

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：92637

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860332

研究課題名(和文) Ag85Bとミコール酸の融合分子による新規ワクチン開発

研究課題名(英文) The new vaccine development by the fusion molecules of Ag85B and mycolic acid

研究代表者

清原 秀泰(小濱秀泰)(Kiyohara (Kohama), Hideyasu)

日本ビーシージー製造株式会社(日本BCG研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：10514581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗酸菌に特徴的に見られるミコール酸(MA)とミコール酸転移酵素であるAg85Bの有する免疫活性化能を機軸に、自然状態にも存在するAg85B-MA融合分子を擬似的に再現し、両分子の特性を最大限に引き出した新規結核ワクチンの開発に挑戦した。その結果、酵素(Ag85B)と基質(ミコール酸)という自然状態でも存在する抗原とアジュバントの組合せにより、他の一般的な抗原(OVA)と比較してより高いワクチン効果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elicit an immune activating ability of Ag85B and mycolic acid (MA). In the natural state, Ag85B and MA were in the relationship between the enzyme and the substrate. Therefore we tried to mimic this Ag85B-MA fusion molecule which was thought to be the best characteristics of both molecules, and tried to use for the development of new tuberculosis vaccine candidate. As a result, antigen and adjuvant combinations of enzymes (Ag85B) and substrate (MA), as compared to other common antigens (OVA) and MA, were resulting in higher antibody-inducing ability.

研究分野：免疫学

キーワード：結核 組換えタンパク 脂質 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

感染症対策にワクチンが大きく貢献してきたことは歴史的事実である。現在、国内外を問わず新しいワクチン開発研究の動向として、組換え蛋白質抗原などの安全なコンポーネントワクチンを利用する方向に向かっている。しかし、単に精製した組換え蛋白質抗原のみを投与しても殆ど免疫応答を惹起できず、その実用化には有効なアジュバントが必須である。アジュバントはワクチン開発において極めて重要であるが、安全で有効なアジュバントの開発は困難を極めており、現時点で臨床応用可能なアジュバントはアルミニウム塩などごく限られたものしかない。アジュバントの活性として重要なことは、自然免疫を活性化して抗原を効率的に獲得免疫へと受け渡すことであり、BCG や *M.tb* を含む抗酸菌の細胞壁脂質の多くが宿主の自然免疫による生体防御機能を活性化することが知られている。例えば、トレハロースジマイコレート (TDM)、リポアラビノマンナン、リポマンナン、細胞壁骨格 (Cell Wall Skeleton, CWS) などは、抗酸菌特有の高分子成分であり、これらは自然免疫を活性化することが報告されている。これまでに TDM やグルコースモノマイコレート (GMM) の各種ミコール酸糖脂質のアジュバント活性については種々の報告がなされており、TDM のレセプターが Mincle であり Mincle が Fcγレセプターと共作用的に働いてマクロファージを活性化すること、GMM が CD1b 分子に提示されて T 細胞を活性化していること等が明らかにされている。この様に、近年抗酸菌に特徴的に見られるミコール酸 (MA) 糖脂質に関する研究は盛んに行われているが、MA 単独の免疫賦活効果に関する報告は殆どなされていない。

2. 研究の目的

脂質に関する研究はその疎水性の性質故に、蛋白質や糖質と比較して研究が著しく立ち遅れているが、脂質は医薬品を含む幅広い分野で利用されており、今後更なる発展が望める研究分野である。近年執り行われている脂質に関する研究の一つとして、抗酸菌に特徴的に見られる TDM や GMM に関する研究が挙げられるが、これらは全てミコール酸糖脂質であり MA 単独の免疫賦活効果に関する報告は殆どなされていない。これは MA が極めて強い疎水性を示す物質であり、宿主の免疫系が認識する為には親水基である糖鎖やペプチドの存在が不可欠であったと予想された。現在試みられている融合分子ワクチンの多くは、蛋白質 A (アジュバント)-蛋白質 B (抗原) のホモ融合分子からなっているが、この融合方法では蛋白質 A 及び蛋白質 B の両蛋白質に対する T 細胞応答が誘導される為、目的とする蛋白抗原 B に限定した T 細胞応答の誘導は難しい。上述の融合方法と比較して、脂質 A (アジュバント)-蛋白質 B (抗原) の融合パターンでは、蛋白質抗原 B に限

