

## 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 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590497

研究課題名（和文）

粘膜アジュバント LT を用いた結核菌に対する経鼻投与サブユニットワクチンの開発

研究課題名（英文）

Subunit vaccine for Tbc with mucosal adjuvant activity of LT

研究代表者

辻 孝雄 (TSUJI TAKAO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：60171998

研究成果の概要（和文）：

本研究では、BCG 抗原 (Ag85A, B, C) 及び TB7.3 を除く結核菌特異抗原 (CFP-10, EAST-6, PPE) の精製に成功した。しかし各抗原と LTB との融合体は凝集し易く精製出来ていない。また精製抗原+mLT のマウス経鼻投与による BCG または結核感染予防実験では、BCG 抗原の BCG または結核感染予防効果は低かった。さらに結核特異抗原については、結核菌感染予防実験が数ヶ月の時間を要するため、現在も検討を行っている。

研究成果の概要（英文）：

Ag85A, B or C of BCG and CFP-10, EAST-6, PPE or TB7.3 of Tbc were overproduced and purified. Although TB7.3 was aggregated and could not be purified, the others were purified and used for antigens to immunize mice with mutant LT as the mucosal adjuvant. We determined that the mice immunized with Ag85A, B or C plus mLT were not effective for prevention of BCG or Tbc infection. As we need much time to determine whether CFP-10, EAST-6, PPE or TB7.3 from Tbc will be effective to Tbc infection as the vaccine, we are doing some experiments to determine it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：結核抗原、毒素原性大腸菌、下痢毒素(LT)、Ag85A, B, C, CFP-10

## 1. 研究開始当初の背景

結核ワクチンの BCG は、予防薬としての効果が疑問視されている。そこで、BCG に代る新型の生 BCG ワクチン、DNA ワクチンとサブユニットワクチン開発が試みられている。申請者はサブユニットワクチン開発を目的として本申請を企画した。まず、

死菌 BCG+mLT の経鼻免疫により BCG に対する CMI が誘導され、死菌 BCG が感染防御免疫を誘導することを明らかにし (Vaccine, 24, 3591. 2006 と Vaccine, 24: 3719. 2006)、結核抗原を mLT とともに経鼻投与することにより、結核菌に対する CMI を誘導することができる可能性を示唆した。

これまで、経鼻投与ワクチンとしてBCGおよび結核抗原の試みは少なく、本申請は非常に独創性がある研究と考えられる。また、その結果は将来的に社会的貢献が期待される。

## 2. 研究の目的

BCGの結核へのワクチン効果が疑問視され、新型BCGワクチンやDNAまたはサブユニットワクチンの作成が試みられている。そこで、本申請は結核菌への経鼻投与サブユニットワクチン作成を目的とした。まず、粘膜アジュバントとして、毒素原性大腸菌の下痢毒素 (LT) の変異体 (mLT) と死菌BCGを経鼻投与し、BCGへの細胞性免疫 (CMI) とBCGへの感染防御能が増強していることを報告した (*Vaccine*, 24, 3591. 2006)。またmLTはマクロファージのIL-12とTNF $\alpha$ 産生を促進し、CMIを増強した (*Vaccine*, 24:3719. 2006)。従って、mLTは結核菌に対するCMIを促進し、結核菌への感染防御能を増強する可能性が示唆された。

また、我々は世界で始めてprionとLTのBサブユニット (LTB) の融合体を作成し、抗prion抗体の誘導に成功した (*Vaccine*, 24:2815. 2006.)。さらにmLTが志賀毒素の液性免疫を増強することを報告した (*Vaccine*, 26. 469, 2008 と *Vaccine*, 26:2092. 2008)。

以上の実験経過を基に以下の項目を行い、経鼻投与サブユニットワクチン開発を行う。

(1) サブユニットワクチン抗原の調整：BCGと結核菌共通抗原のAg85A, B, C、結核菌特異RD遺伝子産物のCFP-10, EAST-6, PPE, TB7.3のクローニングとAg85A, B, CとCFP-10の精製を終了した。さらに他の抗原の調整を行なう。

