

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	ボツリヌス毒素複合体の体内侵入機構の解明と経粘膜ワクチンデリバリーとしての応用
研究機関・部局・職名	大阪大学・微生物病研究所・特任教授
氏名	藤永 由佳子

【研究目的】

全体構想：

経口摂取されたボツリヌス毒素が消化管粘膜から体内に侵入する機構を明らかにして病態発症機構の解明を目指す基礎的研究、およびその粘膜吸収機構を利用してワクチン抗原を粘膜から体内の免疫誘導組織へ効率よく輸送する粘膜ワクチンのアジュバントの創製を目指す応用的研究を推進する。

ボツリヌス毒素の体内侵入機構について：

● 研究の背景

ボツリヌス神経毒素（約 150 kDa、A～G の血清型）は、そのプロテアーゼ活性により末梢神経細胞中で開口分泌に関わる分子群（SNAREs）を特異的に切断することにより神経伝達物質の放出を抑制する。食餌性ボツリヌス症は本毒素を経口摂取した後、毒素が腸管から吸収され、血中へ移行して発症する。したがって、病態の発症には、神経毒素が最初の関門である腸管上皮バリアを通過することが必須である。しかし、巨大分子である神経毒素がこのバリアを通過する機構は不明であった。一方、本毒素は常に無毒成分との複合体としてボツリヌス菌により産生される。12S 毒素は神経毒素に無毒性で赤血球凝集活性を持たないタンパク質である non-toxic non-HA (NTNH) が結合したものであり、16S 毒素は 12S 毒素に無毒性で赤血球凝集活性を持つタンパク質である Hemagglutinin (HA) が結合したものである。HA は 3 つの異なるサブユニットから構成されている。無毒成分が神経毒素に付加すると毒素複合体の経口毒性は著しく強くなる。その理由として、無毒成分が神経毒素を消化液中での分解から保護することが知られていた。それに加えて補助事業者らは、16S 毒素は HA により小腸上皮組織に選択的に結合することを見いだした。その後補助事業者らは、HA（A 型および B 型）が腸管上皮細胞の基底膜側に作用して、細胞間バリアを破壊する強力な活性を持つこと、および HA は特異的に E-cadherin と相互作用することにより細胞間バリア破壊を引き起こすことを世界に先駆けて明らかにした。

さらに補助事業者らは、経口摂取後に腸管の管腔側に到達した毒素複合体が、HA を介して選択的に M 細胞に結合し transcytosis により、基底膜側に到達するという知見を得ている。したがって、HA は 2 つの作用、すなわち M 細胞からの transcytosis

とその後起こる特異的な細胞間バリアの破壊により、毒素の腸管吸収を促進すると考えられる。しかし、これら一連の作用を引き起こす最初のステップつまり HA が認識する M 細胞の基質分子は未同定である。

- 何を明らかにするのかについて

本研究では、HA が認識する M 細胞の基質分子とその後の transcytosis の分子機構、および HA 側の 3 次元構造解析を進めることなどにより機能部位を明らかにし、それを土台として HA の病態における役割を明らかにしたい。

HA の経粘膜ワクチン輸送体としての応用について：

- 研究の背景

粘膜ワクチンは、鼻粘膜などの粘膜組織にワクチン抗原を投与し、抗原特異的な粘膜免疫を活性化させる方法である。粘膜ワクチンは全身免疫も同時に活性化できることから、「粘膜」と「体内」の両方で病原体に対する防御免疫を成立させることができる。一方、従来の注射型ワクチンは、粘膜免疫は誘導されず、全身免疫システムのみ活性化にとどまるため、粘膜感染症の場合、感染そのものの予防効果は低く、発症後の重篤化を防ぐ効果が中心となる。このような背景から、粘膜感染症のワクチンとして粘膜ワクチンの開発が期待されている。米国では弱毒生インフルエンザウイルスを用いた経鼻ワクチン (Flu-Mist) が安全性考慮のため年齢制限つきであるが実用化されている。一方で、経鼻ワクチンでは、投与された抗原が嗅覚細胞を介して中枢神経系へ蓄積する危険性が示唆されている。そこで、粘膜ワクチン開発では、免疫誘導組織 (NALT: nasal-associated lymphoid tissue、GALT: gut-associated lymphoid tissue など) に抗原を安全かつ効率的に到達させる輸送系が非常に重要である。GALT の 1 つであるパイエル板や NALT を覆う上皮層には、外来抗原を積極的に取り込む M 細胞が存在する。したがって、M 細胞を標的としたワクチン抗原の送達システムは安全かつ効果的な免疫誘導を促すと考えられている。実際、清野博士らにより M 細胞を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体が粘膜ワクチンの輸送体として効果を発揮することが最近報告された。補助事業者は、ボツリヌス HA が M 細胞デリバリー作用を有することを発見し、ボツリヌス HA を粘膜ワクチンの輸送体として応用するという着想を得た。

