手法であれば、これまでに培養ができなかった生きた腸内細菌の表面にも抗原を提示させることができるので、粘膜免疫への効果的な作用が期待できる。

これまでは、一般に生きたバクテリアの表面に人工的に提示できるものは、遺伝子組み換えを利用して行うタンパク質に限られていたが、研究代表者らは生きたバクテリアの表層に目的の機能性官能基を提示する「バクテリア表層の化学改変技術」を開発・改良してきた(Sadamoto et al. J. Am. Chem. Soc. 9018-9019, 2002) この論文はその独創性および新規性から、アメリカ化学会誌 Chemical & Engineering News 2002年8月5日号で紹介され、同誌12月16日号では2002年に発表された論文の中のバイオテクノロジー部門のハイライト研究の一つに選出された。その後、研究をすすめて、バクテリア表面に人工糖鎖(マンノペンタオース誘導体)を提示させることで、基板への表面の接着性を変化させることに成功した(J. Am. Chem. Soc. 3755-3761, 2004)。さらに、より簡便な化合物を利用した手法を、本研究に先立つ基盤研究B2006-2008年度、「癌ワクチン開発を目指したバクテリア表層化学改変」で開発し、Chem. Eur. J. に発表した(2008年、10192-10195ページ)。この手法を *in vivo* でつかうことで、我々の腸内に存在する腸内常在菌に抗原を提示させることができる。腸管常在菌は腸管から効率よく樹状細胞などに取り込まれることがわかっており、本手法を遺伝子組み換えを使わない新しい視点での粘膜ワクチンへと展開出来ると期待される。

## 2. 研究の目的

申請者は近年、低分子の人工細胞壁前駆体が、細菌に取り込まれ、細菌表層の細胞壁を足場として任意の分子を提示することができる手法を報告してきた。米国の Bertozzi らは、動物細胞への提示を目的に細胞表層糖鎖に取り込まれる前駆体(マンノサミン誘導体)を報告している。一方、申請者は細菌の細胞壁に取り込まれる分子(N-アセチルグルコサミン誘導体)をターゲットとしている点が大きく異なる。N-アセチルグルコサミン誘導体では動物細胞の表層に分子を固定化させることはできないことが報告されており(国際糖質学会2008年 Bertozzi らの報告)、申請者の手法は細菌特異的に任意の分子を固定化できる。動物細胞に影響することがなく、前駆体および抗原を経口投与するだけで効率よく生体内の細菌に抗原を提示させること

が可能になる。

## 3. 研究の方法

まず、動物細胞と細菌の共培養系において、バクテリア細胞壁前駆体として用いる GlcNAc 誘導体(右参照。ケトン基を持つ。)が細菌だけに取り込まれること(オルソゴナル性)を検証する(図1)。細胞としては、腸管上皮細胞モデルとしてよく用いられる Caco-2、HT-29 のほか、HeLa など代表的な細胞を用いた。動物細胞に取り込まれることがわかっている ManNAc 誘導体(C. A. Bertozzi et al. Angew. Chem. Int. Ed. 118, 910, 2006, 下図参照)をポジティブコントロールとして用いて比較検討する。評価は、ケトン基に特異的に反応する蛍光剤で標識して蛍光顕微鏡観察により行った。

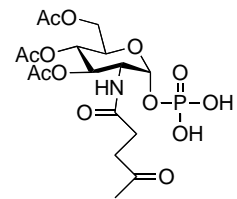


図1. 化合物が動物細胞に影響がないかどうかを確認する

## 4. 研究成果

そこで、動物細胞と細菌の共培養系において、バクテリア細胞壁前駆体として用いる GlcNAc 誘導体が細菌だけに取り込まれること(オルソゴナル性)が重要となる。細胞壁前駆体として GlcNAc-1 リン酸誘導体を使って、動物細胞への影響を見た。ポジティブコントロールとして動物細胞に取り込まれることがわかっている ManNAc 誘導体を用い、細胞としては腸管上皮細胞モデルとしてよく用いられる Caco-2、Jurkat 細胞を用いて行った(図2)。

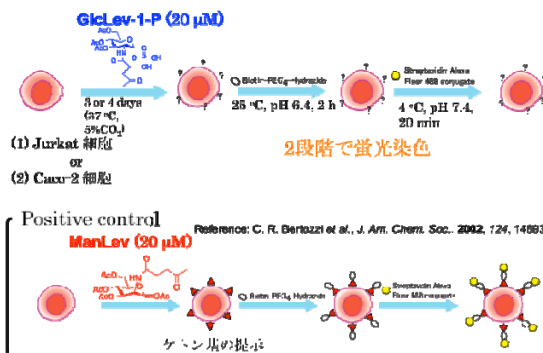


図2. Jurkat 細胞と Caco-2 細胞を用いた実験の方法

どちらの細胞においても、GlcNAc 誘導体は細

胞増殖に影響せず(図 3)、また、細胞表面修飾は観察されなかった(図 4)。このことから、この化合物は生体内でのバクテリア特異的な修飾に使用可能であることが示唆された。