(2) 各抗原とLTBとの融合体の作成：各抗原とLTB遺伝子を結合し、融合体を作成する。

(3) 結核菌に対する感染防御能の強弱の

検討：(1), (2) で調整した抗原+mLTのマウスの免疫で、結核菌に対する感染防御能に優れた経鼻投与サブユニットワクチンを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) BCGのAg85A, BとC遺伝子および結核菌からのCFP-10, EAST-6, PPE, TB7.3遺伝子の調整BCGおよび結核菌全遺伝子からPCR法により目的の抗原遺伝子を増幅し、TA cloning kitを用いてサブクローニングを行う。遺伝子配列を決定し目的の遺伝子がクローニングされていることを確認する。

(2) 各遺伝子から産生される産物の調整

目的とする遺伝子をpTrcHis2Aに挿入する。各遺伝子を挿入したpTrcHis2AをBL21またはJM109株に形質転換し、IPTGを含むLB培養液で培養する。遠心で集菌し、imidazoleを含む緩衝液内で、超音波処理を行う。遠心後、緩衝液で平衡化したHiTrap sepharose カラムにアプライし、imidazoleのgradientで、抗原および融合体を溶出する。さらに、DEAEカラムを用いて、精製を完了する。

(3) 抗原とLTBとの融合遺伝子の作成

抗原とLTBとの融合遺伝子の作成は、overlap extension PCR法で行う。抗原遺伝子とLTB遺伝子の1端にlinker (YAPQDPやGSGGSGなど) をつけ、抗原とLTB遺伝子の一部重複させてPCR法で増幅する。さらに、linkerの部位と一部重複させた部位を用いて、抗原遺伝子とLTB遺伝子のPCR産物を再PCR法で結合し、PCR産物をTA cloning kitに挿入する。挿入後、目的とする遺伝子であることを確認して、pTrcHis2Aに挿入する。

(4) 融合遺伝子産物の精製

融合遺伝子をpTrcHis2Aに挿入し、BL21またはJM109株に形質転換し、IPTGを含むLB培地で増菌、融合体を産生させる。精製は、2) の各遺伝子から産生される産物

の調整に準ずる。5) BCGおよび結核菌に対する感染防御実験7週令、メスのマウスに、抗原または融合体(10 $\mu$ g/匹)+mLT(10 $\mu$ g/匹)を1週間の間隔において、3回経鼻投与する。最後の投与後、4週間を経て10の6乗個のBCGまたは結核菌を、静脈注射する。そして、2週間後に、脾臓と肺を取り出し、0.5%Triton X-100を含んだ緩衝液内で組織破壊を行う。遠心後一定量の破壊液を種々の増殖因子を加えた7H11培地に塗布し、一定時間後にコロニーの数を計測する。

#### 4. 研究成果

本研究の研究目的は、以下の3点にあった。

1. BCG又は結核菌の特異抗原と変異毒素(mLT)の経鼻投与による結核菌への予防効果を検討する。
2. 結核特異抗原(CFP-10, EAST-6, PPE, TB7.3)を分離精製し、mLTと同時にマウス経鼻免疫を行い、標準結核菌株に対する感染防御を検討する。そして経鼻投与結核サブユニットワクチンの開発を行う。
3. BCG又は結核特異抗原とLTBの融合体を作成し、結核菌に対する予防効果を検討する。

そこで研究期間内に実験を行ったところ、以下の結果を得た。

1. BCG又は結核菌の特異抗原とmLTの経鼻投与によるBCGまたは結核菌への予防効果を検討に関して

BCGと結核菌の共通抗原として抗原性の高いAg85A, B, Cの過剰産生系の確立とその精製に成功した。しかしAg85A, Ag85BまたはAg85C+mLTのマウス経鼻免疫では、BCGと結核菌に対する感染予防能力が低いことが、明らかになった。これは、Ag85A, B, C抗原以外、特に結核菌特異抗原をワクチンに加える必要があることを示している。

