

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 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710202

研究課題名（和文） 完全長 cDNA ライブラリを利用したダニアレルギーワクチンの開発

研究課題名（英文） Screening of house dust mite allergy vaccine candidates using full-length cDNA library.

研究代表者

二瓶 秋子（渋井秋子）（NIHEI AKIKO (SHIBUI AKIKO)）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：50313846

研究成果の概要（和文）：本研究は、ダニアレルギーに対するワクチンの開発基盤の確立を目的とした。コナヒョウヒダニ由来完全長 cDNA ライブラリのうち、約1万クローンの塩基配列情報を基に既知および未知抗原をそれぞれ20クローンずつ選定した。それら抗原を発現するベクターDNA を投与したマウスにダニアレルギーを誘導し、空ベクターを投与したマウスと比較してダニアレルギーの予防効果を検討した。その結果、これら合計 40 抗原にはダニアレルギーに対する予防効果は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：This study aims at establishing the basis for development of a vaccine for allergy caused by house dust mites (HDM). Expression vectors were constructed using 20 identified and 20 unknown genes selected from about 10,000 clones in a full-length cDNA library of HDM. These vectors and empty vectors were then administered to different groups of mice, followed by provocation with HDM. The development of HDM-induced allergic diseases was comparable between the two mouse groups, indicating that the pre-treatment with the products of the selected 40 genes was not effective as a vaccine for HDM-mediated allergy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子免疫学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ダニアレルギー・ワクチン・完全長 cDNA

1. 研究開始当初の背景

(1) ダニアレルギーワクチン研究の現状
アレルギー患者数は年々増加しており、さらに重症化が大きな社会問題となっている。アレルギー発病のメカニズムは不明な点が

多いが、コナヒョウヒダニを含むチリダニが、気管支喘息やアトピー性疾患の主要なアレルゲンであることが知られている。ダニアレルギー発症機構の解析等はマウスレベルで行われているが、患者を増やさないために最

も重要なダニアレルギー予防のためのワクチンは開発されていない。現在、ダニ抽出物とダニアレルギー患者の血清 IgE との交叉反応をもとに 22 種類のダニ抗原が同定されているが、ダニアレルギーの罹患との因果関係は不明であり、ワクチンをデザインする上での抗原至適性を欠く。一方、シンガポールのグループが、コナヒョウヒダニから cDNA ライブラリを作成し塩基配列の解析をおこなっているが、完全長ライブラリではなく汎用性が低い。我々は、Vector-capping 法 (DNA Res 2005; 12:53-62) でコナヒョウヒダニの完全長 cDNA ライブラリを世界で初めて作製し、シーケンスデータベース Full-Mite (<http://fullmite.hgc.jp/>) を公開した。

(2) 着想に至った経緯

研究代表者は、これまで長年「完全長 cDNA ライブラリを利用した新規マラリア DNA ワクチンの開発研究」に取り組んできた。これは、ネズミマラリア原虫から作成した完全長 cDNA ライブラリを DNA ワクチンとしてマウスに免疫し、チャレンジ感染後の生存、および原虫粗抗原に対する免疫応答を指標に、有効なワクチン候補をスクリーニングしていくものである。ライブラリは、研究代表者が独自に開発した強力な真核細胞用発現プロモーター CE を用い、オリゴキャップ法で作製された。スクリーニングの結果、原虫特異的抗体およびサイトカイン産生を強く誘導し、チャレンジ感染に対して生存延長効果のある計 104 クローンが選択された。

その後、チリダニの完全長 cDNA ライブラリ作製に参画し、上述したマラリアと同様に完全長 cDNA ライブラリを利用したダニアレルギーワクチンの開発を目指すに至った。

2. 研究の目的

(1) ダニアレルギーワクチンの開発基盤の確立を目的とし、コナヒョウヒダニの完全長 cDNA ライブラリとデータベース Full-Mite を用いて、既知抗原との相同性を指標に新規ダニ抗原の探索をおこなう。

(2) 選択された複数の候補を、ダニアレルギー患者検体およびダニアレルギーモデルマウスを用いて免疫学的に解析し、ワクチンに適した新規抗原を同定する。

(3) 同定した新規抗原および既知抗原をワクチン候補としてマウスに免疫し、その後ダニアレルギーを誘導して、それらのワクチンとしての有効性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 作製済みのコナヒョウヒダニ完全長 cDNA 配列データベース Full-Mite で公開して