定的な T 細胞応答を誘導することが可能であり、MA-蛋白質抗原のヘテロ融合分子による免疫賦活効果を証明できれば、非常に特色のある研究になると思われた。よって我々は、この MA の有するアジュバント活性を効率的に蛋白質抗原に対する獲得免疫に適用し、それらの相乗的な免疫賦活効果を獲得した新規ワクチンを構築する為に、蛋白質抗原と MA 分子を化学的に融合した複合分子の開発を試みた。今回、研究に使用した感染防御抗原としては Ag85B を用いた。Ag85B は BCG や *M.tb* によって最も多く産生される 30kDa の分泌蛋白であり、また、強力な感染防御効果を有する為に有力な結核ワクチンの抗原候補の一つとされている。これまでに、*M.tb* より抽出された Ag85B がモルモットの *M.tb* エアロゾル感染モデルで強い感染防御効果を示したことや、Ag85B を多発現する遺伝子組換え BCG ワクチンにより、通常の BCG ワクチンと比較して優位な *M.tb* 感染防御効果が確認されたことが報告されている。Ag85B 蛋白には Ag85A、Ag85B そして Ag85C の三つのサブクラスが存在し、これらは全てトレハロースモノマイコレートのミコール酸転移に関与し、転移の過程で一時的にミコール酸と分子的に結合した複合状態を形成し、最終産物として TDM を合成する。この TDM 等のミコール酸糖脂質は強力な免疫活性化能を有することが報告されており、本研究では、ミコール酸転移酵素である Ag85B と MA の免疫原性に着目し、Ag85B と MA を化学修飾により結合させた Ag85B-MA 融合分子の作製を試み、その免疫効果を明らかにすることにより脂質-蛋白質の融合分子という新しいカテゴリーの抗結核候補ワクチン創出を目指した。我々は、過去に簡便かつ効率的なワクチン・デリバリー・システムの構築を主とした研究に取り組んでおり、近年は抗酸菌の脂質成分による免疫賦活効果のメカニズム解明について研究を行ってきた。今回の研究では、我々がこれまでに取り組んできた研究の経験と技術を活かし、蛋白質-蛋白質融合分子のワクチンへの応用を基軸に、化学修飾法を用いた蛋白質 (Ag85B) -脂質 (MA) 融合法の構築を試みた。

3. 研究の方法

我々はこれまでの研究で、既に酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いて遺伝子組換え Ag85B の発現および精製に成功していた為、今回は Ag85B の Cys-SH 基と MA を結合させることを目的として、先ず MA のカルボキシ基のアミノ基への変換を行った。MA のカルボキシ基周辺は、バルキー性の高い状態になっていると考えられる為、直鎖上のスペーサー分子を介することで Ag85B と結合させる際の立体障害を回避できるような分子を設計し、以下の方法で合成を行った。初めに、スペーサー分子の片側に保護基を導入した。1, 6-Diaminohexane を pyridine に溶解させ、氷冷下で anhydro trifluoroacetic acid を添

加し、TLC で目的物を確認した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより N-(6-aminoheptyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (Hx-TFA-amine) の精製を行い、さらに、Hx-TFA-amine のアミノ基と MA のカルボキシ基とを縮合させた後、脱保護を行い MA-Hx-amine を得た。Hx-TFA-amine を toluene に溶解後、縮合剤である HBTU 及び DIEA を添加し、この反応液に MA を添加した。HPLC で出発物が消失したのを確認した後、再結晶法にて縮合剤及び出発物の除去を行った。続いて、水酸化ナトリウムを用いて温和な条件下で TFA 基の脱保護を行い、HPLC で目的物の生成を確認した後、カラムクロマトグラフィーにより MA-Hx-amine を得た。上述の Ag85B 及び MA-Hx-amine の作製に成功した後、市販の架橋試薬 SPDP を用いて Ag85B-MA 融合分子の作製を試みたが、融合分子の形成確認の工程が難航した。rAg85B の作製及び MA の可溶化は完了していた為、これらの混合液のマウスへの免疫実験を行った。