そこで、本実験では結核菌特異RD-1, 2, 3遺伝子がコードするCFP-10, EAST-6, PPE、

TB7.3の精製を試み、さらに粘膜アジュバントとしてmLTを用いBCGと結核菌に対するワクチン効果を検討することとした。

2. 結核特異抗原(CFP-10, EAST-6, PPE, TB7.3)遺伝子のクローニングと分離精製に関して

(1)CFP-10, EAST-6, PPE, TB7.3の4種類の全遺伝子のクローニングを終了した。さらに各因子の精製では、CFP-10, EAST-6, PPの蛋白精製には成功した。しかし、TB7.3は過剰産生には成功したが、非常に頑固な凝集塊ができ、溶解に成功していない。現在TB7.3抗原に関して精製を試みている。

- (2)各抗原+mLTで経鼻免疫し、BCGまたは結核菌に対する感染防御能の検討に関して

上記で精製されたCFP-10, EAST-6, PPの結核特異抗原+mLTの混合液をマウスに経鼻投与して、標準結核菌株への感染防御能を検討した。しかし、この感染防御実験には、一実験で結果を得るまでに数ヶ月必要である。しかも、明確な結果を与えるには少なくとも3回の実験が必要である。

従って、この研究期間内に明確な結果を出せていない。そこで、この点に関して、現在も検討を行っている。

3. BCG又は結核特異抗原とLTBの融合体を作成し、結核菌に対する予防効果の検討に関して

LTB遺伝子とCFP-10, EAST-6, PPE, TB7.3遺伝子との融合遺伝子の作成には成功した。さらに、各々の過剰産生系の作成にも成功した。しかし、各融合タンパク質を過剰産生した場合、融合タンパク質は非常に凝集塊を作りやすく、その溶解と精製に成功していない。

そこで、現在も各融合タンパク質の精製を試みている。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- ①. Neri P, Tokoro S, Kobayashi R, Sugiyama T, Umeda K, Shimizu T, Tsuji T, Kodama Y, Oguma K, Mori H. Specific egg yolk immunoglobulin as a new preventive approach for Shiga-toxin-mediated diseases. PLoS One. 査読有, 6(10): (2012) . e26526. Epub
- ②. Rahman S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Taniguchi K, Icatlo FC Jr, Tsuji T, Kodama Y, Van Nguyen S, Umeda K, Oo HN, Myint YY, Htut T, Myint SS, Thura K, Thu HM, Fatmawati NN, Oguma K. Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients. Vaccine. 査読有, (2012) May 8. in res.
- ③. Neri P, Tokoro S, Sugiyama T, Umeda K, Shimizu T, Tsuji T, Kodama Y, Mori H. Recombinant Shiga toxin B subunit can induce neutralizing IgY antibody Biol. Pharm. Bull. 査読有, 35 (6) 2012, 917-923.
- ④. Ribeiro AD, Niemann FS, Gatti MSV, Lanna MSC, Tsuji T, Yano T. Putative new heat-stable cytotoxic and enterotoxic factors in culture supernatant of Escherichia coli isolated from drinking water. J Venom Anim Toxins and Trop Dis. 査読有, 17, (2011) , 103-107.
- ⑤. Koshi N., Obata H., Monma C., Nakama A., Kai A., Tsuji T. The bacteriological and epidemiological characteristics of enterotoxigenic Escherichia coli isolated in Tokyo between 1966 and 2009 J. Clinical. Microbiol. 査読有, 49, (2011). 3348-3351.
- ⑥. Nuemket N, Tanaka Y, Tsukamoto K, Tsuji T, Nakamura K, Kozaki S, Yao M, Tanaka I. Structural and mutational analyses of the receptor binding domain of botulinum D/C mosaic neurotoxin: insight into the ganglioside binding mechanism. Biochem Biophys Res Commun., 査読有, 29;411(2): (2011) . 433-9.
- ⑦. Neri P, Shigemori N, Hamada-Tsutsumi S, Tsukamoto K, Arimitsu H, Shimizu T, Akahori Y, Kurosawa Y, Tsuji T. Single chain variable fragment antibodies against Shiga toxins isolated from a human antibody phage display library. Vaccine. 査読有, 29(33): (2011) . 5340-6,
- ⑧. Nuemket N, Tanaka Y, Tsukamoto K, Tsuji T, Nakamura K, Kozaki S, Yao M, Tanaka I. Preliminary X-ray crystallographic study of the receptor-binding domain of the D/C mosaic neurotoxin from Clostridium botulinum. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 査読有, 66, : (2010). 608-10.
- ⑨. Hirai K, Arimitsu H, Umeda K, Yokota K, Shen L, Ayada K, Kodama Y, Tsuji T, Hirai Y, Oguma K. Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to Vibrio cholerae effectively prevents cholera. Acta Med Okayama. 査読有, 64(3): (2010). 163-70,
- ⑩. Arimitsu H, Tsukamoto K, Ochi S, Sasaki K, Kato M, Taniguchi K, Oguma K and Tsuji T. Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in Escherichia coli. Protein Expression and

