



Title	Claudinを標的とした新規ワクチン療法の開発に関する基礎的研究
Author(s)	角谷, 秀樹
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57952">https://hdl.handle.net/11094/57952</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【1】

氏 名	角 谷 秀 樹
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学 位 記 番 号	第 23744 号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
	薬学研究科分子薬科学専攻
学 位 論 文 名	Claudinを標的とした新規ワクチン療法の開発に関する基礎的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 八木 清仁 (副査) 教授 山元 弘 教授 松田 敏夫 教授 中川 晋作

### 論文内容の要旨

1970年代後半より次々と新たな感染症(新興感染症)が発生し、依然として感染症は我々を震撼させており、世界で年間2000万人も人が感染症により命を落としている。感染症治療法は感染したウイルスに対する対症療法による対策が講じられているに過ぎず、感染そのものを防ぐことができるワクチンが注目を集めている。さらに、悪性腫瘍のみならず、アルツハイマー病やリウマチなどに対するワクチン療法の可能性が示唆されており、世界のワクチン市場は10年後には2兆円規模に成長すると試算されている。

現在広く用いられている注射型ワクチンでは、全身免疫は賦活化されるものの粘膜免疫の賦活化能には乏しく、多くの病原性微生物の侵入門戸となっている粘膜面における防御網構築能を持たないこと、投与が侵襲性であることなどの課題が指摘されている。一方、飲む、吸うといった経鼻、経口ワクチンでは全身面のみならず粘膜面での免疫賦活化能を併せ持ち、低侵襲性投与が可能であることから、理想的なワクチンとして期待されている。しかしながら、抗原を単に粘膜面に投与しただけでは免疫反応が惹起されず、効率良く粘膜免疫組織に抗原を送達させることができが粘膜ワクチン開発には必要不可欠であり、インフルエンザの経鼻ワクチンやボリオ生ワクチンなどが実用化されているに過ぎないのが現状である。

このような背景を踏まえ、世界に先駆けて少子高齢化が進行している我が国の健康確保、本邦のワクチン産業の育成に資するワクチン技術の開発を試み、粘膜組織に発現しているタイトジャンクション構成タンパク質claudin-4を標的とした新規ワクチン療法の開発に関する基礎的検討を行なった。

Claudin-4の細胞外領域を認識する分子としてウエルシュ菌が産生する*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) のC末端断片、C-CPEが知られている。そこで、claudin-4指向性分子のモデルとしてC-CPEを用いた。まず、タンパク質にC-CPEを付与することでclaudin-4発現細胞にタンパク質を送達することができるか否かを検証した。本検証にはモデルタンパク質としてジフェリアトキシンフラグメントA (DTA) を用いた。DTAはジフェリアトキシンの毒性本体であり、受容体結合、膜通過領域であるフラグ

メントBがなければ、細胞内移行しないため細胞毒性を示さない。従って、本検証には優れたモデルタンパク質である。DTA-C-CPE融合タンパク質はアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、作製したDTA-C-CPEの機能は、DTAの細胞傷害性を指標に、claudin発現L細胞を用いて解析した。その結果、DTA単独添加群では生細胞数に変化は認められなかったのに対して、DTA-C-CPE添加群では濃度依存的な生細胞数の減少が認められた。さらに、この作用はDTA-C-CPEのC-CPE部位とclaudin-4との結合を介していることを示唆した。また、DTA-C-CPEはclaudin-1, -2, および-5発現細胞には細胞障害性を示さなかったことから、DTA-C-CPEはC-CPEの有するclaudin-4特異性を保持していた。これらの結果は、C-CPEがclaudin-4 ligandとして機能することを示すものである。

