

学 位 論 文 要 旨

氏 名 原國 哲也

題 目 コレラトキシンB鎖蛋白質による新規感染防御ワクチンプラットフォームの構築
(Construction of a novel vaccine platform based on cholera toxin B subunit)

多くの病原体は腸管や呼吸器などの粘膜面を介して感染するにも関わらず、ほとんどの予防ワクチンは非粘膜投与型である。粘膜ワクチンは、粘膜局所だけではなく、全身性の免疫応答も誘導可能なことが知られており、近年、インフルエンザに対して粘膜投与型のワクチン接種が行われるなど、様々な粘膜ワクチンの開発が進行している。しかし、抗原単独による粘膜面を介した免疫法では、免疫原性が極めて低いことが問題である。粘膜ワクチンを目的とした組換えワクチンやアジュバント分子をデザインする場合、標的とする組織や細胞に特異的なリガンドをデリバリー分子として利用することは極めて重要である。これまでの粘膜ワクチン開発研究の中で最も広く利用されてきた分子のひとつにコレラ菌由来の腸管毒素コレラトキシン (CT) がある。有核細胞上のガングリオシドに結合する CT の B 鎖 (CTB) は、粘膜デリバリー分子として極めて重要な役割を果たすことが報告されている。この研究では、CTB の粘膜親和性に着目し、新規組換え粘膜ワクチンのプラットフォームの構築を目的とした。

まず初めに、粘膜ワクチンの可能性を模索するため、感染経路が粘膜と無関係な病原体に対する粘膜ワクチンの開発を行った。そのモデルとして蚊媒介性の日本脳炎ウイルス (JEV) を用い、各種ワクチネーション法を検討した。その結果、マウス脳由来不活性化 JE ワクチンの経鼻投与により、ウイルス中和能を有する JEV 特異的抗体が誘導された。そこで、CTB を利用して、JEV 外殻蛋白質の一部を融合したキメラ蛋白質を大腸菌で作製し、免疫実験を行ったところ、有効な抗体価の上昇が見られ、粘膜投与型 CTB 融合 JE ワクチンの可能性が示唆された。

次に、CTB 融合体の分子改変によって粘膜ワクチンの機能性向上の可能性を検討した。CTB は 5 量体を形成するため、高分子量の抗原と融合させると、分子間相互干渉により 5 量体形成が阻害され、粘膜親和性が損なわれる。そこで、抗原融合 CTB 遺伝子と非融合 CTB 遺伝子を同一細胞内で共発現させるヘテロ型 CTB キメラ分子を構築することを試みた。その結果、発現系として酵母 *Pichia pastoris* を用い、ヘテロ型 CTB を高発現させることに成功した。このヘテロ型 CTB の免疫実験の結果、融合抗原特異的な抗体産生を確認した。さらに、酵母発現 CTB の糖鎖修飾に着目し、糖鎖を介した部位特異的な外来抗原の融合法を検討した。その結果、糖鎖特異的な抗原の結合が確認され、融合分子を用いた免疫実験において融合抗原特異的な抗体産生を確認した。

これらの研究結果より、粘膜デリバリー分子 CTB を用いた新規融合技術によって、選択する発現系や抗原に左右されない汎用性の高い組換え粘膜ワクチンプラットフォーム構築の可能が示唆されたと考えている。

学 位 論 文 要 旨

| | |
|-----|---|
| 氏 名 | Tetsuya Harakuni |
| 題 目 | Construction of a novel vaccine platform based on cholera toxin B subunit (コレラトキシンB鎖蛋白質による新規感染防御ワクチンプラットフォームの構築) |

