

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05008

研究課題名(和文) 緑膿菌PcrV-CpG(K3)-SPGワクチンの開発と前臨床試験

研究課題名(英文) Preclinical study of Pseudomonas aeruginosa PcrV-CpG(K3)-SPG Vaccine

研究代表者

佐和 貞治 (Sawa, Teiji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10206013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工呼吸器関連肺炎や敗血症の高頻度起炎菌である緑膿菌が多剤耐性化し、致死的な院内感染発生が頻発している。緑膿菌の病原性を抑制できる標的として 抗原PcrVが発見された。本研究では臨床応用可能な緑膿菌PcrV・CpG-oligodeoxynucleotidesアジュバントワクチン(PcrV-CpGワクチン)を開発し、前臨床試験として安全性と有効性を確かめた。動物実験にてPcrV-CpGワクチンの経鼻投与により、緑膿菌に対する免疫効果が獲得できて、致死量の緑膿菌肺感染に対して予防効果を示すことが示された。本研究は、PcrV-CpGワクチンのヒトへの臨床応用に展望を示した。

研究成果の概要(英文)：An effective vaccine against Pseudomonas aeruginosa would be hugely beneficial to people who are susceptible to the serious infections caused by it. Vaccination against PcrV of the P. aeruginosa type III secretion system is a potential prophylactic strategy for improving the incidence and poor prognosis of P. aeruginosa pneumonia. Here, the effect of nasal PcrV adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide (CpG) was investigated in a mouse model of P. aeruginosa pneumonia. In vaccinated mice, the significant increase in PcrV-specific titers was detected. Vaccinated mice with nasal PcrV-CpG vaccine survived from a lethal P. aeruginosa pneumonia. Overall, our data show that the nasal PcrV-CpG vaccine has potential efficacy for clinical application against P. aeruginosa pneumonia.

研究分野：集中治療医学、予防医学

キーワード：緑膿菌 ワクチン 三型分泌システム PcrV CpG oligonucleotide 肺炎 動物モデル 前臨床試験

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸器関連肺炎や敗血症の高頻度起炎菌である緑膿菌が多剤耐性化し、致死的な院内感染発生が頻発している。近年、多くの他の病原性グラム陰性菌と同様に緑膿菌にも型分泌システムの存在が発見され、緑膿菌性肺炎に続発する急性肺傷害や敗血症の病態発生に深く関わっていることが解明されてきた。加えて、型分泌システムが関わる病原性を抑制できる標的として緑膿菌抗原 PcrV が発見され、欧米では緑膿菌感染に対して抗原を標的とした抗体療法の開発が進められている。予防的に術後の人工呼吸管理が予想する大手術を受ける患者や、術前化学療法を行う手術予定の担癌患者などのハイリスク群を対象に、このワクチン療法を提供できることができれば、病原性の強い緑膿菌に対する免疫力を選択的に高め、感染が重篤化したり、院内感染が致死化・集団化しないように対処していくことが高齢化社会において求められている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトへ臨床応用可能な緑膿菌 PcrV・CpG-oligodeoxynucleotides アジュバント複合体ワクチンを開発し、前臨床試験として動物にて安全性と有効性を確かめる。

3. 研究の方法

大腸菌遺伝子組み換え緑膿菌 PcrV を生成する。臨床応用の観点から、PcrV は精製用タグ・フリー及びエンドトキシン・フリーとして精製する。アジュバントには CpG-ODN を用いる。ワクチンの効果は、免疫不全マウスに致死量の緑膿菌肺感染を起こすことで評価する。異なる投与ルート（腹腔内、経鼻）でワクチン投与したマウスに対して血清中の抗 PcrV 抗体価を測定し、致死的な緑膿菌肺感染を引き起こし、急性肺傷害の程度や、敗血症病態、生存率を観察することで有効性や安全性について検討を行う。

4. 研究成果

PcrV・CpG-ODN ワクチンの腹腔内投与は、マウスモデルにおいて、致死量の緑膿菌肺感染に対して有意な免疫効果を発揮した。続いて、PcrV・CpG-ODN ワクチンの経鼻投与を行い、ワクチン効果をマウス肺炎モデルを用いて評価した。アジュバントとして、Freund's adjuvant、水酸化アルミニウム(alum)、CpG-ODN を用いた3種類の PcrV ワクチンを作製し、マウスに投与した後、抗 PcrV 抗体価や緑膿菌性肺炎感染後の生存率を比較した。その結果、緑膿菌 PcrV に対する特異的な IgA 抗体価を気道において高めることで、致死量の緑膿菌肺感染に対して有意な免疫効果を発揮した。ヒトへの臨床応用に展望を与える結果を得た。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 23 件)