- 何を明らかにするのかについて

インフルエンザウイルスなどを対象とし、これらのワクチン抗原を粘膜から体内へ送達させる粘膜ワクチンアジュバントとして、HA (あるいはその誘導体) の有効性を明らかにする。

【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】	
① 総合所見	
<p>ボツリヌス無毒成分の M 細胞を介した細胞内侵入機構の解明については一定の成果が上がっている。M 細胞上ボツリヌス無毒成分と結合する基質分子候補が特定され、本分子ノックアウトマウスが作製され、詳細なボツリヌス無毒成分の侵入機構についての研究が進展した。ボツリヌス無毒成分を用いた粘膜ワクチンの有効性についてオボアルブミンを対象として証明されたことは、大きなインパクトを持つ。</p> <p>ボツリヌス無毒成分の特性により 3 次元構造解析について、研究期間内に目的を達成している。</p> <p>本研究課題の成果を国際的に高く評価されている学術雑誌に公表するよう研究代表者は格段の努力をすべきである。事業終了後も、特許申請が完了した項目について順次、論文発表を加速して欲しい。特許申請と関連した事情であったとも考えられるが、発表学術論文が少ない。研究実施体制についてのマネジメントは適切であると思われ、助成金も効果的に執行されたと言える。</p>	

② 目的の達成状況	
<p>・ 所期の目的が <input type="checkbox"/> 全て達成された ・ <input checked="" type="checkbox"/> 一部達成された ・ <input type="checkbox"/> 達成されなかった</p>	
<p>ボツリヌス無毒成分の宿主細胞内侵入機構の解明については、ボツリヌス無毒成分が M 細胞上の基質分子と結合して transcytosis による細胞内ルートとボツリヌス無毒成分が E-cadherin と結合することにより細胞間バリア破壊による細胞間ルートが存在することが明らかにされた。またボツリヌス無毒成分と結合する M 細胞上の基質分子候補が得られた。加えて、当該基質分子候補のノックアウトマウスが作製された。しかし、目的とするボツリヌス無毒成分の細胞内侵入機構が十分解明されたとは言えない。ボツリヌス無毒成分の 3 次元構造解析については、ボツリヌス無毒成分であるサブユニットの X 線回折については既に良好な分解能をもって測定可能となっているが、複合体の X 線回折による 3 次元構造解析は終了していない。ボツリヌス無毒成分 HA を利用した粘膜ワクチンの有効性の解析については、オボアルブミンを用いた実験で良好な成績を得ることができた。しかし、これらの研究結果を総合的に判断した場合、十分な研究成果が得られたとは言えない。</p> <p>本研究課題では上記の 3 つの目的に対する具体的な目標が設定されており、その達成に向けての研究が行われた。(1) ボツリヌス毒素無毒成分の宿主細胞内侵入機構</p>	

の解明については、ボツリヌス毒素複合体が腸管において選択的に M 細胞へ結合して M 細胞より取り込まれることを示した。また、ボツリヌス無毒成分の M 細胞上の結合基質を同定し、ボツリヌス無毒成分の結合基質遺伝子をノックアウトしたマウスを作製している。ボツリヌス毒素複合体の粘膜通過と細胞接着破壊の全体像を明らかにしたことは高く評価できる。しかし、当該基質分子の同定および侵入機構における役割が十分明らかにされていない。(2) ボツリヌス無毒成分の 3 次元解析は本研究の期待される成果のうちでも最重要な項目であり、研究期間内に目的を達成している。