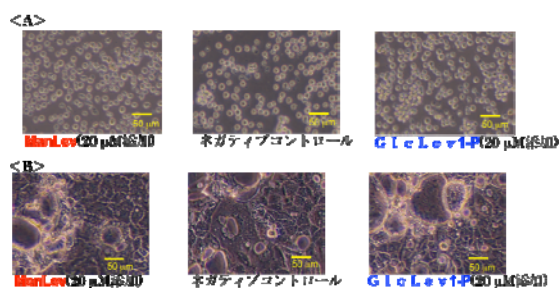


図 3 GlcNAc 誘導体を添加して培養した動物細胞の位相差顕微鏡写真(倍率 100 倍)。(A) Jurkat 細胞、(B) Caco-2 細胞

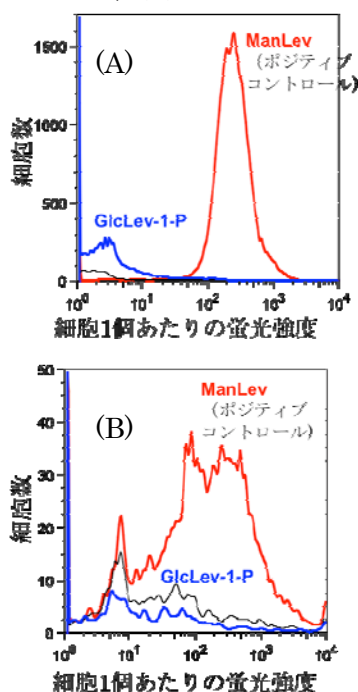


図 4. フローサイトメーターによる解析結果。(A) Jurkat 細胞、(B) Caco-2 細胞

#### 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)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 上村祐介, 森崎千珠, 奥村渚, 鹿田碧子, 貞許礼子: 糖誘導体を利用したバ

クテリア表層化学修飾法, 第 30 回日本糖質学会年会, P-068(長岡, 2011. 7)

- ② C. Morisaki, Y. Sato, M. Oohori, R. Tsuru, K. Sekimata, R. Sadamoto: Chemical modification of bacteria for the development of a mucosal vaccine, PACIFICHEM 2010, 291 (Honolulu, Hawaii, USA, 2010. 12)
- ③ 森崎千珠, 上村祐介, 大堀雅子, 鈞瑠璃恵, 貞許礼子: 細胞との共培養系における選択的化学修飾を目指したバクテリア表層修飾, 第 59 回高分子学会討論会, 3Pb128(札幌, 2010. 9)
- ④ 貞許礼子: 森崎千珠, 上村祐介, 大堀雅子, 鈞瑠璃恵, 腸内細菌のイメージングを目指したバクテリア表層修飾法, 第 59 回高分子討論会, 1X20(札幌, 2010. 9)
- ⑤ C. Morisaki, Y. Sato, M. Oohori, R. Tsuru, K. Sekimata, R. Sadamoto: Surface engineering of bacteria for the development of a mucosal vaccine, The 25th International Carbohydrate Symposium, B-P5-050 (Chiba, Japan, 2010. 8)
- ⑥ 森崎千珠, 佐藤佑樹, 大堀雅子, 鈞瑠璃恵, 関亦克彦, 貞許礼子: 粘膜ワクチンの開発に向けたバクテリアの表面修飾, 第 59 回高分子学会年次大会, 1J23(横浜, 2010. 5)
- ⑦ 森崎千珠, 佐藤佑樹, 大堀雅子, 関亦克彦, 貞許礼子: 分子提示を目的としたバクテリア表層化学修飾, Glyco Tokyo 2009, 27(東京, 2009. 11)
- ⑧ 貞許礼子, 関亦克彦: 分子提示を目的としたバクテリアの表層工学の開発, 第 58 高分子学会討論会, 2Pf160(熊本, 2009. 9)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

貞許 礼子 (SADAMOTO REIKO)

お茶の水女子大学・お茶大アカデミック・プロダクション・特任助教

研究者番号: 50372264

##### (2) 研究分担者

幸田 敏明 (KODA TOSHIAKI)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 20170186

##### (3) 連携研究者

なし