1. Kainuma A, Momiyama K, Kimura T, Akiyama K, Inoue K, Naito Y, Kinoshita M, Shimizu M, Kato H, Shime N, Fujita N, **Sawa T**. An outbreak of fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST357 harboring the *exoU* gene. *J Infect Chemother*, 査読有り, 2018 Apr 5. pii: S1341-321X(18)30086-2.
2. Hamaoka S, Niato Y, Katoh H, Shimizu M, Kinoshita M, Kainuma A, Akiyama K, **Moriyama K, Ishii KJ, Sawa T**. Efficacy comparison of adjuvants in PcrV vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Microbial Immunol*, 査読有り, 2017 61(2):64-74.
3. **Sawa T**, Hamaoka S, Kinoshita M, Kainuma A, Niato Y, Akiyama K, Kato H. *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU and its predicted homologs. *Toxins*, 査読有り, 2016, 8(11). pii: E307
4. Kinoshita M, Kato H, Yasumoto H, Shimizu M, Hamaoka S, Naito Y, Akiyama K, **Moriyama K, Sawa T**. The prophylactic effects of human IgG derived from sera containing high anti-PcrV titers against pneumonia-causing *Pseudomonas aeruginosa*. *Hum Vaccin Immunother*, 査読有り, 2016, 12(11):2833-2846.
5. **Sawa T**, Naito Y, Katoh H, Amaya F. Cellular stress responses and monitored cellular activities. *Shock*, 査読有り, 2016, 9: 113-121.
6. Yasumoto H, Katoh H, Kinoshita M, Shimizu M, Hamaoka S, Akiyama K, Naito Y, **Sawa T**. Epidemiological analysis of serum anti-*Pseudomonas aeruginosa* PcrV titers in adults. *Microbiol Immunol*, 査読有り, 2016, 60(2):114-20.
7. Shimizu M, Katoh H, Hamaoka S, Kinoshita M, Akiyama K, Naito Y, **Sawa T**. Protective effects of intravenous immunoglobulin and antimicrobial agents on acute pneumonia in leukopenic mice. *J Infect Chemother*, 査読有り, 2016, 22(4):240-7, 2016.
8. Katoh H, Yasumoto H, Shimizu M, Hamaoka S, Kinoshita M, Akiyama K, **Sawa T**. IV Immunoglobulin for acute lung injury and bacteremia in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Crit Care Med*, 査読有り, 2016, 44(1):e12-24.
9. 内藤慶史, **佐和貞治**. 多剤耐性緑膿菌に対する免疫療法. *医学のあゆみ*, 査読無し, 2018, 264(5):444-449, 2018.
10. **佐和貞治**. 緑膿菌感染症に対する能動、受動免疫療法. 第 51 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2017, p.20-23, ISSN1340-6477.
11. 甲斐沼篤, 秋山浩一, 内藤慶史, 木下真央, 濱岡早枝子, 加藤秀哉, **佐和貞治**.

