様式Ｃ－１９

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２９日現在

機関番号：17701
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2010 ～ 2011
課題番号：22790435
研究課題名（和文）プリオン抗原をディスプレイするファージワクチンによる自己抗体の誘導と免疫制御
研究課題名（英文）M13 bacteriophage-based vaccine design for prion.

研究代表者　橋口　周平（HASHIGUCHI SHUHEI）
鹿児島大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：40295275

研究成果の概要（和文）：βシート構造にリフォールディングされたヒト組み換えプリオン蛋白だけに反応し、正常な構造のプリオン蛋白には結合しない PRB7 IgG 抗体を作製し、128-132 の領域に弱い相同性のあるミモトープペプチドを単離した。バクテリオファージは私どもの生活環境に常在する､細菌に感染するウィルスであるが､アジュバントを用いることなく強い IgG 抗体応答を誘導できることから、プリオン抗体のミモトープを提示したファージは治療抗体を誘導できるワクチンに応用できると考えられる。バクテリオファージは、安価に短期間で大量調整が可能であり、安全なワクチン担体として利用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Phage display library is powerful tool to develop various recombinant peptides or human antibodies applicable for revolutionary therapeutics. In addition to this feature, peptide-displaying phage clones induce mimotope-specific antibody responses in mice. In this study, we have established a human IgG1 antibody specific to ß-form prion protein (PrP) but not to α-form PrP, PRB7 IgG. Employing a peptide-displaying phage library, the mimotope was determined to be at #128-132 of human PrP. A single injection of peptide-displaying phage stimulate innate immune response and elicited a strong IgG response in mice, suggests a possible application of peptide-displaying phage clones as vaccine carriers for induction of therapeutic antibodies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	1,400,000	420,000	1,820,000
２０１１年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総　計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・ウィルス学
キーワード：バクテリオファージ、ワクチン、自然免疫、プリオン、抗体、ファージディスプレイ

１．研究開始当初の背景

(1) バクテリオファージは、細菌に感染するウィルスであり、私共の生活環境に常在している。繊維状ファージについては、FDA の認可を受けてヒトへ投与した例があり、ペプチドを提示した繊維状ファージのヒトへの投与は安全であることがすでに報告されている。

(2) プリオン病の早期診断をはじめ、感染予防、発病遅延、治療法の開発においては、未だに有効な手段が確立されていない。プリオン病は、プリオン蛋白の立体構造異性体と考えられるプリオンが、生体内の正常なプリオン蛋白の構造変化を引き起こすことで感染、発症する。プリオンはβシート構造を持つとされているが、生理的条件下で解析した直接的証拠が未だ得られていない。

(3) 正常なプリオン蛋白に対する抗体は、*in vivo* および *in vitro* において、プリオン病の予防、治療に効果があることが報告されており、ワクチンや抗体療法の可能性が示唆されている。

(4) プリオンを対象としたこれまでの研究では、組み換え型ヒトプリオン蛋白を用いて作製したβシート構造のプリオン蛋白を作製し、ヒト抗体を提示したファージディスプレイライブラリを用いたスクリーニングから、プリオン蛋白のβシート構造に特異的に結合し、正常な構造のプリオン蛋白には結合しないヒト単鎖抗体を単離している。

(5) 私どもはこれまでの研究で、M13 バクテリオファージをマウスの皮下もしくは腹腔内にアジュバントなしで投与すると、バクテリオファージは強い IgG 抗体応答を誘導できること、ファージ表面に提示させたペプチドに対しても抗体応答を誘導できることを明らかにしている。バクテリオファージが自然免疫を活性化するメカニズムについては未解明のままである。

(6) バクテリオファージを、それ自身が強い免疫応答を誘導できるので、この抗体の構造エピトープを提示したファージは、自己反応性の T 細胞を活性化せずに、プリオン蛋白オリゴマー特異的抗体を誘導できるワクチンとして利用できると考えられる。

２．研究の目的

本研究では、プリオン病の原因となるプリオンを特異的に認識し、プリオン感染を阻止できるファージワクチンの開発を目的として、1) ファージディスプレイ技術を用いたペプチド抗原の分子設計、2) M13 バクテリオファージが引き起す免疫応答のメカニズムの解明を試みた。

３．研究の方法

(1) 以前の研究で単離したプリオン蛋白のβシート構造を特異的に認識する単鎖抗体 (PRB7) は、大腸菌での発現、精製が困難であるため、ヒト IgG 型への抗体エンジニアリングを行った。ヒト IgG1, IgG2 および IgG3 の定常領域遺伝子とヒトイムノグロブリンκ鎖の定常領域遺伝子を組み込んだカセットベクターに、PRB7 単鎖抗体の可変部領域遺伝子をクローニングし、高等動物細胞で発現させるための発現ベクターを構築し、293F 細胞に導入し、培養上清から PRB7 IgG 抗体を精製した。

