

進化医学の視点から考える心疾患・感染症の新しい治療薬の開発
- エピトープペプチドワクチンの構築・ヌタウナギ科の心臓と velum の解析 -

城西国際大学 薬学部

○西口慶一、甲斐谷風矢、坂本秀磨、
面川真也、林梨乃、新垣知輝、神谷貞浩
がん研究会がん研究所 芝清隆

東京慈恵会医科大学医学部 伊藤正紀

1. 緒言

進化医学 (Evolutionary Medicine) とは、進化生物学の視点から医学や健康問題を理解し対処しようとする学問分野である。進化のプロセスを考慮することで、疾病の原因やメカニズムをより深く理解することができ、また新しい治療法の開発にもつながる。

我々の研究室では進化医学研究として (1) 感染症の治療法開発としての新型コロナウイルスに対するワクチン開発、(2) 循環器系・呼吸器系の疾患理解としてのヌタウナギ科の心臓と velum の構造解析の研究を行っている。

(1) のワクチン開発では、実験進化手法を用いたエピトープペプチドベースのワクチンを開発している。現在、SARS CoV-2 に対するエピトープベースのペプチドワクチンは多くの研究があるが、実用化に至っていない。我々はその原因として抗原として用いるペプチドが、細胞の免疫処理経路に認識されるために適切な高次構造をもっていないのではないかと考え、人工進化系 MolCraft¹⁾ を用いて、抗原性の増強したエピトープの創製をめざしている。MolCraft では最初に3つの読み枠それぞれにエピトープペプチドと二次構造情報を埋め込んだマイクロ遺伝子を設計し、次にこれを microgene polymerase reaction (MPR)^{2~4)} で、連結部に塩基の挿入・欠失をランダムに起こしながら重合させる。その結果、エピトープ配列が色々な二次構造土台に埋め込まれた人工タンパク質をライブラリーを調製できる。エピトープがどのような二次構造土台に埋め込まれると抗原性が高まるのかを明らかにするのが本研究の中期目標である。本発表では、SARS-CoV-2 の感染ステップの鍵となる Spike protein (Fig. 1) の既知エピトープ配列をモデルケースとし、それを α ヘリックス、あるいは β ストランドが豊富な土台に配置した人工タンパク質遺伝子ライブラリーを調製したので報告する。

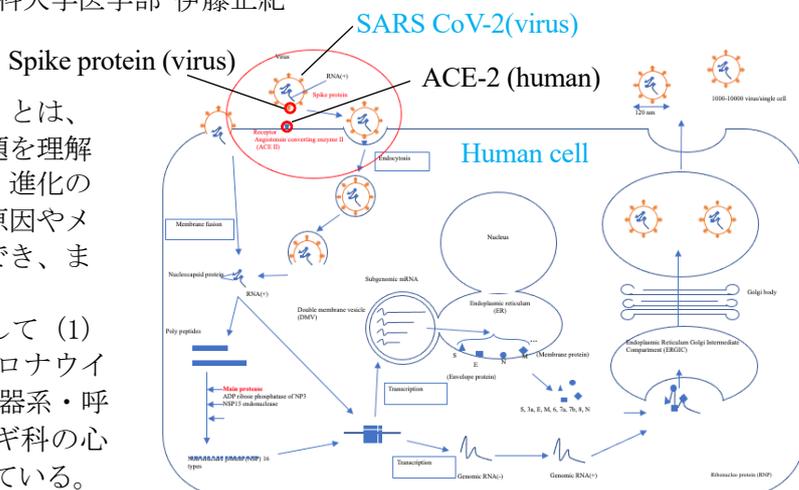


Fig. 1 SARS CoV-2 の細胞への侵入、増殖、放出までのメカニズム

(2) では循環器系・呼吸器系の疾患の理解を深めるために、最も下等な脊椎動物であるヌタウナギ科をモデル動物として、その心臓と velum の構造を調べ、ヒトと比較した。ヒト以外の脊椎動物やヒトの乳児は、気道と

