

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Claudin binderを用いた感染症ワクチン開発に関する基礎的研究                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Author(s)    | 鈴木, 英彦                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Citation     | 大阪大学, 2016, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/56173">https://hdl.handle.net/11094/56173</a>                                                                                                                                                                                                                                      |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 鈴木 英彦 )

## 論文題名

Claudin binderを用いた感染症ワクチン開発に関する基礎的研究

## 論文内容の要旨

近年のデング熱やエボラ出血熱の事例からわかるように感染症は交通機関の発達に伴い世界規模で猛威を振るっている。そのため、感染症対策としてワクチンの必要性が再認識されている。現在汎用されている注射型ワクチンと異なり、‘飲む・吸う’といった粘膜ワクチンは全身のみならず粘膜免疫の誘導が可能であることから、感染症重篤化および初発感染予防に効果的である。しかしながら、効果的な生体防御機構の構築にはワクチン抗原を単に投与するだけでは十分な免疫誘導ができず、多くの免疫担当細胞が集積している粘膜関連リンパ組織へのワクチン抗原送達が必要になる。この点に関し、申請者は鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) にタイトジャンクション構成分子であるclaudin-4が高発現していることに着目している。これまでに、ワクチン抗原送達担体としてclaudin-4結合分子であるC-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE)とモデル抗原として卵白アルブミン (OVA)との融合タンパク質を経鼻投与することにより、抗原特異的な全身・粘膜免疫の誘導が可能であることを報告している。しかしながら、C-CPEは菌由来分子であるためその抗原性や安全性を評価することは実用化に向けて重要である。また、本システムを用いた感染症ワクチンとしての有効性も不明であった。そこで、これらに関し検証を行い興味深い知見が得られたため、博士論文としてまとめた。

まず、マウスにC-CPEを反復的に経鼻投与し、C-CPE特異的な免疫誘導を検証したところ、C-CPE特異的な抗体産生が認められた。また、C-CPEを経鼻投与した際の各臓器への障害性をバイオマーカー (AST、ALT、BUN) の観点から検証したところ、いずれも異常は認められなかった。すなわち、C-CPEは反復的に経鼻投与することでC-CPEに対する免疫誘導が認められるため、ワクチン抗原送達に影響を及ぼす可能性はあるものの、臓器への障害性を示さないワクチン抗原送達担体であることが示された。

次に、C-CPEをワクチン抗原送達担体として用いた肺炎球菌ワクチン開発に取り組んだ。肺炎球菌は90種類以上の血清型が存在するが、現在は注射型多価ワクチンが汎用されているため、ワクチンに含まれない血清型の肺炎球菌による肺炎の増加が問題となっている。Pneumococcal surface protein A (PspA) はすべての肺炎球菌に発現する共通抗原であり、肺炎球菌に対する交叉性も認められている理想的なワクチン抗原である。そこで、PspAとC-CPEとの融合タンパク質 (PspA-C-CPE) を作製し、肺炎球菌ワクチンとしての有効性評価を行った。まず、PspA-C-CPEの結合性を検証したところ、PspA-C-CPEはclaudin-4結合性を保持しており、抗原取り込みに特化したM細胞を含むNALT上皮細胞への結合性が認められた。また、PspA-C-CPEによる免疫誘導を検証したところ、PspA特異的な全身・呼吸器面で免疫誘導が認められた。さらに、PspA-C-CPEにより誘導されるPspA特異的免疫により肺炎球菌に対する生体防御活性を示した。以上のことから、C-CPEを用いたワクチン抗原送達システムにより肺炎球菌ワクチン開発が可能であることが示された。

次により理想的なワクチン抗原送達に向けて経鼻ワクチンと鼻腔物理的機能との関連性を検証した。鼻腔には繊毛や粘液といった物理的バリアが存在し、ほこりなどの外来因子の排除に働いている。経鼻投与したワクチンもこのような機能によりワクチン効果に影響を受けている可能性がある。Tubulin tyrosine ligase-like family, member 1 (Ttll1) 欠損マウスは繊毛運動異常に伴う鼻腔での粘液貯留が認められる。そこで、Ttll1欠損マウスにPspA-C-CPEを経鼻投与することで鼻腔物理的機能が経鼻ワクチンに与える影響を検証した。その結果、PspA-C-CPEを経鼻投与することによりPspA特異的血清IgGは正常に産生されていたのに対し、PspA特異的鼻腔IgAは誘導低下が認められた。また、鼻腔での粘膜免疫誘導の中核を担っているNALTの各種免疫細胞を解析したところ、抗体のクラススイッチや親和性成熟の場である胚中心B細胞や胚中心形成に重要なサブセットである濾胞ヘルパーT細胞の誘導低下が確認できた。さらに、NALT上皮細胞付近には粘液の貯留が認められており、PspA-C-CPEのNALT上皮細胞への結合の減弱も観察された。これらのことから、鼻腔物理的機能、特に粘液により投与したPspA-C-CPEのNALT上皮細胞への結合が阻害され、効

率的な抗原取り込みが行われず、胚中心での免疫誘導不全に伴う粘膜免疫の誘導低下が引き起こされていると考えられる。粘液が経鼻ワクチン効果に影響を及ぼすため、過剰な粘液貯留が認められる場合はあらかじめ粘液を除くことが理想的な効果の発揮につながるのではないかと考えられる。