(2) 調整した PRB7 IgG 抗体を用いて、プリオン持続感染細胞株である ScN2a 細胞を用いて、プリオンとの反応性を解析した。実験は、ScN2a 細胞を抗体存在下で 3 日間培養し、細胞を固定化後、蛍光（Alexa Fluor 488）標識されたヒト IgG に対する 2 次抗体を反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(3) ペプチドファージディスプレイライブラリを用いて、PRB7 IgG 抗体の抗原結合部位に結合するミモトープペプチドの分子設計を行った。

(4) M13 ファージをマウスの皮下もしくは腹腔内に投与し、抗原特異的抗体応答を解析した。本実験では、TLR 関連分子（TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 もしくは MyD88）を欠損したマウス（C57BL/6）を用いた。ファージは精製後に TritonX-114 用いた抽出を行い、エンドトキシンを除去したバクテリオファージ (<0.2 EU) を調整し免疫に用いた。さらに、M13 ファージの *in vivo* 動態を解析するため、蛍光（XenoLight CF750）標識されたファージを作製し、ヌードマウスに腹腔内投与し、*in vivo* イメージング装置を用いて経過をリアルタイムで観察した。また、アンピシリン耐性遺伝子を持つ M13 ファージを腹腔内投与後、糞および尿を回収し、大腸菌（ER2738: テトラサイクリン耐性）と共培養しファージの感染価を測定した。

４．研究成果

(1) PRB7 IgG 抗体は、PRB7 単鎖抗体と同様に、組み換え型ヒトプリオン蛋白を用いて作製したβシート構造のヒトプリオン蛋白を特異的に認識した。ヘリカルな構造のプリオン蛋白、アミロイドβペプチドの構造異性体（モノマー、オリゴマー、アミロイド線維）は認識しない。また、ウシ、ヒツジ、マウスの組み換え蛋白を用いて作製したβシート構造のプリオン蛋白への結合活性が認められたことから、PRB7 IgG 抗体は、これらの異種プリオン蛋白間で共通して存在するβシート構造を認識していることが示唆された。

(2) 作製した PRB7 IgG 抗体を用いて、プリオン持続感染細胞である ScN2a 細胞との反応

性を解析したところ、蓄積の程度は異なるが30%の細胞集団においてβ構造のプリオン蛋白の蓄積が認められ、アポトーシスにより死滅した細胞においては PRB7 抗体による強い染色が認められた。一方、PK 耐性のプリオンの蓄積阻害には効果がないことが判明し、細胞死を誘導するのはβ構造のプリオン蛋白であるが、正常なプリオン蛋白の構造変化を引き起こして増殖させるプリオンはβ構造のプリオン蛋白ではないことが示唆された。

(3) ペプチドファージライブラリを用いたエピトープ解析では、ヒトプリオン蛋白と弱い相同性を有するミモトープペプチド pepPRB7-14 が単離され、128-132 の領域のβ構造を認識していることが明らかとなった。

(4) M13 バクテリオファージが誘導する免疫応答について解析した結果、M13 バクテリオファージは、マウスにおいて既存のアジュバントなしの PBS 溶液を一回投与するだけで、長期にわたる IgG 抗体応答を誘導できることが明らかとなった。この抗体応答は、IL-1 受容体および Toll 様受容体のアダプター分子である MyD88 を欠損したマウスでは観察されないため、M13 バクテリオファージが引き起こす抗体応答には、MyD88 シグナリングに依存した自然免疫反応を介していることが示唆された。M13 ファージのリン酸緩衝液の投与による IgG 抗体応答は、TLR2,4,7,もしくは TLR9 ノックアウトマウスにおいても認められ、紫外線照射により不活化された M13 ファージの投与によっても一次応答の段階から IgG 抗体応答が誘導されることから、ファージがもつ繰返し構造が自然免疫のセンサー分子による認識に重要であることが示唆された。M13 ファージの *in vivo* 動態を解析した結果、腹腔内投与されたファージは投与部位から徐々に拡散し、20 分後には投与されたファージの一部が膀胱に蓄積され、腸管に浸潤している可能性が示唆された。糞尿中のファージ感染価を解析したところ、投与されたファージの一部は、生きたまま体外に排泄される可能性が示唆された。

ファージ免疫における自然免疫の関与の解析結果は、その免疫学的基盤を同定した最初の報告であり、ペプチド抗原を提示されたファージは、付加的アジュバントを必要としない、ワクチンとして利用できると考えられる。経口投与も可能であり、T 細胞免疫、B 細胞免疫に照準を合わせてワクチンの設計を行うことができる。私どもの検討も含め、複数の国際論文で、生きた M13 ファージを投与したマウスの実験では全く健康に影響を与えないことが知られている。さらに、FDA の認可を受けてヒトへ投与した例が一例あり、ペプチドを提示した繊維状ファージのヒトへの投与は安全であることが示唆されている。抗原分子を自由に着せかえて安価に調製できるファージはワクチン担体として有用であると考えられる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計３件）