Purification、査読有、67:(2009).96-103.

⑪. Ochi S, Shimizu T, Ohtani K, Ichinose Y, Arimitsu H, Tsukamoto K, Kato M, Tsuji T. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. DNA Res. 査読有, 16(5): (2009). 299-309.

⑫. 小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、門間千枝、甲斐明美、辻 孝雄。6種類の毒素原性大腸菌が検出された仕出し弁当を原因とする集団食中毒例と Colony-sweep PCR 法を応用した検査法について。感染症学雑誌, 査読有, 83 (5) . )2009). 490-495.

[学会発表] (計 8 件)

①. 塚本健太郎、辻孝雄、胚性腫瘍細胞 P19 を用いたボツリヌス神経毒素の作用機構の解析、第 85 回日本細菌学会総会、2012/3/29、長崎県長崎市

②. Kentaro Tsukamoto, Takao Tsuji, Structure and activity of receptor binding domain of *Clostridium botulinum* D/C mosaic neurotoxin, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011/9/7, Sapporo, Japan

③. 塚本健太郎、辻 孝雄、ボツリヌス DC モザイク毒素重鎖 C 末端領域の構造と活性について、第 8 回感染症沖縄フォーラム、2010/02/12、沖縄県宜野湾市

④. 西脇啓太、辻 孝雄、ボツリヌス C 型及び DC モザイク神経毒素は異なるガングリオンドを介して細胞内に侵入する、第 47 回日本細菌学会中部支部総会、2010/10/23、新潟県新潟市

⑤. 塚本健太郎、辻 孝雄、ボツリヌス神経毒素受容体結合領域の結晶構造と細胞内侵入機構の解析、第 57 回トキシシンポジウム、2010/07/15、滋賀県長浜市

⑥. 塚本健太郎、辻 孝雄、EC 細胞を用いた

ボツリヌス神経毒素重鎖 C 末端領域の機能解析、第 46 回日本細菌学会中部支部総会、2009/10/23、愛知県名古屋市

⑦. 塚本健太郎、辻 孝雄、ボツリヌス神経毒素の脂質受容体に対する結合活性の解析、第 41 回藤田学園医学会、2009/10/02、愛知県豊明市

⑧. 塚本健太郎、辻 孝雄、ボツリヌス神経毒素重鎖 C 末端領域の脂質受容体に対する結合活性、第 56 回トキシシンポジウム、2009/08/26、岐阜県岐阜市

[図書] (計 1 件)

辻 孝雄、ナイセリア科とその類縁属の菌について、シンプル微生物学(東 匡伸、小 熊 恵二、堀田 博編)、第 5 版、2011. 159-166.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻 孝雄 (TSUJI TAKAO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：60171998