4. 研究成果

MA-Hx-amine の作製

上述のように、MA-Hx-amine の合成を行い TLC で目的物の確認を行った結果（展開条件：クロロホルム/メタノール=9/1，発色試薬：セリウムモリブデン酸アンモニウム）MA と比較して MA-Hx-amine の移動度が低下しているのが確認された（Fig.1A）。この結果は、MA のカルボキシ基がアミノ基に変化して固定相のシリカゲルへの親和性が高まったことに起因している

Fig.1A: Thin-layer chromatography



M: MA (10µg)
H: MA-Hx-amine (10µg)

と予想される。作製した MA-Hx-amine を MALDI-TOF-MS 分析に供した結果、MA のメインピークより -29mass シフトしている分子イオンピークが確認された。更に、MA 及び MA-Hx-amine をリポソーム化し、これらのゼータ電位を測定した結果、MA/Lip のゼータ電

Fig.1B: Zeta potential (MA/Lip)

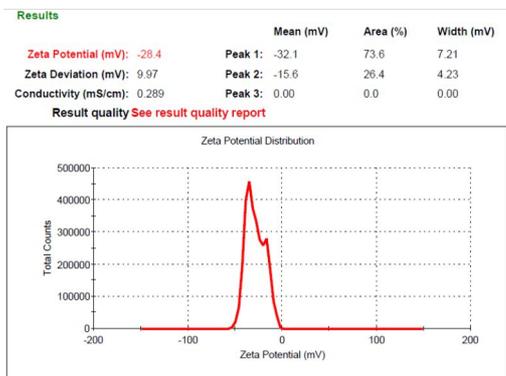
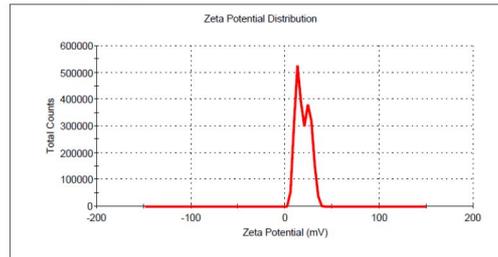


Fig.1C: Zeta potential (MA-Hx-amine/Lip)

Results	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 19.2	Peak 1: 14.6	57.0	4.04
Zeta Deviation (mV): 7.20	Peak 2: 25.7	43.0	4.03
Conductivity (mS/cm): 0.286	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality Good

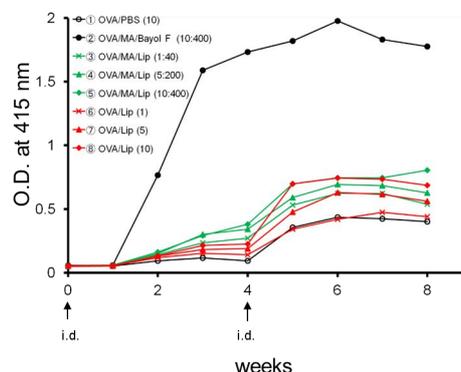


位が -28.4 mV であったのに対し MA-Hx-amine /Lip のゼータ電位は 19.2 mV であり、電位が陽転していることが確認された（Fig.1B,C）。従って、これらの結果より MA のカルボキシ基がアミノ基に変換され MA-Hx-amine が形成されていることが示された。

MA のアジュバント活性 (OVA 抗原)