① Toshiya Kubota, Yuta Hamazoe, Shuhei Hashiguchi, Daisuke Ishibashi, Kazuyuki Akasaka, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine, Suehiro Sakaguchi, Ryota Kuroki, Toshihiro Nakashima, Kazuhisa Sugimura. Direct evidence of generation and accumulation of β-sheet-rich prion protein in ScN2a cells de novo illuminated by human IgG1 antibody recognizing β-form but not α-form of prion protein, The Journal of biological chemistry, 査読有, 287 巻, 2012, 14023-14039,
DOI: 10.1074/jbc.M111.318352

② Kai Satomi, Shuhei Hashiguchi, Kazuhisa Sugimura, Desensitization vaccine strategy using M13 phage whose g8p displays a B cell IgG epitope of Cry j 1 as a major allergen of Japanese cedar pollen, Peptide Science 2011, 査読無, 2012, 269-270

③ Shuhei Hashiguchi, Yuya Yamaguchi, Osamu Takeuchi, Shizuo Akira, Kazuhisa Sugimura, Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling, Biochemical and biophysical research communications, 査読有, 402 巻, 2011, 19-22
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.09.094

〔学会発表〕（計９件）

① Shuhei Hashiguchi, Takuma Gotanda, Yuta Hamazoe, Tsuyoshi Tsurumaru, Kazuhisa Sugimura, Strong Innate Immunity to M13 Bacteriophage: Implication for Vaccine Development, 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, 2011 年 10 月 2-4 日, Seattle, USA

② Kazuhisa Sugimura, Shuhei Hashiguchi, TEppei Osako, Sotaro Kawabata, Risa Abe, Shiro Nakagawa, Amyloid beta-42-mimotope displaying M13 bacteriophage for vaccine vehicle of Alzheimer's disease. 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, 2011 年 10 月 2-4 日, Seattle, USA

③ Toshiya Kubota, Yuta Hamazoe, Shuhei

Hashiguchi, Daisuke Ishibashi, Noriyuki Nishida, Suehiro Sakaguchi, Kazuhisa Sugimura, Monoclonal human IgG1 specific to Prion, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都

④ Shuhei Hashiguchi, Takuma Gotanda, Hamazoe Yuta, Kazuhisa Sugimura, Strong innate immunity to M13 bacteriophage: Implication for vaccine development, 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2011 年 11 月 27-29 日, 千葉

⑤ Kazuhisa Sugimura, Shuhei Hashiguchi, Teppei Osako, Kawabata Sotaro, Risa Abe, M13 bacteriophage for vaccine vehicle of Alzheimer's disease, 1st Oxford International bacteriophage conference, Phage2011: Bacteriophage Application, 2011 年 9 月 19-21 日, Oxford, UK

⑥ Shuhei Hashiguchi, Yuya Yamaguchi, Haruna Tahara, Takashi Yamada, Satomi Kai, Risa Abe, Koichi Tanaka, Kazuhisa Sugimura, Immunological basis of M13 phage vaccines: an effective vaccine design tested in a mouse model of Alzheimer's disease, 5th International Peptide Symposium, 2010 年 12 月 4-9 日, 京都

⑦ 田原春菜, 橋口周平, 山口雄也, 竹内理, 審良静男、杉村和久, M13 バクテリオファージ免疫における TLR ファミリー分子の役割について, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸

⑧ Shuhei Hashiguchi, Yuya Yamaguchi, Osamu Takeuchi, Shizuo Akira, Kazuhisa Sugimura. Essential role of MyD88 in humoral response to M13 bacteriophage in mice and negative role of TLR9 in IgG1 response. 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22-27 日, 神戸

⑨ 橋口周平、山口雄也、竹内理, 審良静男、杉村和久, M13 バクテリオファージが誘導する IgG 抗体応答は MyD88 に依存する, 日本生化学会九州支部例会、2010 年 5 月 22-23 日, 鹿児島

〔図書〕(計 1 件)

① 橋口周平, 伊東祐二, 田中孝一, 松木園美穂, 村岡賢, 杉村和久, 生化学 : ファージディスプレイと Beyond antibody: ~抗体様分子による分子標的~, 社団法人 日本生化学会, 2010, 710-726

〔その他〕
ホームページ
http://www.be.kagoshima-u.ac.jp/~sugimura-lab/

６．研究組織
(1)研究代表者
橋口　周平 (HASHIGUCHI SHUHEI)
鹿児島大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：40295275