Immune responses mounted against the soluble recombinant antigens are often extremely low when the antigens are administered without the help of adjuvant, and therefore, a strategy to augment the immune response is necessary to develop effective component vaccines against infectious diseases. The B subunit of cholera toxin (CTB) is one of the most efficient antigen delivery molecules known to date. In this study, we exploited the CTB's antigen delivery function to develop a new vaccine platform. To this end, we first investigate the feasibility of developing recombinant subunit vaccines against Japanese encephalitis virus (JEV). The viral surface E protein was genetically coupled to the CTB and the recombinant protein was expressed in *Escherichia coli*. The expressed chimeric protein was found to be effective for the induction of virus neutralizing antibody when administered systemically and also somewhat effective when administered intranasally without any extraneous adjuvants. However, the expression levels of biologically active pentameric CTB fusion protein were dramatically reduced as the size of the fusion partner increases. This reduction in the expression level is presumably due to the steric hindrance generated by the fused antigen, and hence we developed a new conjugation strategy in which the fusion gene was simultaneously expressed within the same cell compartment with the unfused CTB gene. The integration of the unfused CTB, i.e., "molecular buffer", into the chimeric pentamer significantly reduced the steric hindrance, becoming able to tolerate the fusion of larger antigens, and it consequently increased the expression levels of biologically active pentameric form. This heteropentameric protein conjugated to the E protein was designed to be expressed in a multi-gene expression-competent yeast *Pichia pastoris* expression system, and the expressed protein was found to be efficacious to induce virus-specific immune response with virus neutralization capacity when administered subcutaneously or intranasally. Next, we exploited the oligosaccharide chains attached to the *P. pastoris* (PpCTBH)- but not to the *E. coli* (EcCTBH)-expressed CTB as an anchor scaffold for foreign antigen fusion. This unique N-linked oligosaccharide chains was located at the circumference of "donut-shaped" pentameric PpCTBH molecule, and hence is considered ideal for site-specific chemical coupling to foreign antigens for construction of fusion molecules with increased molecular uniformity as compared to the primary amine-based relatively random chemical coupling method. Foreign antigen (in this case chicken ovalbumin (OVA)) was site-specifically conjugated via chemical crosslinker to the N-linked oligosaccharide chains of the PpCTBH, and the resultant chimeric molecule was found to be biologically indistinguishable from bacterially produced EcCTBH pentamer in terms of its specific binding affinity for the receptor. Mucosal as well as systemic administration of the chimeric protein induced strong OVA specific antibody response in serum and mucosal secretions. Taken together, these results demonstrate that CTB, either expressed as homo- or pentameric fusion protein, or as a partner molecule chemically coupled to foreign antigens, is capable of inducing specific immune response when administered via the systemic as well as mucosal routes. We expect our results broaden the application field of recombinant CTB-based vaccination strategy for construction of recombinant component vaccines against infectious disease.

学位論文審査結果の要旨

| | |
|--|---|
| 学位申請者 氏名 | 原國 哲也 |
| 審査委員 | 主査 琉球大学 教授 屋 宏典 |
| | 副査 琉球大学 准教授 福田雅一 |
| | 副査 鹿児島大学教授 富永茂人 |
| | 副査 佐賀大学教授 渡邊啓一 |
| | 副査 琉球大学教授 松崎吾朗 |
| 審査協力者 | 琉球大学准教授 新川 武 |
| 題 目 | コレラトキシンB鎖蛋白質による新規感染防御ワクチンプラットフォームの構築 (Construction of a novel vaccine platform based on cholera toxin B subunit) |
| <p>多くの病原体は腸管や呼吸器などの粘膜面を介して感染するにもかかわらず、ほとんどの予防ワクチンは注射接種型である。粘膜ワクチンは、粘膜局所だけではなく、全身性の免疫応答も誘導可能なことが知られており、近年、インフルエンザに対して粘膜投与型のワクチン接種が行われるなど、様々な粘膜ワクチンの開発が進行している。しかし、抗原単独による粘膜面を介した免疫法では、免疫原性が極めて低いことがワクチン開発の障害であった。この問題を解決するため、粘膜ワクチン開発を目的とした組換えワクチンやアジュバント分子のデザインにおいては、標的とする組織や細胞に特異的なリガンドをデリバリー分子として利用してきた。これまでの粘膜ワクチン開発研究の中で最も広く利用されてきた分子のひとつにコレラ菌由来の腸管毒素、コレラトキシン (CT) がある。有核細胞上のGM1ガングリオシドに結合するCTのB鎖 (CTB) は、粘膜デリバリー分子として極めて重要な役割を果たすことが報告されている。本研究では、CTBの粘膜親和性に着目し、新規組換え粘膜ワクチンのプラットフォームの構築を目的とした。得られた研究成果の概要は以下のとおりである。</p> | |