上述のように MA-Hx-amine の作製には成功したが、MA-Hx-amine とタンパク抗原 (OVA) の融合を試みた結果、抗 OVA 抗体を用いた ELISA 解析では OVA-MA 融合分子の形成は確認できなかった。我々は OVA と MA の分子融合より抗原認識部位の立体構造が変化した可能性を考え、この OVA-MA 反応画分のマウスへの投与実験を行ったが、やはり OVA-MA 反応画分の免疫による抗 OVA 抗体誘導能と OVA 単独の免疫による抗 OVA 抗体誘導能を比較して差は認められなかった。これは MA の可溶化を目的としてリポソーム化を行っているため (MA/Lip)、MA-Hx-amine の反応基であるアミノ基がリポソームの構成成分であるリン脂質に内包されてしまい、タンパクの SH 基との化学修飾が阻害されているのではないかと考えている。これまでの MA をアジュバントとした実験では、MA を鉱物油 (Bayol F) に溶解して OVA 抗原とのオイルエマルジョンを形成させることにより MA のアジュバント活性を検出してきたが、MA を MA/Lip の形態として可溶化してアジュバントとした実験では、この MA のアジュバント活性は殆ど消失し、OVA と Lip の単純混合液の免疫による抗 OVA 抗体誘導能と大きな差は見られな

Fig.2: Serum IgG (1/50 dilution)

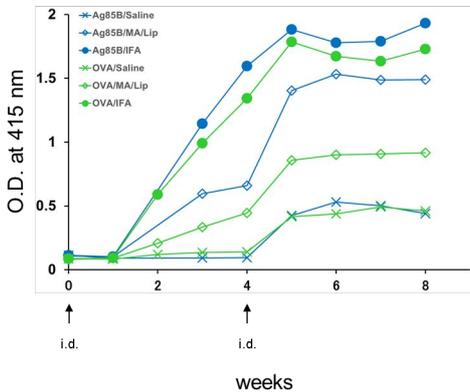


かった (Fig.2)。

MA のアジュバント活性 (rAg85B 抗原)

上述の通り、OVA をモデル抗原とした場合、MA はオイルエマルジョンの形態では強いアジュバント活性を示したが、MA/Lip の形態では殆どアジュバント活性を示さなかった。これは、OVA/MA がオイルエマルジョンの形態で存在する時は OVA と MA が密な状態にあり、OVA/MA/Lip の形態で存在する時は OVA と MA が疎な状態にあることに起因しているのではないかと考えた。Ag85B は MA 転移酵素であり、自然状態で MA を認識して結合することが報告されている。従って、Ag85B と MA/Lip を同一溶液中に存在させることによって、親和性に基づいた Ag85B と MA が密になった状態が形成される可能性を考え、OVA/IFA、OVA/MA/Lip、OVA/Lip 及び rAg85B/IFA、rAg85B/MA/Lip、rAg85B/Lip のマウスへの投与実験を行い、それぞれの抗原特異的抗体誘導能について比較を行った (Fig.3)。その結

Fig.3: Serum IgG (1/50 dilution)



果、OVA/MA/Lip 投与群は OVA/Lip 投与群より僅かに高められた抗原特異的 IgG 誘導能を示したが、OVA/IFA 投与群と比較すると著しく低い抗原特異的 IgG 誘導能が確認された。一方、Ag85B/MA/Lip 投与群は Ag85B/Lip 投与群と比較して著しく高い抗原特異的 IgG 誘導能が確認され、この MA のアジュバント活性は Ag85B/IFA 投与群と比較してほぼ同等の抗原特異的 IgG 誘導能であった (Fig.3)。

これらの結果より、実験計画当初の目的であった、Ag85B/MA の化学修飾による分子融合は達成できなかったが、Ag85B の MA 転移酵素と MA のアジュバント活性の両方の特徴を有効に活用するワクチン候補の可能性を見出すことが出来た。従って今回の我々の実験計画のコンセプト自体は達成できたのではないかと考える。今回の結果から、今後は自然状態でも存在する酵素 (Ag85B) - 基質 (MA) の関係を有効活用したワクチン・コンストラクトの構築の可能性について更なる追求を行う予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

清原秀泰、矢野郁也、中馬康志、松尾和浩、BCG 細胞壁成分アジュバント活性に関する研究、第 85 回実験結核研究会、2015 年 03 月 26、長崎ブリックホール第四会場

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清原 秀泰 (KIYOHARA, Hideyasu)
日本ビーシー製造株式会社 (日本 BCG 研究所)・研究第一部・主任研究員 (T 職)
研究者番号：10514581

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：