

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790404

研究課題名(和文) DNAの構造的規則性に基づいた抗原反復整列化とそのマラリアワクチン開発への応用

研究課題名(英文) DNA macromolecule as a vaccine antigen scaffold for organization of the antigens into repetitively ordered arrays

研究代表者

宮田 健 (Miyata, Takeshi)

鹿児島大学・農学部・助教

研究者番号：20448591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、新規の技術としてDNAを足場にした抗原の高分子量化と反復整列化の技術基盤の構築に成功した。具体的にはDNA結合タンパク質(DBP)およびDNAの構造的規則性を利用し、DBP-マラリアワクチン抗原/DNA複合体を構築した。この複合体には抗原が効率よくDNAに結合することが分かった。さらに動物実験の結果、抗原単独や抗原の化学融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 and DNA (DBP-Ag/DNA). In this system, DNA was used as scaffold material, not genetic information. Vaccine efficacy of the DBP-Ag/DNA complex was evaluated using an ookinete surface protein of Plasmodium vivax, Pvs25. The DBP-Ag/DNA complex immunized mice were conferred a high immune response compared to Pvs25 alone immunized group. This system may be a promising approach for development of subunit vaccines against malaria.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：ワクチン マラリア 伝搬阻止ワクチン 三日熱マラリア原虫 抗原の反復整列 アジュバント

1. 研究開始当初の背景

現代はワクチン開発の遺伝子工学期と称され(大谷、1992)、病原体の一部を組換えタンパク質を利用して構築するコンポーネントワクチンの開発が進んでいる。その例として、組換え酵母や昆虫細胞によるB型肝炎ワクチンやヒトパピローマウイルス(HPV)ワクチンなど、ウイルス様中空粒子(VLP)を用いたものがある。特に、マラリア原虫のような寄生虫に対しては、従来の不活化や弱毒化等の手法は応用が難しく、組換えタンパク質を基にしたコンポーネントワクチンの開発が必須である。この類のワクチンは、精製されたタンパク質を利用しているため、弱毒生ワクチンや不活化ワクチンに比べ副作用も少なく、安全性が高い反面、ワクチン抗原の単独投与では免疫が成立しないことがほとんどである。(上述した組換えワクチンがVLPであることは、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。)よって、寄生虫に対するワクチンを開発するには、自然免疫系を活性化するアジュバントや樹状細胞(DC)およびB細胞を含む抗原提示細胞を標的化するデリバリーシステムの開発等、総合的な免疫賦活システムが重要である。より具体的には

少なくとも以下の3つの戦略が重要であると考えている。(新川、宮田、アジュバントの新展開、2011)。

自然免疫活性化機構(PRRs: Pathogen-associated molecular patterns 認識機構)の活用

抗原提示細胞(DCやB細胞)への抗原運搬機能及びその抗原提示機能の活性化

抗原の高分子量化や反復整列化による抗体応答の増強

申請者はこれまで、の戦略として、抗原提示細胞へのデリバリー機能を基盤とする

独自のワクチンプラットフォーム「三部構成免疫賦活システム(Tricomponent Immunopotentiating System: TIPS)」を開発してきた(Miyata et. al., Infect. Immun., 2011; 米国特許取得)。このTIPSでは2種類のマラリア原虫の抗原[三日熱マラリア原虫伝搬阻止ワクチン候補抗原(Pvs25)、ネズミマラリア原虫抗原 Merozoite surface protein-1 (MSP1)]をモデル抗原とし、その機能を検証してきた。その結果、TIPSに抗原を搭載すると、抗原単独よりも有意に免疫応答を惹起できること、誘導した抗体がタイ国の三日熱マラリア感染患者の血液から媒介蚊への原虫の伝搬を完全に阻害できること、マウスを用いた動物実験でネズミマラリア原虫の致死感染を完全に防御できること、などが分かった(Miyata et. al., Infect. Immun., 2011)。

さらに、申請者はの戦略であるTIPSプラットフォームに、の要素を取り入れることで、より効果的に免疫応答を惹起することに一部成功した。そして、残されたの戦略についても着手し始めた。

タンパク質抗原は独立した可溶性サブユニット構造を取るものよりも、互いに架橋したり(可溶性凝集体の構築)、何らかの物理的な足場を基に高分子量化されることで、その免疫原性が格段に向上する(Rosenberg, AAPS, 2006)。そこで、申請者は、まずTIPSプラットフォームの検証の際も用いた2種類のマラリア原虫抗原(Pvs25、MSP1)をモデルとし、化学的融合法でセルフクロスリンクさせた高分子可溶性凝集体を作製し、その免疫原性について検証した。その結果、可溶性凝集体は、独立した低分子量の抗原よりも格段高い免疫原性を獲得することが分かった。これは、本来、T細胞依存性抗原(TD Ag)がT細胞非依存性抗原(TI Ag)へ変換されるためであると予想している。この変換によ