まず初めに、粘膜ワクチンの可能性を模索するため、感染経路が粘膜と無関係な病原体に対する粘膜ワクチンの開発を行った。そのモデルとして蚊媒介性の日本脳炎ウイルス (JEV) を用い、各種接種法を検討した。その結果、マウス脳由来不活性化 JE ワクチンの経鼻投与により、ウイルス中和能を有する JEV 特異的抗体が誘導された。この実験結果に基づいて、CTB と JEV 外殻蛋白質の一部を融合したキメラ蛋白質を大腸菌で作製し、免疫実験を行ったところ、有効な抗体価の上昇が見られ、粘膜投与型 CTB 融合 JE ワクチンの有効性が示唆された。

次に、CTB 融合体の分子改変によって粘膜ワクチンの機能性向上の可能性を検討した。CTB は 5 量体を形成するため、高分子量の抗原と融合させると、分子間相互干渉により 5 量体形成が阻害され、粘膜親和性が損なわれることが知られている。そこで、抗原融合 CTB 遺伝子と非融合 CTB 遺伝子を同一細胞内で共発現させるヘテロ型 CTB キメラ分子を構築することを試みた。その結果、発現系として酵母 *Pichia pastoris* を用い、ヘテロ型 CTB を高発現させることに成功した。次いで、このヘテロ型 CTB を用いた免疫実験において融合抗原特異的な抗体産生を確認した。さらに、酵母発現 CTB の糖鎖修飾に着目し、糖鎖を介した部位特異的な外来抗原の融合法を検討した。その結果、糖鎖特異的に抗原を結合させることが可能となり、融合分子を用いた免疫実験において融合抗原特異的抗体産生を確認した。

これらの研究結果より、粘膜デリバリー分子 CTB を用いた新規融合技術によって、選択する発現系や抗原に左右されない汎用性の高い組換え粘膜ワクチンプラットフォーム構築の可能性が示唆されたと考えている。

以上の結果は、粘膜ワクチン開発のための優れた基礎知見を提供するものであり、感染症制圧に大きく貢献することが期待される。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨

| | |
|-------------|------------------|
| 学位申請者 氏名 | 原國 哲也 |
| 審査委員 | 主査 琉球大学 教授 屋 宏典 |
| | 副査 琉球大学 准教授 福田雅一 |
| | 副査 鹿児島大学教授 富永茂人 |
| | 副査 佐賀大学教授 渡邊啓一 |
| | 副査 琉球大学教授 松崎吾朗 |
| 審査協力者 | 琉球大学准教授 新川武 |
| 実施年月日 | 平成21年1月19日 |

試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)

 口答・筆答

主査、副査及び審査協力者は、平成21年1月19日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。

以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。

学位申請者
氏名

原國 哲也

[質問 1] 遺伝子工学的融合と化学的融合による各々の利点、欠点について説明してください。

[回答 1] 両者に対する免疫応答の差異については検討していないのでわからないが、融合タンパク質をつくる点においては遺伝子工学的融合が簡便ではある。化学的な結合ではCTBをベースにして、抗原を用意するだけで多種の抗原の作製が可能であり、これが利点と考えられる。