いる、11,520 クローンにつき、データベース The Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) を用いて既知の抗原と同じ特徴を持つ新規抗原候補クローンを探索し、選択した。

(2) (1) で選択した完全長 cDNA クローンを、クローニングベクター pGCAPzF3 から真核細胞用発現ベクター pCE-FL4 に組換えた。cDNA の両端に制限酵素 *Sal* I と *Not* I の切断配列を付加して PCR 増幅後、ベクター組換えをおこない、塩基配列を確認してそれぞれの組換えクローンを得た。

(3) コナヒョウヒダニ凍結乾燥虫体 (GREER 社, RMB83M) を PBS に懸濁し、5 分間 3 回超音波破碎をした後、タンパク定量をおこない 1mg/ml の粗抗原を調製した。作製した粗抗原を用いて、マウスへのダニアレルギー性気管支喘息モデルの誘導系を検討した。アジュバント (水酸化アルミニウム) 混合粗抗原の腹腔内投与と、PBS 懸濁粗抗原の経鼻投与の組合せを種々の間隔で検討し、十分に喘息を誘導する感作スケジュールを決定した。

(4) (2) で組換えた候補クローン群を、GeneGun を用いて 1 週間おきに 3 回、マウス腹部の皮内に投与し、次いで (3) で決定したスケジュールでダニアレルギーを誘導し、DNA ワクチンとしての効果を検討した。ワクチンの陰性対照には空ベクター (pCE-FL3) 投与群および無処理群を、アレルギー誘導の陰性対照には、溶媒である PBS のみを経鼻投与した群を用いた。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 新規ダニ抗原候補分子の選択

Vector-capping 法で作成したコナヒョウヒダニ (*D. farinae*) の完全長 cDNA ライブラリのうち、既に塩基配列決定済みの 11,520 クローンを基に、新規ダニ抗原候補分子のスクリーニングを行った。11,520 クローンの 5'-, および 3'-塩基配列から、クオリティバリューの低い部分、およびベクター配列を除いてアセンブルした後、重複を除くことで、コンティグが 1,717、シングルトンが 3,368 得られた。これをデータベース The Gene Ontology を用いてクラスタリングし、既知のダニ抗原 22 種とアミノ酸配列で 80% 以上の相同性を持つものを探索した。その結果、20 の既知抗原クローン群 (Group D) と、20 の新規抗原候補クローン群 (Group HA) が選択された。これら計 40 クローンを個々に、真核細胞用発現プロモーター CE を有するベクター (pCE-FL4) に組換えた。

②アレルギー解析手法の習得とダニアレルギー性気管支喘息誘導モデルの確立
 抗原感作によるマウス気管支喘息を惹起する実験手法および解析技術を習得し、宿主の糖鎖修飾がアレルギー応答に与える影響を解析した (Allergol. Int. 2011, 60 345-354)。同時に、宿主の糖鎖修飾がアレルギーとは対照的な免疫系を惹起するマラリア感染症に与える影響も解析した (Exp. Parasitol. 129(3) 318-321)。また、近年アレルギーにおける役割が注目されてきている Th17 細胞が産生する IL-17 が、B 細胞クラススイッチに与える影響を解析した (Cytokine 2012, 掲載決定)。これらの解析結果を踏まえ、チャレンジ感作用ダニ粗抗原の調製をおこない、それを用いてダニ抗原によるマウス喘息誘導モデルを独自に確立した。水酸化アルミニウムアジュバント混合粗抗原 (100 μ g/匹) を 1 週間おきに 2 回マウス腹腔内に投与し、その 2 週間後に 3 日間連続で PBS 懸濁粗抗原 (20 μ g/匹) を経鼻投与して、4 日目に BAL 細胞の解析をおこない、ダニアレルギー性喘息が十分に誘導されている事を確認した。

③ダニ抗原候補分子の DNA ワクチン効果の検討

①、②の成果により、ダニアレルギーモデルマウスの系で、Group D, Group HA のワクチン効果の評価を、DNA ワクチンの手法で開始する準備が整った。Group D, Group HA, および陰性対照の空ベクター (pCE-FL4) を、GeneGun を用いて 1 週間おきに 3 回マウス腹部皮内に免疫し、最終免疫の 1 週間後に②のスケジュールでダニアレルギー性気管支喘息を誘導した後、BAL 細胞を解析した。その結果、Group D, Group HA とともに、肺への好酸球浸潤の抑制効果はみられなかった (図 1)。