って、抗原に対するより早期で、より強い特異的免疫応答が惹起されることが、 の戦略の大きな利点である。よって、本研究において の戦略を基盤とした新しいプラットフォーム技術を確立し、将来的に、 の戦略と統合化を図ることで、より効果の高いシステムを確立することを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、寄生虫感染症の中でも特にマラリアに対するワクチン開発に寄与する新しい技術基盤を確立することである。具体的には、ワクチン抗原の高分子量化と反復整列化によって、抗原の免疫原性を向上させる技術基盤の確立を目的とする。背景の項目でも述べたが、申請者はこれまで、組換えタンパク質抗原を化学的にセルフクロスリンクさせた高分子量可溶性凝集体が単独の分子よりも格段高い免疫原性とマラリア原虫感染に対する感染防御機能を有することを確認している。そこで、本研究課題では、この免疫賦活機能を汎用性の高いシステムとして確立するため、ワクチン抗原の高分子量化と反復整列化をDNA分子の構造的規則性を利用して実現することを目指した。より具体的には、DNA分子に結合するDBP(DNA結合タンパク質)を活用し、DNA分子をワクチン抗原を反復整列化させるための物理的な足場(scaffold)として利用する(図1)。このDBPとワクチン抗原の融合タンパク質(図1内の拡大図)をDNA分子と結合させることで、ワクチン抗原がDNA分子に沿った形状で反復整列化され、高分子量複合体が形成される(図1)。

3. 研究の方法

「DNAの構造的規則性に基づいた抗原反復整列化」の技術の基盤を構築するために、以下の3段階を順次完了させることを計画した。

DNA二重らせん

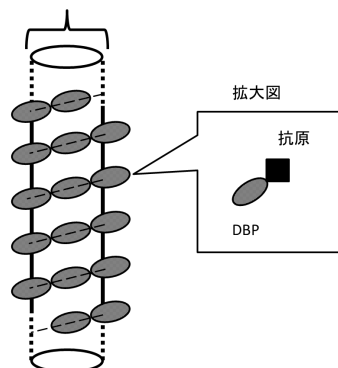


図1 DNAを活用した抗原の高分子量化および反復整列化の概念図

- (1). DBP-マラリア原虫抗原融合タンパク質(DBP-Ag)の大量発現系の確立(酵母 *Pichia pastoris*)
- (2). DNA/DBP-Ag 核酸・タンパク質複合体の生化学的および化学量論的解析(複合体サイズ、DNA結合機能解析等)
- (3). DNA/DBP-Ag 複合体を用いた動物実験(感染防御機能、免疫学的解析)

マラリア原虫抗原には、これまで申請者がモデル抗原として利用してきた、*P. pastoris* 発現 Pvs25(三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原)を用いて機能評価する。また、効率のよい研究体制として国内研究協力者(愛媛大学・教授、坪井敬文、琉球大学・准教授、新川武)および海外共同研究者(Mahidol 大学、Dr. Jetsumon Sattabongkot)との綿密な連携の下、遺伝子組換え実験、生化学的、免疫学的解析、マラリア感染実験等の各専門技術を統合し、研究を遂行した。

4. 研究成果

本研究では、我々は新規の抗原の高分子量化および抗原反復並列化技術(DBP-Ag/DNA)を開発した。DBP-Ag/DNA複合体はDNA(足場、Scaffold)に結合するタンパク質(DBP)にワクチン抗原を融合させたDBP-Agによって実現している(図1)。まず抗原(Ag)をDNAに結合させるためにDBPとの融合体(DBP-Ag)を構築した。これは酵母 *P. pastoris* において構

築し、Ag単独の発現、精製レベルと比較して、ほぼ同等の発現、精製レベルでDBP-Agを確保することに成功した。続いて、DBP-AgのDNAとの複合体形成能について検証した。DNAの移動度の変化を化学量論的に解析した結果、足場として用いるDNAの全領域に効率よくDBP-Agが結合していることが分かった。ワクチン抗原と足場の結合に関しては化学反応ではなく、DNAとDBPの相互作用を利用した複合体形成なので、生産性においても優れたものとなっている。実際に混合するだけで、迅速かつ高効率な複合体形成能を示すことが分かった。さらに、この複合体は、水溶性および安定性が改善されている傾向を示した。これはDNAの水溶性および安定性が分子全体の安定性などに寄与しているのかもしれない。

続いて、本研究ではワクチン抗原を搭載したDBP-Ag/DNAの機能評価のため、三日熱マラリア原虫に対する効果を検証した。その結果、マウスを用いた動物実験において、搭載した抗原特異的な免疫応答が抗原単独に比べて有意に高いことを確認した。つまり、DNAを足場にワクチン抗原を高分子量化および反復整列化させることで高い免疫応答が成立することが分かった。

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他の感染症への応用についても視野に入れて研究を進める。特筆すべき点は、本研究ではDNAを遺伝情報としてではなく、単に物質として活用し、新しい技術を構築したことである。

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5件)

1. Ibrahim HR, Hozono A, Fukami M, Shaban MA, Miyata T. Expression of ovotransferrin enhances tolerance of yeast cells toward oxidative stress.

(2013) J. Agric. Food Chem.

