

Title	Protective effects of in vivo-expressed autotransporters against Bordetella pertussis infection
Author(s)	鈴木, 孝一郎
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87740
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	鈴木 孝一朗
論文題名 Title	Protective effects of <i>in vivo</i> -expressed autotransporters against <i>Bordetella pertussis</i> infection (宿主内で発現するオートトランスポーターの百日咳菌感染に対する防御効果)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>百日咳菌の上部気道感染によって起こる百日咳は、現行の精製百日せきワクチン(aP)効果の減弱した青年期の感染やワクチン成分と抗原性の異なる変異株の出現などにより患者数が増加しており、特に青年期患者はワクチン未接種の乳児に対するキャリアーとなりうる事が臨床現場で問題視されている。そのため、WHOは百日咳を再興感染症の一つとして位置付けている。百日咳再興への対応策の課題として、高いワクチン効果がありかつ現在の抗原変異株の影響を受けない新たな感染防御抗原をワクチン成分に組み込むことが挙げられる。これまでの百日咳菌の抗原探索は主に試験管培養した菌体の産生成分を対象に行われてきたが、新規抗原を探索する試みとして実験動物への感染過程で発現レベルの上昇する百日咳菌体成分を検索することは重要である。以前の研究で、百日咳菌の類縁種であり、げっ歯類を自然宿主とする気管支敗血症菌を利用して、感染宿主の気道で菌体の高発現遺伝子を同定する手法としてIVET-IP (<i>in vivo</i> expressed-tag immunoprecipitation) 法が開発された(<i>Microbiol Immunol</i> 59: 249–61, 2015)。我々は、当該手法で同定できた高発現因子はワクチン抗原の有効な候補になりうると思った。そこで本研究では、感染宿主で高発現する気管支敗血症菌遺伝子173種類のうち、百日咳菌と共通遺伝子かつ外膜・分泌分子を選定し、5つのオートトランスポーター(SphB1, BatB, SphB2, Phg, Vag8)をワクチン抗原候補として、マウス肺内チャレンジモデルにてワクチン有効性評価を実施した。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>5つのオートトランスポーター(SphB1, BatB, SphB2, Phg, Vag8)において、菌体外に発現・分泌されるパッセンジャー領域における組換えタンパク質の作出を行った。5種タンパク質を混合調製したカクテル抗原SBSPV(SphB1, BatB, SphB2, Phg, Vag8)を用いてマウスへ免疫を行い、取得したSBSPV抗血清が5つのオートトランスポーターを認識することをイムノブロットング法で確認した。また免疫染色にてSBSPV抗血清は百日咳菌体表面を認識することが確認された。これらの結果より、SBSPVに対する抗体上昇が確認され、またSBSPVの少なくとも1種類が菌体外に存在することが示された。</p> <p>SBSPVの防御効果をマウス経鼻チャレンジモデルにて確認した。SBSPVを3週間隔で2回免疫を行い、最終免疫の1週間後に採血後、百日咳菌18-323株をマウス経鼻より接種し、2時間後、4日後、8日後のマウス肺ならびに気道における百日咳菌の定着数を解析した。結果、4日後、8日後では非免疫群と比較し、SBSPV免疫群では肺・気道における百日咳菌定着菌数が約1/100に減少した。またSBSPV抗血清を利用して、5つのオートトランスポーターに対するIgG抗体上昇をELISA法により確認した。これらの結果より、SBSPVにワクチン抗原候補が含まれることが示唆された。</p> <p>SBSPVよりワクチン抗原候補を選定すべく、百日咳菌を感染させたマウスの42日後の回復期血清を利用して5つのオートトランスポーターに対する抗体の有無を確認したところ、SphB1とVag8に対しての反応が検出された。これらの結果より、SphB1とVag8について更なるワクチン候補の検証を実施した。</p> <p>SphB1とVag8の防御効果を検証するために、SphB1, Vag8, SphB1・Vag8混合カクテル(SV)を3週間隔で2回免疫を行い、最終免疫の1週間後に、百日咳菌18-323株をマウス経鼻より接種し、8日後のマウス肺ならびに気道における百日咳菌の定着数を解析した。結果、非免疫群と比較し、肺・気道における百日咳菌定着菌数がSphB1, Vag8単独免疫群では約1/10, SV免疫群では1/100に減少した。また、aPとの相乗効果を検証するために、aP, aP+SphB1, aP+Vag8, aP+SV免疫による防御効果を確認した。結果、aP+SV免疫群において8日後の肺内定着菌数が非免疫群と比較し約1/100000, aP免疫群と比較し約1/10減少した。これらの結果によりSphB1とVag8における百日咳菌感染防御効果が確認され、またaP+SV免疫による相乗効果が確認された。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>我々は本研究で、百日咳菌感染宿主内で発現するオートトランスポーターSphB1とVag8における感染防御効果を確認した。このことは、感染宿主内で高発現する因子はワクチン抗原候補になりうることを示すものであると考える。また、現行ワクチンaPとSV同時免疫による相乗効果が確認されたことから、SphB1とVag8はaPに追加可能なワクチン抗原候補になりうるものと考えられる。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		鈴木 孝一朗	
論文審査担当者	(職)	氏名	
	主査	大阪大学教授	塩田 孝一
	副査	大阪大学教授	飯田 哲也
	副査	大阪大学教授	塩田 孝一

論文審査の結果の要旨

現行の精製百日せきワクチン(aP)の改良研究の一つとして、より防御効果の高い新規抗原探索をすべく、感染宿主の気道で菌体の高発現遺伝子を同定する手法である*in vivo* expressed-tag immunoprecipitation (IVET-IP) 法 (*Microbiol Immunol* 59: 249-61.2015)にて選定された5つのオートトランスポーター (SphB1, BatB, SphB2, Phg, Vag8) をワクチン抗原候補とし、評価を行った。マウス肺内チャレンジモデルにてワクチン有効性評価を実施した結果、SphB1とVag8における感染防御効果を確認した。また、現行ワクチンaPと2種混合カクテルSVの同時免疫による相乗効果が確認されたことから、SphB1とVag8はaPに追加可能なワクチン抗原候補になりうるものと考えられる。

本研究において、既存の研究では試験管培養した菌体から抗原探索をしていたものと比較し、感染宿主での高発現因子に着目することで、実際の感染状況を考慮したアプローチでの抗原探索、また候補抗原の防御効果評価を実施した点が、当該改良研究を押し進めるうえで大変重要であったと思われる。本研究成果では、百日咳ワクチン改良研究において新たな方法を提示できたため、博士 (医学) の学位授与に値すると思われる。