

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460511

研究課題名(和文) 一分子ナノ粒子を用いた偽(Pseudo)原虫の構築とそのマラリアワクチンへの応用

研究課題名(英文) A New nanoparticle glycogen for development of vaccine against malaria

研究代表者

宮田 健(Miyata, Takeshi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：20448591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規技術として一分子ナノ粒子であるグリコーゲン(NPG)を足場にした抗原の高分子量化とその生産技術の基盤構築に成功した。DNA結合タンパク質(DBP)にワクチン抗原を融合させ、DNA結合能を利用し、DNA上に抗原を配置する。さらにDBP-マラリアワクチン抗原/DNAの複合体(DBP-Vaccine/DNA)が分子全体としてマイナスの電荷を有することから、プラスの電荷を導入したNPGと静電相互作用を利用した三種複合体の創成に至った。この三種複合体は免疫実験の結果、抗原単独やDBP-Vaccine/DNA二種複合体よりも有意に高い抗体応答を示すことが分かり、本技術の有用性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new technology to enhance immune responses by generating complex which composed DNA-binding protein fused vaccine antigen, DNA and nano-particle glycogen (NPG). In this system, NPG was used as scaffold material, DNA was used as crosslinker material for vaccine antigen and NPG. New tricomponent vaccine complex (DBP-Vaccine/DNA/NPG) function was evaluated using an ookinete surface protein of Plasmodium vivax, Pvs25. The tricomplex immunized mice were conferred a high immune response compared to Pvs25 alone or DBP-Pvs25/DNA complex immunized groups. This system may be a promising approach for development of subunit vaccines against malaria.

研究分野：医歯薬学

キーワード：マラリア ワクチン 伝搬阻止 三日熱マラリア原虫

1. 研究開始当初の背景

寄生虫感染症に対しては、不活化や弱毒化等の従来法は応用が難しく、組換えタンパク質を活用した戦略（コンポーネントワクチン）が必須である。問題は組換えタンパク質抗原自身は従来法に比べ副作用も少なく、安全性が高いが、抗原の単独投与では免疫系から“無視”されやすいことである。コンポーネントワクチンの成功例としてウイルス様中空粒子（VLP）を用いたものがある。これはウイルス粒子的な形状が元来高い免疫原性をもつ事実によるところが大きい。つまり、コンポーネントとして病原体の一部を取り出すが、最終的には本来の病原体そのものに近い形状として利用することが寄生虫のワクチン開発にとって最大のジレンマかつ有効法であると言える（宮田ら、アジュバント開発研究の新展開、2011）。

国内外の寄生虫のワクチン研究開発動向としては、アジュバント（免疫賦活機能性物質とデリバリーシステム）の研究開発が主に進んでおり、自然免疫活性化物質の活用、

抗原提示細胞への高効率デリバリーシステムの開発、について様々な試行錯誤がなされている。代表者らは、の重要性は認識しており、既に独自のアジュバントを開発している（Miyata et. al., Infect. Immun., 2011、米国特許取得済）。そのなかで、マラリア原虫表層抗原を単に化学的に高分子量化（比較的ランダムな抗原配置）させただけで、感染防御能が増強するのを見いだしたことをきっかけに、抗原の高分子量化に着目した。それを汎用性の高い DNA の構造を利用した抗原の高分子量化（規則的な抗原配置）技術として構築した。この規則的な抗原配置分子はランダム抗原配置分子よりも感染防御能が高いこと、それは T 細胞依存性抗原が T 細胞非依存性抗原へ変換されるためであることも突き止めた。この根幹は“抗原が整列化し、原虫表層に似る”であると考えている。

偽原虫には、一分子ナノ粒子である分岐状多糖（官能基化 NPG、F-NPG）を用いる。この分岐鎖末端に抗原を搭載すると

- 球体表面に抗原が高密度に配置
- 分岐鎖の流動性により、抗原が揺らぐ
- 原虫表層抗原の動的状態を模倣（偽原虫）になると予測している。

これらの予測を検証するためにも、本研究において、寄生虫のワクチン開発に貢献するプラットフォームとして、偽原虫技術の確立、三日熱マラリア伝搬阻止機能、ネズミマラリア感染防御機能を評価系とした偽原虫のワクチン機能の検証、それらの結果を踏まえた偽原虫の高度化に向けた更なる分子改変を実施する。

2. 研究の目的

寄生虫、特にマラリア原虫に対するワクチン開発に寄与する新しい技術を構築することが目的である。具体的には、これまで検証してきたワクチン抗原の高分子量化と反復整列化による抗原の免疫原性を向上させる技術基盤をより発展させるため、本研究課題では、擬似的な原虫表層の連続体「偽原虫」を作り、優れたワクチン分子の構築技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究で着目したのは、一分子でナノ粒子を形成する機能性分岐状多糖（glycogen、NPG）である。近年では様々なナノ粒子に免疫応答を増強する機能が見いだされ、その詳細な免疫学的理解も進んだことからナノ粒子をキャリアとするワクチン開発が注目されている（Smith et. al., Nat. Rev. Immunol., 2013）。特に poly(lactide-co-glycolide), PLGA や poly-glutamic acid, PGA を用いた先行研究が進んでおり、ウイルス抗原での応用は多いが、寄生虫抗原での報告は数が少ない。