61:6358-65. (査読有)

DOI:10.1021/jf401152e

2. Miyata T, Tafuku S, Harakuni T, Tadano M, Yoshimoto N, Iijima M, Matsuo H, Matsuzaki G, Kuroda S, Arakawa T. A bio-nanocapsule containing envelope (E) protein domain III of Japanese encephalitis virus (JEV) protects mice against lethal JEV infection. (2013) Microbiology and Immunology 57:470-7. DOI:10.1111/1348-0421.12055 (査読有)
3. Okuno T, Kashige N, Satho T, Irie K, Hiramatsu Y, Sharmin T, Fukumitsu Y, Uyeda S, Yamada S, Harakuni T, Miyata T, Arakawa T, Imoto M, Toda A, Nakashima Y, Miake F. Expression and secretion of cholera toxin B subunit in lactobacilli. (2013) Biol. Pharm. Bull. 36:952-8. (査読有) DOI:10.1248/bpb.b12-01021
4. Miyata T, Oshiro S, Harakuni T, Taira T, Matsuzaki G, Arakawa T. Physicochemically stable cholera toxin B subunit pentamer created by peripheral molecular constraints imposed by de novo-introduced intersubunit disulfide crosslinks. (2012) Vaccine 30:4225-32. (査読有) DOI:10.1016/j.vaccine.2012.04.047
5. Satho T, Nagano Y, Eshita Y, Hisatomi Y, Sakata A, Miyata T, Kashige N, Miake F, Runtuwen RL, Fukushi S, Saijyo M, Kurane I, Morioka S, Mizutani T. Inhibitory effects of JNK on Aedes albopictus early larval development. (2012) Urban Pest Management 2:7-13. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Remil Linggatong, Takeshi Miyata, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroki Maeda, Kodai Kusakisako, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka. The potential of recombinant ferritins as anti-tick vaccine against *Haemaphysalis longicornis*. 第 83 回日本寄生虫学大会 2014 年 3 月 27-28 日 (愛媛大学、愛媛)
2. 原國哲也、山田清太郎、宮田健、山口類、玉城志博、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本、新川武「三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原 (Pvs25) の反復整列化とそのワクチン効果」第 83 回日本寄生虫学大会 2014 年 3 月 27-28 日 (愛媛大学、愛媛)
3. Masayuki Fukui, Masayuki Uemura, Takeshi Miyata, Tetsuya Harakuni, Takeshi Arakawa, Goro Matsuzaki. Induction of early protective immunity against pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice by combination of BCG priming vaccine and boosting mucosal vaccine with a recombinant mycobacterial antigen. 第 42 回日本免疫学会 2013 年 12 月 11-13 日 (幕張メッセ、千葉)
4. 宮田健、原國哲也、田福宣治、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、只野昌之、新川武「リガンド部分変更による三部構成免疫賦活システム (TIPS) の機能性向上の検討」第 16 回日本ワクチン学会学術集会 2012 年 11 月 17-18 日 (パシフィコ横浜、神奈川)
5. 玉城志博、宮田健、原國哲也、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「マラリアワクチン抗原搭載三部構成免疫賦活システム (TIPS) のマラリア伝搬阻止ワクチン機能解析」第 54 回日本熱帯医学会大会 2013 年 10 月 3-5 日 (長崎ブリックホール、長崎)
6. 原國哲也、宮田健、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「コレラトキシン B 鎖と三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン抗原 Pvs25 の融合体構築とそのワクチン機能解析」第 54 回日本熱帯医学会大会 2013 年 10 月 3-5 日 (長崎ブリックホール、長崎)
7. 山口類、新川武、宮田健、原國哲也、田福宣治、只野昌之「日本脳炎ウイルス抗原、コイルドコイル 5 量体、免疫グロブリン結合ドメインから構成される三部構成複合体のワクチン機能解析」第 54 回日本熱帯医学会大会 2013 年 10 月 3-5 日 (長崎ブリックホール、長崎)
8. 山田清太郎、宮田健、原國哲也、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「リガンドの換装による三部構成免疫賦活システム (TIPS) の三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン機能への影響」第 82 回日本寄生虫学会大会 2013 年 3 月 29-31 日発表 (東京医科歯科大学、東京)
9. 原國哲也、宮田健、山田清太郎、山口類、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「*Plasmodium yoelii* MSP1 の高分子量化による可溶性凝集体化とそのワクチン機能増強効果」第 82 回日本寄生虫学会大会 2013 年 3 月 29-31 日発表(東京

医科歯科大学、東京)

10. 原國哲也、宮田健、大城聡、平良東紀、
新川武「コレラトキシン B 鎖の構造安
定化に向けた分子改変」第 16 回日本ワ
クチン学会学術集会 2012 年 11 月 17-18
日 (パシフィコ横浜、神奈川)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称：薬物運搬体並びにこれを利用したアジ
ュバントおよびワクチン

発明者：新川武、宮田健、松崎吾朗、坪井敬
文

権利者：琉球大学

種類：米国特許

番号：第 8,580,274 号

取得年月日：2013 年 11 月 12 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

[http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri
0033/](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・農学部・助教

研究者番号：20448591