- 臨床分離緑膿菌株の MLST 法による遺伝子解析. 第 51 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2017, p92-95. ISSN1340-6477.
12. 木下真央, 甲斐沼篤, 内藤慶史, 秋山浩一, 濱岡早枝子, 清水優, 加藤秀哉, **佐和貞治**. 各種グラム陰性細菌 V 抗原抗体価の疫学調査. 第 51 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2017, p96-97. ISSN1340-6477.
 13. **佐和貞治**, 濱岡早枝子, 内藤慶史, 秋山浩一, 木下真央, 清水優, 加藤秀哉, **森山潔**. 緑膿菌 型分泌と V 抗原ワクチンの開発. 第 50 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2016, p. 67-71. ISSN1340-6477.
 14. 木下真央, 加藤秀哉, 清水優, 濱岡早枝子, 秋山浩一, 内藤慶史, **佐和貞治**. マウス緑膿菌性急性肺障害モデルにおける PcrV に対して高力価の免疫グロブリン G の効果. 第 50 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2016, p. 132-136, ISSN1340-6477.
 15. **森山潔**, **佐和貞治**. 消化管穿孔患者における集中治療室での緑膿菌抗 PcrV 抗体価の推移. 第 50 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2016, p. 137-139. ISSN1340-6477.
 16. 濱岡早枝子, 加藤秀哉, 内藤慶史, 清水優, 安本寛章, 木下真央, 秋山浩一, **佐和貞治**. 緑膿菌の遺伝子組み換え V 抗原に各種アジュバントを添加したワクチンの有効性. 第 50 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2016, p. 140-144. ISSN1340-6477.
 17. **佐和貞治**, 加藤秀哉, 清水優. 感染症治療薬の新しい試み. 難治性感染症に期待される抗菌免疫療法 化学療法の領域, 査読無し, 2016, 32(1):96-106.
 18. 秋山浩一, 清水優, 濱岡早枝子, 木下真央, 安本寛章, 加藤秀哉, 木村武史, 藤田直久, **佐和貞治**. 複数剤耐性緑膿菌分離株の型分泌毒素遺伝子型解析. 第 49 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2015, p. 79-83. ISSN1340-6477.
 19. 清水優, 加藤秀哉, 木下真央, 濱岡早枝子, 秋山浩一, 安本寛章, **佐和貞治**. 多剤耐性緑膿菌臨床株の病原毒性評価. 第 49 回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2015, p. 88-93. ISSN1340-6477.
 20. **佐和貞治**. 緑膿菌性急性肺傷害に対する分子標的治療. 麻酔, 査読無し, 64(増刊): 5078-5084, 2015.
 21. **佐和貞治**, 加藤秀哉, 安本寛章, 清水優, 濱岡早枝子, 木下真央, 秋山浩一. 緑膿菌の主要肺傷害因子 -パタチン様ホスホリパーゼ A2- 型分泌毒素 ExoU-. 京都府医大誌, 査読有り, 2015, 124(7),475-487.
 22. **佐和貞治**, 加藤秀哉. 細菌の分泌装置 - 緑膿菌を中心に -. Surgery Frontier, 査読無し, 2015, 22:56-61.
 23. **佐和貞治**. 手術室における感染予防. 感染予防のための麻酔管理 - 整形外科医と麻酔科医の間での知識の共有. 日本骨・関節感染症学会雑誌, 査読無し, 2015, 28:17-21, 2015.
- (学会発表) (計 11 件)
1. Kainuma A, Akiyama K, Naito Y, Momiyama K, Inoue K, Kinoshita M, Kato H, **Sawa T**. The single sequence type pandemic of clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital, Japan. 16th International Conference on *Pseudomonas*, Liverpool, UK, Sep 5-9, 2017.
 2. Naito Y, Hamaoka S, Kainuma A, Kato H, Ishii JK, **Sawa T**. Intranasal PcrV vaccination protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. ASM Microbe 2017, June 1, 2017, New Orleans, Louisiana, USA
 3. Hamaoka S, Naito Y, Kato H, Kainuma A, **Sawa T**. The Association Between Anti-PcrV Titers And Protective Effects Against *P. Aeruginosa* In PcrV Vaccinated Mice. May 6, 2017, International Anesthesia Research Society Annual Meeting and International Symposium 2017, at the Grand Hyatt Washington in Washington, DC
 4. Kainuma A, Momiyama K, Akiyama K, Naito Y, Kinoshita M, Kato H, **Sawa T**. Epidemic propagation of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 clones harboring *exoU* gene. Association of University Anesthesiologists, 64th Annual Meeting, May 4, 2017, at the Grand Hyatt Washington in Washington, DC
 5. **Sawa T**. Mitochondrial Stress and Outcomes in Septic Patients Mitochondrial *stress* and *Pseudomonas* infections. IARS 2016 Annual Meeting and International Science Symposium, May 21 - 24, at the Hilton San Francisco Union Square, San Francisco, California, May 21, 2016
 6. **佐和貞治**. 教育講演 緑膿菌感染症に対する能動、受動免疫療法. 第 53 回緑膿菌感染症研究会 2017 年 2 月 10 日. 大分.
 7. **佐和貞治**. 招待講演 感染症スペシャリストが説きあかす難治性病原体の秘密. 緑膿菌性細胞上皮傷害の分子病態メカニズム. 角膜カンファレンス 2017 2017 年 2 月 17 日. 福岡.
 8. **佐和貞治**. シンポジウム 病原因子と病態の接点を求めて. 緑膿菌ワクチンの開発. 第 50 回緑膿菌感染症研究会. 2016 年 2 月 6 日, 東京.
 9. **佐和貞治**. 緑膿菌肺炎に対する グロブリンの効果. ランチョンセミナー. 第 38 回呼吸療法医学会学術集会, 名古屋国際会議場, 2016 年 7 月 16 日

10. **佐和貞治**. 緑膿菌性肺炎とガンマグロブリン製剤の新規効用のメカニズム. ランチョンセミナー. 第31回日本Shock学会総会 2016年10月6日. 東京.
11. **佐和貞治**. 緑膿菌V抗原に対する血清抗体価の疫学と緑膿菌性肺傷害に対する保護作用の検討. 第20回日本ワクチン学会学術集会. 2016年10月22日 東京.

•
〔図書〕(計2件)

1. **Sawa T**, Kainuma A, **Moriyama K**, Naito Y. Construction of a recombinant single-chain antibody fragment against bacterial type III secretion. *Antibody Engineering*, ISBN 978-953-51-3825-9-1 InTech, doi: 10.5772/intechopen.70316.
2. Naito Y, **Moriyama K**, **Sawa T**. Anti-PcrV Immunization for *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Cystic Fibrosis, *Progress in Understanding Cystic Fibrosis*, Dr. Dinesh Sriramulu (Ed.), InTech, ISBN 978-953-51-3291-2 doi: 10.5772/intechopen.69767.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 病原性グラム陰性菌に対するワクチン
発明者: 佐和貞治、石井建、濱岡早枝子、内藤慶史
権利者: 京都府公立大学法人、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
種類: 特許
番号: 特願 PCT/JP2018/003991
出願年月日: 2017年2月6日
国内外の別: 国内, 海外

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anesth/index.php?TeijiSawa>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐和 貞治 (Sawa Teiji)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 10206013

(2) 研究分担者

天谷 文昌 (Amaya Fumimasa)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 60347466

中屋 隆明 (Nakaya Takaaki)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 80271633

森山 潔 (Moriyama Kiyoshi)
杏林大学大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 10296717

(3) 連携研究者

石井 健 (Ishii Ken)
国立研究開発法人医薬基盤研究所・教授
研究者番号: 00448086