[質問 2] ということは具体的に同一タンパク質で両方の方法の効果を検討したわけではなく、実際にやってみないと効果については解らないということですか？

[回答 2] 実際の効果についてはそういうことになります。

[質問 3] CTBに化学的に結合させる分子の大きさについて制限はあるのか？

[回答 3] サイズについては、理論上はいくらでも大きなものでも可能かと考えられる。

[質問 4] OVAとCTBの結合数は？

[回答 4] CTB一分子に一個のOVAが結合しており、ペンタマーでは五個と見積もられる。

[質問 5] CTBのアミノ基に抗原を結合させた場合、結合する分子が多い方が免疫効果が高いのか？

[回答 5] CTBとGM1の結合を妨げない範囲内においては数が多い方が有利と考えられる。

[質問 6] CTBのアミノ基の修飾の場合、CTB一分子に数分子のOVAが結合しているのか？

[回答 6] 一分子以上結合していることは確認しているが詳細についてはまだ検討していない。

[質問 7] 粘膜投与を目指しているが、かならずしも全ての場合について成功しているわけではない。原因はなにか？成功させる鍵は何か？

[回答 7] 粘膜投与での免疫誘導は注射型にくらべて元来難しい。今後の打開策としては、CTB分子以外の粘膜結合タンパク質を使いことも一つの選択肢として視野にいれている。

[質問 8] ヘテロ型で1-4タイプ以外のモノは作れなかったのか？2-3タイプとかは検出されなかったのか？

[回答 8] 今回、それ以外は取れてきていないと考えている。

[質問 9] ガングリオシドGM1との結合する活性を失わないようにして抗原を何らかの形で結合させれば、だいたい有効と考えていいのか？

[回答 9] 結合していないよりはさせた方が有効と考えている。

[質問 10] CTBについてはモノマーを用いてin vitroでの会合も可能なのか？

[回答 10] モノマーをまぜてペンタマーin vitroで作製することも可能である。

[質問 11] その場合も1対4のものができるのか？

[回答 11] 融合できていることは確認しているが、詳細な解析はやっておらず、比率については解らない。

[質問 12] 粘膜を刺激した際の抗体の中和活性にばらつきがあるのは単純に抗原性の問題と考えてよいのか？抗原性の高い部分を選んで今後どのように改善していこうと考えているのか？

[回答 12] JEについてはドメイン3を用いている。抗原性はあるとされているが弱いことが今回判明したので今後は別の領域について検討をしたいと考えている。

[質問 1 3] CTBは抗原を体内にとりこませるのには非常に有効であるが、CTホロトキシンに比べた場合依然として免疫誘導性は低い。この点を今後、どうやって改善していくのか？

[回答 1 3] 粘膜免疫の誘導にはやはりアジュバントは必要と考えている。CTホロトキシンはアジュバントとして強力である。CTBと融合することによりCTの量を減らす方向を模索している段階である。また、CTB以外の粘膜と結合できる分子を見つけることでその点をクリアしていきたい。また、CTAの毒性をなくして利用することを検討したい。

[質問 1 4] アジュバントとしてCTを使うときは融合CTBと同量でアジュバントとしての活性が出るのか？

[回答 1 4] CTを1/100の量にしても免疫応答は認められる。

[質問 1 5] CTBアジュバント活性のメカニズムは？取り込まれた抗原はどうなるのか？

[回答 1 5] エントサイトシスで取り込まれた後、抗原呈示されることでアジュバント活性が発現されると考えている。

[質問 1 6] ワクチンとして製品の状態を把握できる点で部位特異的修飾はベターである。Sequenは2つあるのに何故1つしか付かないのか？それは物作りの的にメリットとして考えるのかデメリットとして考えるのか？

[回答 1 6] Ans90はNKTPのPro90の影響で糖鎖が付かないと判断している。Asn90はGM1との結合部位の近くに位置しているからここに糖鎖が付加されればGM1との結合の妨げになる可能性があるので、この部位に糖鎖がつかなかったのは好都合と思っている。Ans4の利点として、外周についてAsn4の糖鎖が抗原とのスペーサーとなり、抗原融合に有利であると考えている。