

B-3	会合体形成またはアミノ酸1残基置換による デングウイルス由来エンベロープタンパク質第3ドメインの免疫原性への寄与					
	氏名	塩飽 祐佳里	主査	黒田	副査	川野・金・小関・平田

【背景】 近年急速な発展を遂げている組み換えタンパク質製剤は 2 つの局面で免疫原性に課題を抱えている。1 つが、製造から投与時に形成され得るタンパク質凝集体が予期せぬ免疫応答を示すことによる、製剤の有効性・安全性低下である。>100 nm の subvisible、visible 凝集体による過剰な免疫応答誘発が認知されスクリーニングが推奨されている一方、<100 nm の invisible 会合体に対する同様の評価は後れを取っている。さらに会合要因の差異で免疫原性に及ぼす影響が異なることを鑑み、本研究では種々の要因で形成した 3 型デングウイルス (Den3) 由来エンベロープタンパク質第 3 ドメイン (D3ED3) invisible 会合体の免疫原性への影響を評価した。2 つ目がタンパク質の低い免疫原性ゆえ、ワクチン開発が途上にあることである。現在までエンベロープタンパク質のアミノ酸置換による免疫原性増強や交差反応低減を目論む研究が進められている。本研究では D3ED3 及び D4ED3 (4 型 (Den4) 同タンパク質) のエピトープ内アミノ酸 1 残基置換による免疫原性の向上寄与を評価した。

【手法】 (1) invisible 会合体と免疫原性 野生型 D3wt を用い、会合要因の異なる 5 種の invisible 会合体: C5I (SCP (溶解性制御) タグの 1 つ、Ile 5 残基を C 末端に付加) / misfold/ Heat/ Stir/ FT (凍結融解) を作製した。その後、DLS (動的光散乱) 測定や CD (円偏光二色性) 測定などで粒子径、構造評価を行い、さらに免疫応答実験として ELISA 法によりマウス血清中の抗 D3ED3 IgG 量を評価した。

(2) アミノ酸置換と免疫原性 D3ED3、D4ED3 エピトープ領域内のうち、電荷と ASA (Accessible Surface Area) に着目し 305 及び 309 残基目のアミノ酸を両血清型間で置換した変異体 (D3K305D/ D3S309A/ D4D305K/ D4A309S) を作製した。その後(1)同様、抗 D3/ D4ED3 IgG 抗体量を評価した。

【結果と考察】 (1) invisible 会合体と免疫原性 C5I, misfold, Heat の二次構造は顕著に変性しており (Fig.1)、タグや非天然のフォールディング、Tm 付近の熱反応に起因するものと考えられる。免疫応答実験の結果、invisible 会合体は免疫原性を有した (Fig.2)。中でも C5I, misfold の抗体価が高く、高次構造変化が免疫応答に大きく関与すると考えられる。なお Heat では高次構造が完全変性し、抗原認識され難かったため抗体価が他と比較して低くなったと考える。

(2) アミノ酸置換と免疫原性 各変異体は会合形成せず、その高次構造は若干の部分変性を生じた。また免疫応答実験において Den3 では wt と比較し S309A の有意な抗体価向上が見られた (Fig.3)。Den4 では D305K で増強、A309S で減少 (Fig.4)を示した。以上により、電荷や ASA が免疫応答に関わる可能性が示唆された。

【結論】 <100 nm の invisible 会合体も予期せぬ免疫応答を誘発する可能性が高く、タンパク質製剤において会合体形成に影響する様々な要因を考慮するとともに、invisible 会合体のスクリーニングの必要性が示唆された。また免疫原性の低さを課題に持つワクチンにおいて、エピトープ内アミノ酸置換は免疫増強物質が不要かつタンパク質構造への影響が小さい有効な免疫原性増強手段となり得る。

(1)invisible 会合体と免疫原性

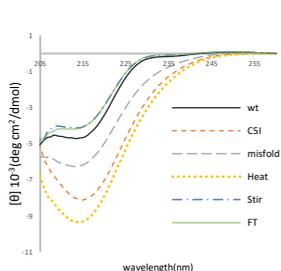


Fig.1 invisible 会合体の二次構造

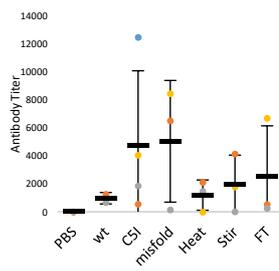


Fig.2 会合体の抗 D3ED3 IgG 量

(2)アミノ酸置換と免疫原性

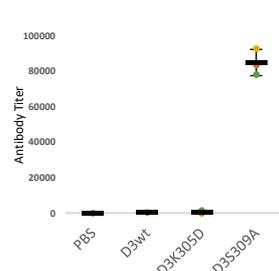


Fig.3 Den3 置換体の抗 D3ED3 IgG 量

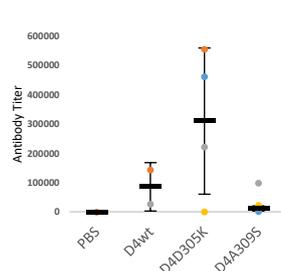


Fig.4 Den4 置換体の抗 D4ED3 IgG 量