

Production of Antigen-displaying Nanoparticles by Cross-linking of Silkworm-produced Virus- like Particles and Antigens for the Development of Next Generation Vaccines

増田, 亮津

<https://hdl.handle.net/2324/4784682>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)

氏名	増田亮津			
論文名	Production of Antigen-displaying Nanoparticles by Cross-linking of Silkworm-produced Virus-like Particles and Antigens for the Development of Next Generation Vaccines (次世代型ワクチン開発に向けたカイコ生産ウイルス様粒子及び抗原タンパク質の架橋による抗原提示ナノ粒子の作製)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	日下部 宜宏
	副査	九州大学	教授	飯田 弘
	副査	九州大学	教授	伴野 豊

論文審査の結果の要旨

本論文は、組換えタンパク質ワクチンとして有用なウイルス様粒子 (VLP) の生産に適したカイコ-バキュロウイルス発現系を用いて次世代型の抗原提示ナノ粒子ワクチン生産の技術基盤の確立を目指したものである。獲得免疫を利用したワクチンは、治療薬の少ないウイルス感染症に対して、最も効率的な感染症対策である。現在、ワクチンの主流は病原ウイルスを弱毒化した生ワクチンや不活化ワクチンであるため、安全性への懸念がある。抗原タンパク質の一部を利用する組換えタンパク質は、より安全なワクチンである一方、その免疫原性が低いため、アジュバント存在下で複数回投与する機会が多い。その解決策の1つとして、ウイルスの外殻タンパク質のみが自己集合化してできる中空のウイルスナノ粒子である VLP が期待されている。高分子量とエピトープの反復によって高い免疫原性を持つが、VLP の発現生産自体が難しい抗原タンパク質も多い。そこで、本研究では、VLP の粒子表面上に抗原タンパク質をディスプレイする事で免疫原性を改善したより高性能な次世代型ワクチンの開発を目標とし、カイコ-バキュロウイルス発現系における VLP ワクチンの生産法確立と難生産性のコロナウイルススパイク (S) タンパク質の生産性改善、新規酵素修飾法による VLP 上への分子ディスプレイ、さらに自発的なイソペプチド形成を利用した VLP 上へのコロナウイルス S 抗原のディスプレイを行なった。

まず、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いた VLP ワクチン生産モデルとして、豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) のカプシドタンパク質の発現系を構築し、カイコ蛹から高純度の PCV2 VLP を効率よく精製する手法を確立した。精製したカプシドタンパク質は安定な VLP ナノ粒子を形成しており、これをワクチン抗原としてマウスに接種すると市販の PCV2 ワクチンと同等の中和抗体が誘導されることを明示した。

次に、難生産性の抗原タンパク質である豚流行性下痢ウイルス (PEDV) のスパイク (S) タンパク質をモデルとして、生産性改善を行なった。ウイルス粒子上の PEDV の S タンパク質はホモ三量体を形成していることから、鳥軟骨基質タンパク質 (CMP) の三量体化モチーフを C 末端に融合し、人工的に三量体形成を誘導したところ、その構造が安定化し、カイコ血清における分泌効率が飛躍的に増加した。また、この S タンパク質を用いて九州大学の近交系カイコ系統群の血清中の発現量を比較し、高い発現量を示す系統を複数見出し、高生産系統の雑種が安定的に S タンパク質の生産を可能にすることを示した。

さらに、VLP と別種ウイルス由来の抗原タンパク質を架橋する方法として、タンパク質間のリジン残基とグルタミン残基を架橋する酵素である微生物 (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼ (MTG) に着目した。PCV2 VLP の立体構造情報から、MTG の認識配列である Qtag を粒子表面に配置可能な領域を予測し、VLP 形成に影響を与えず、また生産性も低下しない領域を見出した。この Qtag 付きの PCV2 VLP を精製し、もう 1 つの認識配列である Ktag を融合した EGFP が、MTG によって架橋できることを確認し、分子修飾法による VLP 抗原ディスプレイ法を確立した。

最後に、MTG 法とは異なる抗原ディスプレイ法として、*Streptococcus pyogenes* 由来のタンパク質によるイソペプチド結合形成を利用した SpyTag/SpyCatcher system を用いて、部位特異的タンパク質間架橋を試みた。カイコで大量生産可能なノロウイルス VLP に SpyTag を融合し、VLP 形成を確認した後、ディスプレイ抗原として、SpyCatcher を融合した PEDV の S タンパク質を用いて、*in vitro* における特異的な架橋が起こることを明示した。S タンパク質が架橋されたノロウイルス VLP は粒子径と分子量の増加が見られたことから、VLP の表面に S タンパク質が提示された抗原提示ナノ粒子の生産系を確立した。

以上の結果より、カイコ-バキュロウイルス発現系を利用して、より安全なワクチンとして使用可能な VLP を生産し、その表面を特異的に修飾することに成功した。また、カイコで難生産のコロナウイルス抗原の生産改善と部位特異的架橋による VLP 上への提示にも成功したことから、これらの成果は、ワクチン生産コストの削減と免疫原性の向上を期待できる次世代型ワクチンの開発に寄与するものであると考えられる。

以上要するに、本論文は、カイコ-バキュロウイルス発現系が次世代型抗原提示ナノ粒子ワクチンの生産基盤として有用であり、本法で生産されたワクチンが非常に強い中和抗体誘導能を持つことを明らかにした。また、VLP 上への抗原ディスプレイ法として、MTG 法と SpyTag/SpyCatcher 法の 2 つが有効であることを実証したもので、昆虫ゲノム科学、特に次世代型ワクチンの生産基盤の構築と純国産ワクチンの実用化に寄与する優れた業績である。よって、本論文は博士 (農学) の学位に値すると認める。