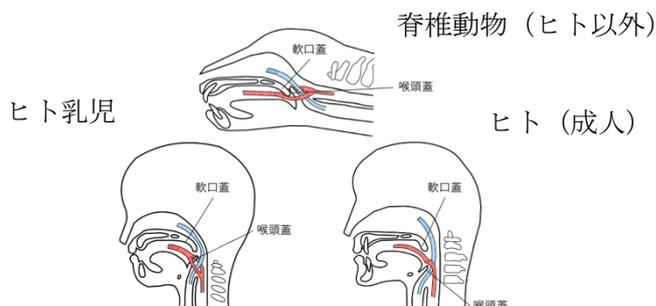


Fig. 2 気道と食道の構造

食道は交差していないが、ヒトの成人のそれは交差する (Fig. 2)。呼吸器系は食道 (食物の摂取) と気道 (呼吸) という2つの異なる機能を共有するようになった。これは生物の基本的な設計の制約の一つであり、この設計の制約が誤嚥のリスクを生み出している。進化医学の視点からは、呼吸器系は、体内に酸素を取り入れ、二酸化炭素を排出する役割を担っている。主な構成要素は、鼻、喉頭、気管、気管支、肺などである。一方、心臓は、酸素と栄養素を含んだ

血液を全身に送り届け、二酸化炭素や老廃物を含んだ血液を肺に戻すポンプの役割を果たす。

酸素は細胞のエネルギー生産に必要不可欠であり、細胞はエネルギーを生成する過程で二酸化炭素を生産する。呼吸器系と心臓の協力によって、体内の酸素供給と二酸化炭素の排出がバランスよく行われることで、健康が維持される。このように、呼吸器系と心臓は連携して酸素を供給し、二酸化炭素を排出することで、体内の酸素濃度を適切に保ち、全身の細胞が正常に機能するのを助けている。脊椎動物の循環器・呼吸器系が進化する過程はほとんど解明されていない。

我々の研究では、ヌタウナギ科の循環器系と呼吸器系を詳細に調べた結果、新たな知見が得られたので報告する。

2. 材料および実験方法

1) 感染症の研究

Microgene Polymerase Reaction (MPR) 法は Vent DNA ポリメラーゼを用いておこなった。得られた重合体の 5' 末端のリン酸基と平滑化を T4 polynucleotide kinase と DNA polymerase I でおこない、ベクター

(pTZ19R) の Alkaline phosphatase (Calf Intestine) 処理した *Sma* I 部位に T4 DNA ligase を用いて連結させた。組換え体は、大腸菌 XL1blue に導入したのち、適切な大きさをもったクローンを、pTZ19R を *Sma* I 部位を挟む PCR プライマーを用いた PCR スクリーニングで選択した。選んだクローンを pKS612 発現ベクターにサブクローニングするために、それぞれ *Acc*65I と *Bam*HI、および *Acc*65I と *Bg*II で切断し、T4 DNA ligase を用いて連結させた。連結した組換え体は、大腸菌 XL1blue に導入した。

2) 循環器系・呼吸器系の疾患の研究

実験動物はクロヌタウナギ（神奈川県江ノ島沖深度 500 m で採取）を使用した。すべての動物実験は、城西国際大学実験動物規定にそって計画し、全学実験動物管理委員会の承認を得て実施した（承認番号：2300132）。

画像解析はコンピューター断層撮影 (CT) と超音波 (エコー) で行った。CT は撮影後に血管造影法と光線変更法を用いて解析を行なった。血管造影法は血管の描出を行うモードである。光線変更法は、画像を三次元に見えるよう、仮想の光源から光が当たっているという設定で

影を描出し、画像の立体感が出るように調整するモードである。エコーは sonography diagnostic imaging system FAZONE M を用いた。解剖はホルマリン固定下と麻酔下にて行った。解剖時の麻酔をした。気道と食道の色分けの実験では、色素を 2 種 (赤色素、青色素) 用い、シリコンに赤色あるいは青色の色素を混ぜて使用した。鼻から青色素入りシリコン、口から赤色素入りシリコンを混ぜ、それぞれ挿入した。ヌタウナギから切除した組織 (心臓と velum) は、すべて 20% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィンに包埋し、マイクロトームで厚さ 3 μ m にスライスした。スライスした組織はパラフィンを除去した後、標本をヘマトキシリンおよびエオジン、リンタングステン酸ヘマトキシリン、またはアルシアンブルーで染色した。スライスした組織はパラフィン除去後、標本をヘマトキシリンおよび、エオジン、リンタングステン酸ヘマトキシリン、またはアルシアンブルーで染色を行った。