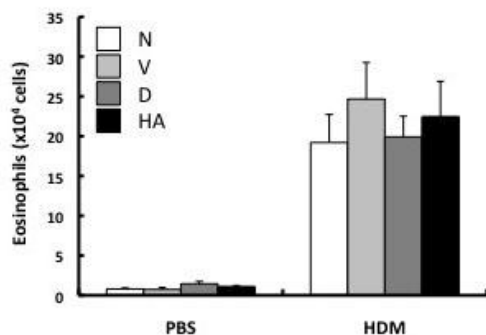


図 1. 肺への浸潤好酸球数

<図 1 の凡例>

N: ワクチン無処理群 (陰性対照 1), V: 空

ベクターワクチン群 (陰性対照 2), D: 既知抗原ワクチン群, HA: 未知抗原ワクチン群。PBS: PBS 経鼻投与群 (陰性対照), HDM: PBS 懸濁原虫粗抗原経鼻投与群。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

コナヒョウヒダニの完全長 cDNA ライブラリより、新規抗原候補 20 クローンを一度に選択したのは、本研究が世界初である。また、新規候補のみならず、既知抗原 20 クローンのグループをマウスに免疫し、その DNA ワクチン効果を検討したのも、本研究が世界初である。今のところ、ポジティブなワクチン効果は認められていないが、世界に先駆けたダニワクチンの研究データとして、そのインパクトは甚大である。

(3) 今後の展望

①今回、DNA ワクチンの効果がみられなかった原因の 1 つとして、誘導したダニアレルギーが強力すぎたため、ワクチン効果がマスクされてしまった可能性が挙げられる。今後、現在の系よりもマイルドなダニアレルギー誘導系を検討し、再度 DNA ワクチン効果を検討してみたい。既に 1 週間に 3 回、3 週間、計 9 回、PBS 懸濁粗抗原を経鼻投与するだけの系と、今回チャレンジ感作に用いた系とで、肺に誘導される好酸球の数を比較検討したが、数に差はみられなかった。

②ワクチン候補をマウスに免疫後、所属リンパ節や脾臓を回収し、ダニ粗抗原に対する免疫細胞の増殖応答やサイトカイン産生応答等を解析することにより、免疫応答の側面から、DNA ワクチン効果を確かめたい。

③ダニアレルギー患者および健常人血清を用いたワクチン候補クローンの解析について、所属研究機関における倫理委員会の承認が得られたので、今後ヒト検体を用いての実験をマウスの実験と並行して進めていきたい。

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 3 件)

- ① Akiko Shibui, Eri Shimura, Aya Nambu, Sachiko Yamaguchi, Warren J. Leonard, Ko Okumura, Sumio Sugano, Katsuko Sudo, Susumu Nakae. "Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production." Cytokine, 査読

- 有り, in press, 2012. (掲載確定)
- ② Akiko Shibui, Junko Doi, Mohammed E. M. Tolba, Chiharu Shiraishi, Yoshitaka Sato, Shumpei Ishikawa, Junichi Watanabe, Sadao Nogami, Susumu Nakae, Sumio Sugano, Nobumichi Hozumi. “*N*-acetylglucosaminyltransferase V-deficiency increases susceptibility to murine malaria.” *Experimental Parasitology*, 査読有り, 129(3) 318-321, 2011.
- ③ Akiko Shibui, Aya Nambu, Eri Shimura, Sachiko Yamaguchi, Chiharu Shiraishi, Yoshitaka Sato, Ko Okumura, Sumio Sugano, Nobumichi Hozumi, Susumu Nakae. “Alteration of immune responses by *N*-acetylglucosaminyltransferase V during allergic airway inflammation.” *Allergology International*, 査読有り, 60(3) 345-354, 2011.

[学会発表] (計1件)

- ① 渋井秋子 “気道炎症における Mgat5 の役割” 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 平成23年11月28日, 幕張メッセ (千葉県) .

[その他]

ホームページ等

<http://fullmite.hgc.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二瓶 秋子 (渋井秋子) (NIHEI AKIKO)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員
研究者番号: 50313846

(2) 研究協力者

菅野 純夫 (SUGANO SUMIO)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号: 60162848

中江 進 (NAKAE SUSUMU)
東京大学・医科学研究所・特任准教授
研究者番号: 60450409

川島 秀一 (KAWASHIMA SHUICHI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号: 50314274

野上 貞雄 (NOGAMI SADAO)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 90172767