これらのナノ粒子型ワクチンは病原体表

層を模倣できることから、理想的な戦略であることは間違いない。代表者らが目指す「偽原虫」技術は、方向性は同じであるが、ナノ粒子の素材および性状的に決定的な違いがある。代表者らが世界に先駆けて開発した「官能基化 glycogen (F-glycogen)」は「一分子で粒子」という最大の特徴がある (Kadokawa et. al., 2013)。PLGA、PGA 等から粒子を得るには、人工的な成分を導入して集合体にする為、粒子形成能および生体内での動態を評価する必要があるのに対し、F-glycogen にはその必要がなくなる。さらに食品由来、安価、低免疫原性、無毒性、生分解性、易消化性、高水溶性、有機溶媒非依存性、とワクチンのキャリアとして重要かつ基本的な要素をすべて兼ね備えている。

このようにワクチンキャリアとして優れた性質を保有する NPG を利用し、ワクチン抗原を高密度に整列させることで、原虫の表層を模倣した擬似的な物質「偽原虫」を作り、抗原の免疫原性を格段に向上させた優れたワクチン分子とする戦略とした。

具体的な手法としては、代表者らが開発した高機能性の「官能基化 NPG (F-NPG)」は分岐構造の距離、大きさ、末端基数、末端基の種類、流動性を細かく調整でき、この F-NPG 末端にワクチン抗原を共有結合によって搭載させることで高密度かつ流動性もある多重抗原整列配置が可能となると期待した。これらを具体的に進めるために「一分子ナノ粒子 (F-glycogen) を用いた偽原虫の構築」を以下の4段階で確立する。

- (1) マラリア原虫抗原搭載 F-NPG (偽原虫) 構築法の確立
- (2) 偽原虫の生化学的および性状学的解析 (偽原虫のサイズ、抗原配置割合等)
- (3) 偽原虫を用いた動物実験とその感染防御機能
- (4) 偽原虫の高度化を目指した分子設計 (F-NPG の改良および高度化偽原虫) と構築

および動物実験とその感染防御機能

4. 研究成果

新規技術として一分子ナノ粒子であるグリコーゲン (NPG) を足場にした抗原の高分子量化とその生産技術の基盤構築に成功した。具体的には DNA 結合タンパク質 (DBP) にマラリアワクチン抗原を融合させ、DNA 結合能を利用し、DNA 上に抗原を配置する。さらに DBP-マラリアワクチン抗原/DNA の二種複合体 (DBP-Vaccine/DNA) が分子全体としてマイナスの電荷を有することから、プラスの電荷を導入した NPG と静電相互作用を利用した三種複合体の創成に至った。この三種複合体は抗原単独や、DNA が効率よく DNA に結合することが分かった。さらに動物実験の結果、抗原単独や DBP-Vaccine/DNA 二種複合体よりも有意に高い抗体応答を示すことが分かり、本技術の有用性を示すことができた。

今後は、実際の三日熱マラリア患者の血液を用いたワクチン効果の検証や三日熱マラリア原虫を実際に認識できるかの抗体の質的な解析を進める必要がある。また、ヒト感染症以外、特に家畜用ワクチン開発の応用についても視野に入れて研究を進めている。

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 5件)

Harakuni T, Andoh K, Sakamoto R, Tamaki Y, Miyata T, Uefuji H, Yamazaki K, Arakawa T. Fiber knob domain lacking the shaft sequence but fused to a coiled coil is a candidate subunit vaccine against egg-drop syndrome. (2016) *Vaccine* 34(27):3184-90. doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.005. 査読有 Galay RL, Miyata T, Umemiya-Shirafuji R,

Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T. Host Immunization with Recombinant Proteins to Screen Antigens for Tick Control. (2016) *Methods Mol Biol.*,1404:261-73. doi: 10.1007/978-1-4939-3389-1_18. 査読有

Yukihiro Tamaki, Tetsuya Harakuni, Rui Yamaguchi, Takeshi Miyata, Takeshi Arakawa. Cholera toxin B subunit pentamer reassembled from *Escherichia coli* inclusion bodies for use in vaccination (2016) *Vaccine*,34(10) 1268-1274 査読有

Kusakisako K, Masatani T, Miyata T, Galay RL, Maeda H, Talactac MR, Tsuji N, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T Functional analysis of recombinant 2-Cys peroxiredoxin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* *Insect Mol.Biol.* (2016) 25(1) 16-23, doi: 10.1111/imb.12193. 査読有

Maeda H, Miyata T, Kusakisako K, Galay RL, Talactac MR, Umemiya-Shirafuji R, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T.A novel C-type lectin with triple carbohydrate recognition domains has critical roles for the hard tick *Haemaphysalis longicornis* against Gram-negative bacteria. (2016) *Dev Comp Immunol.*, 57:38-47. doi: 10.1016/j.dci.2015.12.015. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

宮田健「会合体を用いた新規ワクチンプラットフォームの創製」第 27 回繊維学会西部支部セミナー 2017 年 02 月 02 日(鹿児島大学、鹿児島)招待講演

〔その他〕

ホームページ等

<http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri0033/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮田 健 (Takeshi Miyata)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：20448591

(2)研究分担者

門川 淳一 (Junichi Kadokawa)

鹿児島大学・理工学域工学系・教授

研究者番号：30241722