3. 実験結果および考察

1) 感染症の研究

DNA 配列の 3 つの異なる読み枠の 1 つに Spike protein のエピトープをコードし、他の読み枠に高次構造形成に関連する配列を潜源化させたマイクロ遺伝子を設計した。この際、最終的に得られる人工タンパク質が、 α ヘリックスまたは β ストランドを富むようにエピトープのコドンを選択し、マイクロ遺伝子を設計した。これらマイクロ遺伝子を基に MPR プライマーを合成し、MPR を用いて、読み枠をずらしながらマイクロ遺伝子をタンデムに連結させた。MPR はミスマッチでタンデムに連結し、ミスマッチのところでは遺伝子の変異が起こるため (置換、削除、挿入)、多くのクローンが得られた。得られた 16 クローンを発現用ベクター pKS612 にサブクローニングし、現在、大腸菌 XL1blue を用いて人工タンパク質を発現調製し、それらが設計通りに、 α ヘリックスもしくは β ストランドを多く含むことを、CD スペクトルで確認している。今後、次のステップとして、人工タンパク質ワクチンがもつ物理化学的性質と免疫誘導能力の対応を明らかとする予定である。

2) 循環器系・呼吸器系の疾患の研究

CT 画像の分析では、クロヌタウナギの心臓と Velum の複雑な構造が明らかになり、心臓

はVelumと結合していた。エコーの分析では、心臓が3種4つ確認でき、頭部と鰓側ではVelumと気管の結合場所が異なっていた^{5, 6)}。Velumは膜構造6つが複雑に心臓と同期して海水を頭部から鰓に押し出していた。ホルマリン固定の実験では、Velumの膜状構造は薄いシート状構造であることが分かった。麻酔下での解剖では、Velumの動きや発する音声をとらえた。気道と食道の分析では、気道と食道はVelumの前方で立体交差し、Velumの後方で合流していた。組織学的分析からvelumは軟骨組織と骨格筋で構成されていることが分かった。現在、Velumの詳細な動きを明らかにするために2Dコンピューターグラフィックス化を試みている。クロタウナギの心臓とVelumの構造とその動きを詳細に解析した結果、新規の効率的な呼吸法であることが分かった。気道と食道の詳細な解析により、ヒトの呼吸法に似た構造であることが分かった。現在、CGアニメーションでVelumの呼吸法を再現し、呼吸法の詳細を明らかにした。Velumは心臓と同期しているため、呼吸器・循環器の2種の働きを兼ねていることを示唆した。

ヒトでは食道と気道が合流している。食べ物が入ってくると喉頭蓋が気道の入口を覆う。その他の動物（ヒト乳児を含む）では、食道と気道が立体交差し合流していない。誤嚥がなぜ起こるかについては十分な知見はない。ヌタウナギ科の知見からこれらが生まれる仕組みを明らかにしたい。

4. まとめ

本研究では、進化医学の実施例として、人工進化系を用いた新たなワクチン開発研究、および、循環器・呼吸器の臓器進化の視点から嚥下の理解を深めるといった2つの研究を紹介した。具体的な成果としては、SARS-CoV-2に対するエピトープベースのペプチドワクチン開発につながる人工タンパク質の創製と、循環器系および呼吸器系疾患に関連する進化的なトレードオフの関係を明らかとした。これらの成果は、新たな感染症予防・治療法の開発や、高齢化社会における誤嚥リスクからくる健康問題に対する新しい視点を提供する。

5. 参考文献

- 1) Kiyotaka Shiba. "MolCraft: a hierarchical approach to the synthesis of artificial proteins" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28 (2004) p.145–153.
- 2) Masaki Ito, Kazumi Hayashi, Eru Adachi, Tamiko Minamisawa, Sadamu Homma, Shigeo Koido, Kiyotaka Shiba., "Combinatorial Contextualization of Peptidic Epitopes for Enhanced Cellular Immunity" *Pros One*, Volume 9, Issue 10, e11042 (2014) p.1-11.
- 3) Shiba, K. et al, "Creation of libraries with long ORFs by polymerization of a microgene" *PNAS* April 15, 94 (8) (1997) p.3805-3810.
- 4) Kashiwagi, K., Isogai, Y., Nishiguchi, K. & Shiba, K. "Frame shuffling: a novel method for in vitro protein evolution" *Protein Eng Des Sel* January 19 (3) (2006) p.135-140.
- 5) Nishiguchi Y, Tomita T, et al.: "Examination of the hearts and blood vascular system of *Eptatretus okinoseamus* using computed tomography images, diagnostic sonography, and histology" *Int J Anal Bio-Sci* Vol4, No.3, (2016) p.46-54.
- 6) Nishiguchi Y, Hiruta N, et al. "Examination of the hearts of *Eptatretus burgeri* using histological analysis" *Journal of Japanese Society for Extremophiles*, Vol.21(2), (2023) p.57-64.