(3) ボツリヌス無毒成分を経粘膜ワクチン輸送体としての有効性の解析については所定の研究成果が得られている。すなわち、ボツリヌス無毒成分をワクチンデリバリーとして応用することを試み、マウスで抗原特異的抗体産生がボツリヌス無毒成分により誘導されることを示した。しかし、研究計画全体の目的が達成されたとは言えない。

③ 研究の成果
<ul style="list-style-type: none"> ・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が (<input checked="" type="checkbox"/>ある ・ <input type="checkbox"/>ない)
<ul style="list-style-type: none"> ・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が (<input type="checkbox"/>創出された ・ <input checked="" type="checkbox"/>創出されなかった)
<ul style="list-style-type: none"> ・当初の目的の他に得られた成果が (<input type="checkbox"/>ある ・ <input checked="" type="checkbox"/>ない)
<p>ボツリヌス無毒素成分が結合する M 細胞上の基質分子候補を同定したことは、当該研究領域において、先進性・優位性を持つものである。また、同基質分子候補ノックアウトマウスが作製されており、同マウスおよびボツリヌス無毒成分が結合しない rat E-cadherin knock in マウスを用いたボツリヌス無毒成分細胞内侵入機構を明らかにするための研究は当該領域における先進性・優位性を持つと言える。加えて、オボアルブミン抗原とボツリヌス無毒成分混合物を用いたマウス経鼻接種が抗原特異的抗体産生の誘導に有効であったことが明らかにされており、新規の粘膜ワクチン開発のために先進性・優位性を持つ研究であるとみなされる。</p> <p>本研究課題の成果は当該研究領域において先進性・優位性を持つものであるが、当初の目的が十分達成されていないため、ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果に達したとは言えない。当初の目的の他に特記すべき研究成果はない。</p>

④ 研究成果の効果
<ul style="list-style-type: none"> ・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が (<input type="checkbox"/>見込まれる ・ <input checked="" type="checkbox"/>見込まれない)
<ul style="list-style-type: none"> ・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が (<input type="checkbox"/>見込まれる ・ <input checked="" type="checkbox"/>見込まれない)
<p>ボツリヌス菌は食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症などの原因菌である。また、ボツリヌス毒素は極めて毒性が強いため、バイオテロリズムへの乱用についても懸念</p>

される問題を含み、社会的な成果効果がある。ボツリヌス無毒成分の経粘膜ワクチン輸送体としての応用について、オボアルブミンとボツリヌス無毒成分との混合物に抗原特異的抗体産生の誘導が認められたことは、当該研究分野の進展に寄与する。

本研究課題で得られた知見はボツリヌス症のあらたな治療法を開発する手掛かりを与える可能性がある。また、ボツリヌス無毒成分が新規な粘膜ワクチン輸送体であることが示唆されており、今後も様々な抗原を用いて検討を重ねることにより、感染症の予防・治療ワクチンとして広く応用できる可能性がある。致死率が高い食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症、あるいは家畜ボツリヌス症の新規予防法や治療用の開発に繋がる知見を提供することが考えられる。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

研究目的の達成に向けて研究計画は適切に立てられている。また、購入された機器の使用状況などにより、助成金は有効に活用されたといえる。しかし、研究実施体制についてはプロジェクトCを担当するポスドクを雇用できなかったため、一部不適切なものであったと思われる。ボツリヌス毒素の生体内結合基質分子の生理的機能に関する解析については、抗原特異的抗体産生誘導能に関する検討がなされており、指摘事項への対応状況は適切であったと言える。

研究成果の論文発表は査読ありの雑誌において9件なされており、研究期間中に国際的に評価が高いと言われている雑誌へ投稿中の論文も含まれている。しかし、研究代表者が指導的立場となっていない論文もこれらに含まれている。論文発表数が少なめであるのは、特許申請と関連した事情であったとも考えられるが、申請が完了した項目については順次、国際誌への投稿を加速する必要がある。

参加者200名の講演会の開催を行い、国民との対話にも努めている。所属大学の研究ときめきカフェにてボツリヌス食中毒に関する講演や、工業短期大学においてボツリヌス食中毒に関する講演などを行った。しかしながら、これらの実績は、国民との科学・技術対話については必ずしも効果的であったとは言えない。今後、マスコミにも取り上げられるような工夫を行うとその効果も大きいと考える。