Claudin-4を標的とした粘膜ワクチン開発の可能性を検証するために、モデル抗原、卵白アルブミン (OVA) とC-CPEとの融合タンパク質 (OVA-C-CPE) を作製した。作製したOVA-C-CPEをマウスに経鼻投与し、免疫賦活化作用を解析した。すなわち、6週齢の雌性BALB/cマウスに週1回、計3回経鼻投与し、最終投与より1週間後に血清、鼻腔洗浄液、陰洗浄液、および糞便抽出液を調製し、各種サンプル中のOVA特異的な抗体価をELISA法により解析した。その結果、血清中のIgG抗体価の上昇はOVA単独投与群およびOVAとC-CPEとの混合投与群とでは認められないのに対して、OVA-C-CPE投与群で有意な上昇が認められた。さらに、投与粘膜面である鼻粘膜中のIgA抗体価も血清中IgG抗体価と同様にOVA-C-CPE投与群でのみ有意な上昇が認められた。また、遠隔粘膜面である膣粘膜および糞便中のIgA抗体価もOVA-C-CPE投与群でのみ有意な抗体価の上昇が認められた。一方、claudin-4結合領域を欠損させたC-CPE<sub>303</sub>との融合タンパク質OVA-C-CPE<sub>303</sub>投与ではこれら抗体価の上昇は認められなかった。これらの結果は、claudin-4を介してOVA-C-CPEが免疫賦活化作用を示すことを示唆するものである。さらに、本claudin-4指向性ワクチンの免疫特性を解析したところ、Th1系サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) およびTh2系サイトカイン (IL-13)、さらにTh17系サイトカイン (IL-17) の産生を介してTh1系、Th2系およびTh17系免疫を賦活化することを示唆した。また、OVA-C-CPEのワクチン効果をOVA遺伝子をマウスTリンパ腫細胞株EL4 (H-2<sup>b</sup>) 細胞に導入したE.G7-OVA細胞を用いた担癌モデルマウスを用いて評価した。その結果、OVA-C-CPE投与群でのみ腫瘍増殖抑制効果を示し、予防的・治療的なワクチン効果を本ワクチンは有することを示唆した。

続いて、C-CPEよりも免疫賦活化作用に優れたclaudin-4指向性分子の取得を試みた。C-CPEのclaudin-4結合部位のアミノ酸をアラニンに置換した各種C-CPE変異体を用いて検討した結果、C-CPE<sub>S313A</sub>がC-CPEよりも免疫賦活化作用に優れていることを見出した。

以上の知見は、claudin-4を標的としたワクチン開発が可能であることを示唆するものであり、粘膜ワクチン開発においてこれまで問題となっていた、粘膜免疫組織への抗原送達に対する解決の糸口を示すものである。現在臨床応用されている粘膜ワクチンは弱毒化した生ワクチンであるため、発熱などの副反応やワクチン株の毒性復帰などの問題が挙げられている。当該技術を用いた安心、安全且つ有効な粘膜ワクチン開発およびワクチン療法への展開に期待する。

### 論文審査の結果の要旨

本研究はタイトジャンクションの構成タンパク質であるClaudinをターゲットとした粘膜ワクチンを開発すること目的として行われたものである。

著者はまずClaudin-4と結合性を有するC-CPEペプチドとジフテリア毒素Aの融合タンパクを合成しClaudin-4を発現する細胞に対して作用をさせたところ細胞毒性を示すことを確認した。Claudin-4発現細胞へタンパク移入が可能であることが証明されたため、次にC-CPEとモデル抗原のオボアルブミン（OVA）の融合タンパクを合成し、マウスに対してClaudin-4が発現している鼻腔内に投与した。その結果、OVA特異的血中IgG、鼻粘膜IgA等の上昇を認め、Claudin-4をターゲットとした粘膜免疫が可能であることを示した。さらに坦癌モデルマウスを用いても予防的、治療的効果があることを見出し、C-CPEを用いた粘膜ワクチンの有効性をマウスを用いたモデルで証明することに成功している。

以上の結果は感染症予防のため、その効果が期待されている粘膜ワクチンの開発に向けて重要な知見を提示しており、学位論文としてふさわしい内容を含んでいると判断した。