また、C-CPEはclaudin-4に対し、抗体並みの親和性を有しているが、claudin-4結合性に優れるclaudin binderを用いることはワクチン投与量の低用量化につながり、製造コスト面でもquality of lifeの面でも有益であると考えられる。C-CPEのC末端16アミノ酸がclaudin-4への結合に重要なドメインであり、このうち309と313位のアミノ酸を同時にアラニンに置換したC-CPE変異体は従来のC-CPEに比べて10倍近く高いclaudin-4への親和性を有する。そこで、claudin-4結合性に優れるC-CPE変異体のワクチン抗原送達担体としての機能性評価を行った。OVAとC-CPE変異体の融合タンパク質（OVA-C-CPE変異体）は従来のOVA-C-CPEが示すclaudin-4結合性よりも有意に高く、C-CPE変異体を用いることにより高効率にワクチン抗原を送達できる可能性が示された。実際に、免疫誘導の観点から検証したところ、OVA量として5 µg投与した際にはNALTへの結合が飽和になってしまっているためか、有意な差は認められなかった。しかしながら、OVA量として1 µg投与した場合、OVA-C-CPEに比べてOVA-C-CPE変異体では有意に高い全身・粘膜免疫および細胞性・液性免疫の誘導が認められた。また、担癌モデルマウスを用い腫瘍増殖抑制効果を検証したところ、OVA-C-CPE変異体はOVA-C-CPEよりも優れた抗腫瘍効果を発揮した。これらのことから、claudin-4結合性に優れるC-CPE変異体をワクチン抗原送達担体として用いることにより従来のC-CPEよりも優れた免疫誘導が可能であり、ワクチン投与量の低用量化にもつながるのではないかと期待できる。

以上、本研究ではC-CPEをワクチン抗原送達担体として用いた感染症ワクチン開発に関する基礎的研究を行い、C-CPEは肝臓、腎臓への障害性を示さないワクチン抗原送達担体であり、肺炎球菌ワクチンとしても優れた効果を発揮することを見出した。さらに、鼻腔物理的機能、特に粘液がワクチン効果に影響を及ぼすため、粘液の過剰な貯留が認められる場合は粘液を除くことが重要であると考えられる。また、claudin-4結合性が高いC-CPE変異体はワクチン抗原送達担体として優れることを見出した。今後はこれらの知見を総合的に融合させ、さらに機能的に優れる粘膜ワクチン開発へと発展させていく。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 鈴木 英彦 ) |     |     |      |
|---------------|-----|-----|------|
|               | (職) | 氏 名 |      |
| 論文審査担当者       | 主 査 | 教授  | 八木清仁 |
|               | 副 査 | 教授  | 中川晋作 |
|               | 副 査 | 教授  | 藤尾 慈 |
|               |     |     |      |

## 論文審査の結果の要旨

新興・再興感染症の発生は人類にとって大きな脅威となっており、対策としてワクチン開発の必要性が叫ばれている。とりわけ全身免疫および粘膜免疫の誘導により感染症重篤化のみならず初発感染予防も可能である粘膜ワクチンが注目されている。しかし優れた粘膜ワクチン効果の発現に必要なアジュバントや粘膜関連リンパ組織 (Mucosa-associated lymphoid tissues: MALTs)へのワクチン送達技術の開発は立ち遅れているのが現状である。学位申請者の鈴木はMALTs上皮細胞上で発現している claudin-4を標的として抗原をデリバリーすることを発案し、claudin-4細胞外領域を認識するウエルシュ菌エンテロトキシンのC末断片にあたるC-CPE (C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin) を活用して粘膜ワクチンを創製することを試みた。

まずC-CPEの安全性について評価を行った。C-CPEをマウスに経鼻投与しAST, ALT, BUNを測定したところ異常は認められなかったことから、C-CPEが腎臓や肝臓に影響を及ぼす可能性は少ないことを示した。

次に肺炎球菌ワクチン開発を想定し、すべての肺炎球菌に発現するコリン結合タンパク質PspAを抗原とした検討を行った。PspAとC-CPEの融合タンパク質 (PspA-C-CPE)を作製し、claudin-4結合性を評価した。その結果PspA-C-CPEはclaudin-4発現L細胞に対して特異的に結合性を示したことから、C-CPEによりPspAにclaudin-4指向性を付与できることが示された。PspA-C-CPEの免疫誘導機能をマウスに経鼻投与することにより評価したところPspA特異的な血清IgGの誘導、鼻腔および肺でPspA特異的IgAの産生誘導が可能であることが示された。さらに肺炎球菌に対する生体防御活性に関して肺炎球菌呼吸器感染モデルを用いて検証を行ったところ、Vehicle、PspA投与群に比べてPspA-C-CPE投与群は有意に高い肺炎球菌生体防御活性を示した。これらの結果よりC-CPEを用いた経鼻肺炎球菌ワクチンが有効であることが立証された。

C-CPEの機能を強化した変異体を用いてワクチン効果を検討したところ低用量で有効であることが明らかとなった。このC-CPE変異体を利用することにより担癌マウスにおける腫瘍増殖抑制効果も実証している。

最後にClaudin標的型経鼻ワクチンは粘液により粘膜上皮細胞への結合が阻害されることで粘膜免疫誘導が低下することを見出し、実用化に必要な鼻腔物理的機能の影響についても詳細な解析がなされた。

以上の結果より本論文は感染症ワクチン開発にむけて重要な知見が多く含まれ学位論文に相応しいと判断した。